

FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

EL RATÓN *PCD/PCD* COMO MODELO DE  
DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES.  
ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

TESIS DOCTORAL

MIGUEL ÁNGEL MARCHENA FERNÁNDEZ

2008

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

El ratón *pcd/pcd* como modelo de degeneración de  
fotorreceptores. Estudio estructural y funcional

Tesis Doctoral

Miguel Ángel Marchena Fernández

Salamanca 2008

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

El ratón *pcd/pcd* como modelo de degeneración de fotorreceptores. Estudio estructural y funcional

Memoria presentada por *Miguel Ángel Marchena Fernández* para optar al grado de Doctor en Biología

Directores:

Prof. Dr. D. José Aijón Noguera

Prof<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup>. Almudena Velasco Arranz

Salamanca 2008

José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular y Patología y Director del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca, y Almudena Velasco Arranz, Profesora Titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca

HACEMOS CONSTAR:

Que el trabajo titulado **“El ratón *pcd/pcd* como modelo de degeneración de fotorreceptores. Estudio estructural y funcional”**, ha sido realizado por D. Miguel Ángel Marchena Fernández en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección.

Que, en nuestra opinión, este trabajo reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral en la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a dos de junio de dos mil ocho.

**Fdo.: José Aijón Noguera**

**Fdo.: Almudena Velasco Arranz**



*Dedicada con especial cariño a mi  
familia y a Elena*

## Agradecimientos

Sin duda, esta tesis no existiría sin el concurso de otras personas. Es justo y necesario reconocer y agradecer a todos los que han aportado su grano de arena a la construcción de este edificio.

Un pilar fundamental lo han constituido mis directores, la Dr<sup>a</sup>. Velasco Arranz y el Dr. Aijón Noguera, a los que quiero (y debo) agradecer la dirección de este trabajo y el haberme permitido entrar a formar parte de su grupo de investigación. Además, debo agradecer al Dr. Aijón algún tirón de orejas, consejo u opinión en algún momento de despiste; así como a la Dr<sup>a</sup>. Velasco el haber soportado con paciencia mis frecuentes “..sí, sí, me queda sólo un poquito..”.

Una inmensa deuda de gratitud he contraído con el Dr. de la Villa Polo, por abrirme las puertas de su laboratorio de par en par, por su inmejorable trato y por su excelente aportación científica a este trabajo.

Al Dr. Lara Pradas debo agradecerle el interés que mostró en mi incorporación al departamento (todavía recuerdo el incesante intercambio de faxes aquella tarde de 2001), así como su cercanía, accesibilidad y excelente trato.

Un saludo agradecido a los profesores del área de Biología Celular: el Dr. Alonso Peña, la Dr<sup>a</sup>. Arévalo, la Dr<sup>a</sup>. Cuadrado Rodríguez, el Dr. García Briñón (unidos además por el sufrimiento atlético), el Dr. Porteros y el Dr. Weruaga Prieto. De todos he aprendido y todos han colaborado. GRACIAS.

No puedo olvidarme del Dr. de Castro Soubriet, con quién he compartido muy buenos momentos, tanto científicos como no científicos.

Un cariñoso abrazo a Maitechu (con la que comparto el placer de conducir un Nissan).

Un efusivo igracias! a todos mis compañeros de laboratorio. Sois todos geniales; haceis que los lunes sean menos lunes, el trabajo se acerque más al placer y que el buen humor y las risas sean ley. Un pedacito de esta tesis es parte de cada uno de vosotros. Un agradecimiento especial a ese gurú llamado Jorge Valero que tantas preguntas científicas y técnicas me ha contestado.

Un abrazo con todo mi cariño a mis compañeros de fútbolín, mus, dardos, confiancias, ....: Carmelotti, Azur (puxa Alonso!), Glo, María, Conchi y David, Herrero Chang, Martintxu, Inferno Mike, Juan Decara y, como no, a mi rumano favorito, el siempre genial David Vilanova.

Gracias a la apabullante Rima Barhoum, la genial Nuri Fornis, el incatalogable Franki Germain, la compañera del metal Laura, el racional R. Blanco y, por supuesto, a mi queridísimo compañero y amigo J por haberme hecho sentir de la familia desde el primer día y, claro está, haberme introducido en el apasionante mundo de la electrofisiología.

A mi familia se lo debo todo. Soporte fundamental en momentos duros y fuente de ánimo siempre. En su universidad he aprendido las cosas más importantes en mi vida. Esté donde esté, vaya donde vaya, siempre me acuerdo de quién soy y de donde vengo. OS QUIERO.

Y por último, **GRACIAS** a Elena. La última de la lista, pero sin ninguna duda, la primera en todo lo demás. Sencillamente, sin tí, jamás hubiera acabado esta tesis.



# Índice

---

**Lista de abreviaturas**
**INTRODUCCIÓN**

<b>1. Biología celular y tisular de la retina .....</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura de la retina .....	1
1.2. Tipos celulares de la retina .....	2
1.2.1. Epitelio pigmentario de la retina .....	2
1.2.2. Tipos neurales.....	2
1.2.2.1. Células fotorreceptoras .....	3
1.2.2.2. Células bipolares.....	3
1.2.2.3. Células ganglionares.....	4
1.2.2.4. Células horizontales.....	5
1.2.2.5. Células amacrinas.....	6
1.2.2.6. Células interplexiformes.....	6
1.2.3. Tipos gliales .....	6
1.2.3.1. Células de Müller.....	7
1.2.3.2. Astrocitos.....	7
1.2.3.3. Células microgliales .....	8
1.3. Red vascular de la retina .....	9
<b>2. Fisiología de la retina.....</b>	<b>10</b>
2.1. Organización de los tipos neuronales.....	10
2.2. La fototransducción.....	11
2.3. Células bipolares ON y OFF.....	12
2.4. Células ganglionares ON y OFF .....	13
2.5. Vías transversales en el procesamiento de la señal visual.....	13
2.5.1. Células horizontales .....	13
2.5.2. Células amacrinas.....	14
2.6. Electroretinograma de campo lleno .....	14
2.6.1. Respuestas estándar en el ERG de campo lleno y origen fisiológico .....	15
2.6.1.1. Sensibilidad de bastones .....	15
2.6.1.2. Respuesta mixta máxima de conos y bastones .....	16
2.6.1.3. Potenciales oscilatorios.....	17
2.6.1.4. Respuesta de conos.....	18
2.6.1.5. Respuesta a estímulos repetidos ( <i>flicker</i> ) de 20Hz .....	18
2.6.2. Respuesta escotópica umbral.....	19
<b>3. El ratón mutante <i>pcd/pcd</i>.....</b>	<b>20</b>
3.1. Fenotipo <i>pcd/pcd</i> .....	23
3.1.1. Efectos de la mutación <i>pcd/pcd</i> en la retina .....	23
3.2. Otros modelos de degeneración de fotorreceptores.....	24
3.2.1. Los ratones <i>rd</i> .....	24
3.2.1.1. Retinal degeneration 1 ( <i>rd1</i> ).....	24
3.2.1.2. Retinal degeneration 10 ( <i>rd10</i> ).....	25
3.2.2. La rata <i>RCS</i> .....	25
3.2.3. La rata <i>p23H</i> .....	25
<b>4. Retinosis pigmentaria humana .....</b>	<b>26</b>
4.1. Genética de la retinosis pigmentaria.....	26
4.2. Histopatología de la retinosis pigmentaria humana.....	27
4.2.1. Epitelio pigmentario .....	27
4.2.2. Fotorreceptores.....	27
4.2.3. Neuronas de la CNI .....	28
4.2.4. Neuronas de la CCG.....	28
4.2.5. Células gliales.....	28
4.2.6. Vasos sanguíneos de la retina.....	29
4.2.7. Otras alteraciones .....	29

**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

<b>1. Un modelo animal de retinosis pigmentaria .....</b>	<b>31</b>
<b>2. El ratón mutante <i>pcd/pcd</i> como modelo de retinosis pigmentaria .....</b>	<b>31</b>

---

<b>3. Líneas generales del trabajo de tesis .....</b>	<b>32</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>32</b>
4.1. Poblaciones neuronales .....	32
4.2. Poblaciones gliales .....	33
4.3. Fisiología.....	33

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1. Animales .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Genotipado de los animales.....</b>	<b>35</b>
2.1. Extracción del ADN .....	36
2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	37
2.3. Electroforesis.....	37
<b>3. Fijación, encastrado y corte .....</b>	<b>38</b>
3.1. Fijación.....	38
3.2. Encastrado .....	39
3.3. Corte.....	39
<b>4. Histología básica.....</b>	<b>39</b>
4.1. Tinción nuclear.....	39
4.1.1. Protocolo .....	40
<b>5. Marcaje TÚNEL .....</b>	<b>40</b>
5.1. Protocolo .....	40
<b>6. Inmunohistoquímica .....</b>	<b>41</b>
6.1. Marcadores neuronales.....	41
6.1.1. Proteína quinasa C alpha (PKC $\alpha$ ) .....	41
6.1.2. Islet1 .....	42
6.1.3. Rt97.....	42
6.1.4. Calbindina .....	42
6.1.5. Calretinina .....	43
6.1.6. Syntaxina.....	44
6.1.7. Sinapsina .....	44
6.1.8. Bassoon .....	44
6.2. Marcadores gliales.....	45
6.2.1. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) .....	45
6.2.2. Transportador de aminoácidos excitatorios 4 (EAAT-4).....	45
6.2.3. S100.....	45
6.2.4. Glutamina sintetasa (GS).....	46
6.2.5. Iba1 .....	47
6.2.6. CD68 (ED1) .....	47
6.2.7. Óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) .....	47
6.3. Resumen.....	48
6.4. Anticuerpos .....	48
6.5. Protocolo .....	48
6.5.1. Método avidina-biotina peroxidasa (ABC) .....	48
6.5.2. Marcaje fluorescente y doble marcaje fluorescente.....	50
<b>7. Marcaje con Tx-100 e IgG anti-IgG de ratón .....</b>	<b>51</b>
7.1. Protocolo .....	52
<b>8. Cuantificación de células .....</b>	<b>52</b>
<b>9. Registro electroretinográfico.....</b>	<b>53</b>
9.1. Protocolo .....	54
9.2. Aparataje y software.....	55
9.3. Protocolos de estimulación.....	56
9.3.1. Respuesta escotópica umbral (STR).....	56
9.3.2. Respuesta de bastones .....	57
9.3.3. Respuesta escotópica mixta .....	57
9.3.4. Potenciales oscilatorios .....	59
9.3.5. Respuesta de conos.....	59
9.3.6. Flicker.....	60
9.4. Análisis de datos .....	60

**RESULTADOS**

<b>1. Fotorreceptores</b> .....	<b>61</b>
<b>2. Muerte celular</b> .....	<b>61</b>
<b>3. Poblaciones neuronales</b> .....	<b>62</b>
3.1. Células bipolares .....	62
3.1.1. Inmunorreactividad a proteína quinasa C $\alpha$ (PKC $\alpha$ ) .....	62
3.2. Células ganglionares .....	63
3.2.1. Inmunorreactividad a islet-1 .....	63
3.2.2. Inmunorreactividad a Rt97 .....	64
3.2.3. Inmunorreactividad a calbindina y calretinina .....	64
3.3. Células horizontales .....	64
3.3.1. Inmunorreactividad a calbindina .....	64
3.3.2. Inmunorreactividad a Rt97 .....	65
3.4. Células amacrinas .....	65
3.4.1. Inmunorreactividad a calbindina .....	65
3.4.2. Inmunorreactividad a calretinina .....	66
3.4.3. Doble marcaje calretinina/calbindina .....	67
3.5. Marcadores de sinapsis .....	67
3.5.1. Inmunorreactividad a syntaxina .....	67
3.5.2. Inmunorreactividad a sinapsina .....	68
3.5.3. Inmunorreactividad a bassoon .....	68
<b>4. Poblaciones gliales</b> .....	<b>69</b>
4.1. Células de Müller y astrocitos .....	69
4.1.1. Inmunorreactividad a GFAP .....	69
4.1.2. Inmunorreactividad a EAAT-4 .....	69
4.1.3. Inmunorreactividad a S100 .....	70
4.1.4. Inmunorreactividad a glutamina sintetasa (GS) .....	71
4.2. Células de microglía .....	73
4.2.1. Marcaje con Tx-100 e IgG anti-IgG de ratón .....	73
4.2.2. Inmunorreactividad a Iba-1 .....	73
4.2.3. Inmunorreactividad a CD68. Doble marcaje CD68/Iba1 .....	74
4.2.4. Inmunorreactividad a NOSi .....	74
4.2.5. Otros marcadores: inmunorreactividad a H <sub>5</sub> A <sub>5</sub> y MHC-II .....	74
<b>5. Electrorretinograma</b> .....	<b>75</b>
5.1. Respuesta escotópica umbral (STR) .....	75
5.1.1. STR positivo .....	75
5.1.2. STR negativo .....	76
5.2. Respuesta de bastones .....	76
5.3. Respuesta escotópica mixta .....	77
5.3.1. Onda a .....	77
5.3.2. Onda b .....	78
5.4. Potenciales oscilatorios .....	79
5.5. Respuesta de conos .....	80
5.5.1. Onda a fotópica .....	80
5.5.2. Onda b fotópica .....	81
5.5.3. Respuesta flicker (20Hz) .....	82

**ICONOGRAFÍA**

Figura 47. Estructura de la retina .....	83
Figura 48. Células apoptóticas .....	84
Figura 49. Células bipolares (I) .....	85
Figura 50. Células bipolares (II) .....	86
Figura 51. Células ganglionares .....	87
Figura 52. Inmunorreactividad a Rt97 .....	88
Figura 53. Células horizontales .....	89
Figura 54. Células amacrinas (I) .....	90
Figura 55. Células amacrinas (II) .....	91
Figura 56. Marcadores de sinapsis (I) .....	92
Figura 57. Marcadores de sinapsis (II) .....	93

Figura 58. Marcadores de sinapsis (III) .....	94
Figura 59. Astrocitos y células de Müller (I) .....	95
Figura 60. Astrocitos y células de Müller (II).....	96
Figura 61. Astrocitos y células de Müller (III).....	97
Figura 62. Astrocitos y células de Müller (IV) .....	98
Figura 63. Astrocitos y células de Müller (V).....	99
Figura 64. Astrocitos y células de Müller (VI) .....	100
Figura 65. Astrocitos y células de Müller (VII) .....	101
Figura 66. Células de microglía (I) .....	102
Figura 67. Células de microglía (II).....	103
Figura 68. Células de microglía (III).....	104
Figura 69. Células de microglía (IV) .....	105
Figura 70. Respuesta STR.....	106
Figura 71. Respuesta de bastones.....	107
Figura 72. Respuesta escotópica mixta .....	108
Figura 73. Potenciales oscilatorios.....	109
Figura 74. Respuesta fotópica de conos (I) .....	110
Figura 75. Respuesta fotópica de conos (II).....	111

## DISCUSIÓN

<b>1. Degeneración de fotorreceptores .....</b>	<b>112</b>
1.1. Histología .....	112
1.2. Muerte por apoptosis .....	113
<b>2. Vía centripeta .....</b>	<b>113</b>
2.1. Células bipolares .....	113
2.2. Células ganglionares .....	114
<b>3. Vías transversales.....</b>	<b>115</b>
3.1. Células horizontales .....	115
3.2. Células amacrinas.....	116
<b>4. Marcadores relacionados con la sinapsis .....</b>	<b>117</b>
<b>5. Células gliales .....</b>	<b>118</b>
5.1. Células de Müller .....	118
5.1.1. Expresión de GFAP.....	118
5.1.2. Expresión de EAAT-4 .....	119
5.1.3. Expresión de GS .....	120
5.1.4. Expresión de S100.....	121
5.2. Astrocitos .....	121
5.3. Células de microglía.....	122
<b>6. Respuesta electroretinográfica .....</b>	<b>124</b>
6.1. Respuesta escotópica umbral (STR).....	124
6.2. Respuesta de bastones .....	125
6.3. Respuestas escotópicas mixtas .....	125
6.3.1. Onda a .....	125
6.3.2. Onda b .....	126
6.4. Potenciales oscilatorios .....	127
6.5. Respuesta de conos.....	128
6.5.1. Onda a fotópica .....	128
6.5.2. Onda b fotópica .....	128
6.5.3. Respuesta flicker (20Hz) .....	129
6.6. Consideraciones finales.....	130
<b>7. El ratón <i>pcd/pcd</i> como modelo de degeneración de fotorreceptores .....</b>	<b>131</b>

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>132</b>
---------------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>134</b>
--------------------------	------------





# Lista de abreviaturas

---

**ABC:** complejo avidina-biotina peroxidasa (*avidin-biotin complex*)  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero  
**ATP:** adenosintrifosfato  
**BSA:** albúmina sérica bovina (*bovine serum albumine*)  
**CB:** calbindina  
**CCG:** capa de las células ganglionares  
**CD68:** grupo de diferenciación 68 (*cluster of differentiation 68*)  
**CFNO:** capa de fibras del nervio óptico  
**CNE:** capa nuclear externa  
**CNI:** capa nuclear interna  
**CNO:** cabeza del nervio óptico  
**CNTF:** factor neurotrófico ciliar (*ciliar neurotrophic factor*)  
**CPE:** capa plexiforme externa  
**CPI:** capa plexiforme interna  
**CR:** calretinina  
**CRX:** cone-rod homeobox  
**CSS:** citrato de sodio salino  
**DAB:** 3,3'-diaminobencidina  
**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol  
**DMAE:** degeneración macular asociada a la edad  
**DMSO:** dimetilsulfóxido  
**EAAT:** transportador de aminoácidos excitatorios (*excitatory aminoacid transporter*)  
**EDTA:** ácido etilendiaminetetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)  
**EP:** epitelio pigmentario  
**ERG:** electroretinograma  
**bFGF:** factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblastic growth factor*)  
**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*)  
**GDNF:** factor neurotrófico derivado de la glía (*glial derived neurotrophic factor*)  
**GDP:** guanosindifosfato  
**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acid protein*)  
**GMPc:** guanosinmonofosfato cíclico  
**GS:** glutamina sintetasa  
**GTP:** guanosintrifosfato  
**IBAI:** factor inflamatorio del aloinjerto 1 (*de AIF1: allograft inflammatory factor-1*)  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**IP:** yoduro de propidio  
**LED:** diodo emisor de luz (*light emission diode*)  
**mGluR6:** receptor metabotrópico de glutamato 6  
**MLE:** membrana limitante externa  
**MLI:** membrana limitante interna  
**NGF:** factor de crecimiento neuronal (*neuronal growth factor*)  
**NO:** nervio óptico  
**NOS:** sintasa del óxido nítrico (*nitric oxide synthase*)  
**NOSi:** sintasa del óxido nítrico inducible

---

## ***Lista de abreviaturas***

---

**PB:** pares de bases

**PCD:** degeneración de las células de Purkinje (*Purkinje cell degeneration*)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

**PKC:** proteína quinasa C

**P/V:** peso/volumen

**RCS:** Real colegio de cirujanos (*Royal college of surgeons*)

**RD:** degeneración de la retina (*retinal degeneration*)

**RDS:** degeneración lenta de la retina (*retinal degeneration slow*)

**RP:** retinosis pigmentaria

**SD:** Sprague-Dawley

**SDS:** sodiododecilsulfato

**SF:** segmentos de los fotorreceptores

**SNC:** sistema nervioso central

**STR:** respuesta escotópica umbral (*scotopic threshold response*)

**TAE:** tris acético edta

**TBE:** tris bórico edta

**TF:** tampón fosfato

**TFS:** tampón fosfato salino

**TTC:** tampón tris-clorhídrico

**dUTP:** desoxiuridintrifosfato

**V/V:** volumen/volumen

---



# Introducción

---



## 1.- BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR DE LA RETINA

### 1.1.- ESTRUCTURA DE LA RETINA

La retina es una porción del sistema nervioso central que se encuentra en la parte más interna del ojo. Presenta una estructura laminar constituida por la alternancia de somas celulares y capas de neuropilo, constituidas por los procesos de los numerosos tipos celulares presentes. Dentro de la retina se pueden distinguir ocho capas (Fig. 1). Estas capas son:

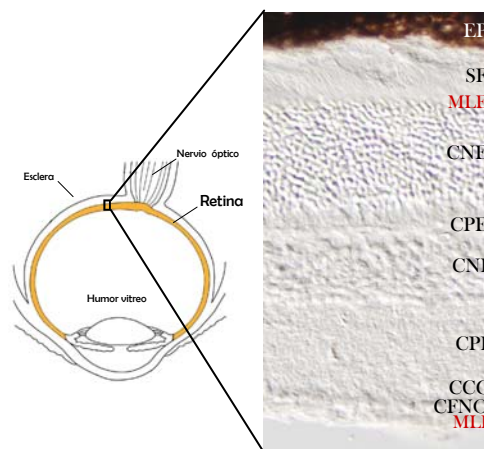


Figura 1. Localización y estructura de la retina.

- *Epitelio pigmentario de la retina (EP)*, que si bien no se considera parte de la retina neural, cumple funciones imprescindibles en la fototransducción y la integridad de los fotorreceptores.
- *Segmentos de los fotorreceptores (SF)*, constituida por los segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras de la retina.
- *Capa nuclear externa (CNE)*, donde se localizan los somas de las células fotorreceptoras.
- *Capa plexiforme externa (CPE)*, constituida por los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.
- *Capa nuclear interna (CNI)*, compuesta por los somas de células bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas, así como por los cuerpos de las células de Müller.
- *Capa plexiforme interna (CPI)*, formada por los axones de las células bipolares, así como por las dendritas de las células ganglionares, amacrinas e interplexiformes.
- *Capa de las células ganglionares (CCG)*, donde se ubican los somas de las células ganglionares y de las células amacrinas desplazadas.
- *Capa de fibras del nervio óptico (CFNO)*, constituida por los axones de las células ganglionares, los cuales abandonan la retina por la denominada cabeza del nervio óptico (CNO) formando el nervio óptico (NO). Además de axones, en esta capa también se pueden encontrar astrocitos.

Además de estas capas, algunos autores consideran también a las *membranas limitantes externa e interna* (MLE y MLI, respectivamente) (Fig. 1). La MLE se sitúa entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores y está constituida por procesos de células de Müller unidos entre sí a través de uniones especializadas. Por su parte, la MLI se localiza vitrealmente a la CFNO y está formada por los pies de las células de Müller.



## 1.2.- TIPOS CELULARES DE LA RETINA

### 1.2.1.- Epitelio pigmentario de la retina

El EP está constituido por una capa de células cúbicas enlazadas por complejos de unión y caracterizadas por contener abundantes gránulos de melanina en su citoplasma. Este pigmento absorbe el exceso de luz, impidiendo así que se produzcan reflejos lumínicos que perjudicarían a la formación correcta de la imagen (Geneser, 2000).

Además, estas células cumplen otras funciones altamente especializadas, incluyendo el almacenamiento, transporte y conversión del retinol, la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, el transporte selectivo de iones, nutrientes y metabolitos y el mantenimiento de la barrera hemato-retiniana (Geneser, 2000; Buraczynska *et al.*, 2002).

Hay evidencias de que el EP está involucrado en la etiología de numerosas distrofias retinianas, incluyendo la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Best, la amaurosis congénita de Leber y la degeneración macular asociada a la edad (Buraczynska *et al.*, 2002).

### 1.2.2.- Tipos neuronales

En la retina se pueden distinguir (Fig. 2):

- *Células fotorreceptoras*: conos y bastones.
- *Interneuronas*: células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes.
- *Neuronas de proyección*: células ganglionares, cuyos axones abandonan la retina y forman el nervio óptico, que lleva la información visual hasta el encéfalo.

La luz alcanza la retina por su extremo vitreal y debe atravesar todo el espesor de la misma para llegar a las células fotosensibles. Asimismo, los propios fotorreceptores están orientados en dirección opuesta al ingreso de la luz (Fig. 2). Esta disposición “invertida” de las capas de la retina es característica de todos los vertebrados y se denomina **retina inversa** (Geneser, 2000).

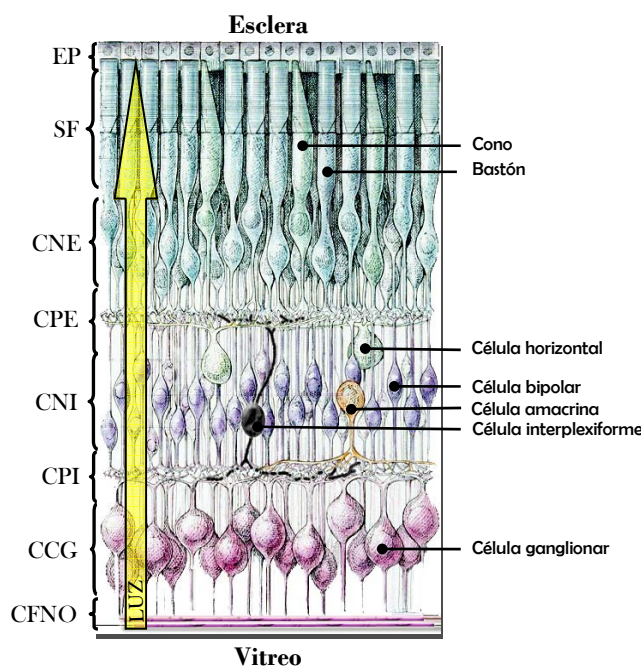


Figura 2. Localización de los diferentes tipos neuronales dentro de la retina. (Modificado de Bear *et al.*, 1998).



### 1.2.2.1.– Células fotorreceptoras

Los fotorreceptores están formados por (Fig. 3):

- *Segmento externo*, constituido por apilamientos de membrana que contienen los pigmentos sensibles a la luz. Los fotorreceptores de tipo bastón presentan un segmento externo cilíndrico y largo. Los fotorreceptores de tipo cono se caracterizan por presentar un segmento externo afilado y corto (Bear *et al.*, 1998).
- *Segmento interno*, contiene mitocondrias, ribosomas y membranas donde se ensamblan las moléculas de opsina.
- *Cuerpo celular*, donde se ubica el núcleo de la célula. Los conos tienen sus cuerpos celulares situados en una hilera sencilla. En cambio, los bastones presentan sus cuerpos celulares formando varios estratos vitreales respecto a la hilera de los conos.
- *Terminal sináptico*, encargado de transmitir la información a las neuronas de segundo orden.

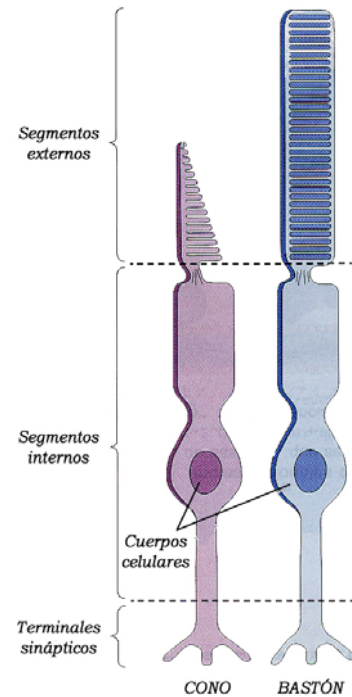


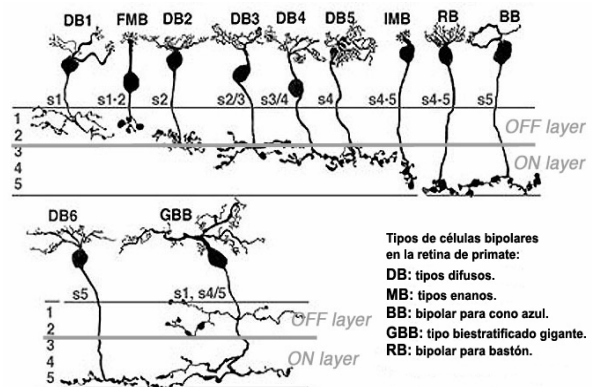
Figura 3. Esquema de las células fotorreceptoras. (Modificado de Bear *et al.*, 1998).

Los segmentos externos e internos de los fotorreceptores constituyen la capa de segmentos de los fotorreceptores (SF); la CNE está formada exclusivamente por los somas de estas células; por último, los terminales sinápticos se ubican en la CPE (Fig. 2).

Como veremos más adelante, los conos pueden clasificarse en función del pigmento fotosensible que presentan, hablándose de conos *azules*, *verdes* y *rojos*. En el caso de los bastones, éstos solo expresan un tipo de pigmento fotosensible (Bear *et al.*, 1998).

### 1.2.2.2.– Células bipolares

Las células bipolares presentan una morfología característica consistente en dos expansiones que parten en direcciones opuestas desde el cuerpo celular (Fig. 4). La expansión externa, dendrítica, se dirige hacia la CPE, donde contacta con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores. La expansión interna, axónica, más larga, termina a nivel de la CPI y hace sinapsis con células ganglionares y



Tipos de células bipolares en la retina de primates:  
 DB: tipos difusos.  
 MB: tipos enanos.  
 BB: bipolar para cono azul.  
 GBB: tipo biestratificado gigante.  
 RB: bipolar para bastón.

Figura 4: Tipos de células bipolares en la retina de primates. (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).



células amacrinas.

Las células bipolares, por tanto, transmiten la señal desde las células fotorreceptoras a las células ganglionares.

En base al patrón de ramificación dendrítica, al número y tipo de conos contactados y, fundamentalmente, según la forma y nivel de ramificación de sus axones dentro de la CPI, se han descrito once tipos morfológicos de células bipolares en la retina de primates (Fig. 4). Diez de estas células bipolares hacen sinapsis con conos, mientras que tan solo un tipo hace sinapsis con bastones (Boycott y Wässle, 1991).

Las células bipolares que contactan con conos hacen relevo directamente con las células ganglionares, mientras que las células bipolares que contactan con bastones hacen relevo con células amacrinas y son éstas las que transmiten la información a las células ganglionares (Kolb *et al.*, 2000).

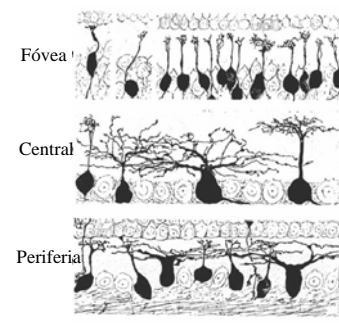
### 1.2.2.3.– Células ganglionares

Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso ubicado en la CCG. Sus ramificaciones dendríticas forman sinapsis en la CPI con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Su axón se sitúa a nivel de la CFNO (Fig. 2). El conjunto de axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico (Kolb *et al.*, 2000).

La morfología de las células ganglionares cambia desde la fóvea<sup>1</sup> a la periferia, aumentando la extensión del árbol dendrítico con la excentricidad a partir de la fóvea (Kolb *et al.*, 2000) (Fig. 5).

Las células ganglionares constituyen la última estación de relevo de la información visual dentro de la retina. Los axones de estas células salen de la retina y del globo ocular y llegan hasta el núcleo geniculado lateral, ubicado en el tálamo, donde se produce el siguiente relevo de la información visual en su viaje hasta la corteza cerebral.

Se pueden distinguir hasta 25 tipos diferentes de células ganglionares en la retina humana en función del tamaño del cuerpo celular, la extensión del árbol dendrítico, el patrón de ramificación del mismo (radial o empenachado) y el nivel dentro de la CPI donde se ramifican. A pesar de esta aparente heterogeneidad, se pueden resumir en tres tipos: las *células ganglionares difusas grandes*, las *células ganglionares difusas pequeñas* y las *células ganglionares enanas*. Algunos autores simplifican aún más esta clasificación distinguiendo sólo células ganglionares pequeñas o “*células de tipo P*”, que proyectan hacia las capas parvocelulares del cuerpo geniculado lateral y células ganglionares grandes o “*células de tipo M*”, que proyectan hacia las



**Figura 5: Diferente morfología de las células ganglionares según su ubicación (modificado de Kolb *et al.*, 2000).**

<sup>1</sup> **Fóvea:** la fóvea es una pequeña depresión en la retina caracterizada por la presencia exclusiva de conos. Es el área de la retina donde se enfocan los rayos luminosos y se produce la máxima agudeza visual.





capas magnocelulares del cuerpo geniculado lateral. De este modo, las ganglionares de tipo P incluirían a las ganglionares enanas y a las ganglionares difusas pequeñas, mientras que la clase de células M estaría conformada por las células ganglionares difusas grandes (Rodieck *et al.*, 1985; Shapley y Perry, 1986; Dacey y Petersen, 1992; Kolb *et al.*, 2000).

En el ratón se han distinguido tres tipos principales de células ganglionares en función del tamaño del soma y del campo dendrítico (Doi *et al.*, 1995). En líneas generales, el *tipo I* está constituido por células con somas y campos dendríticos de gran tamaño; el *tipo II* por células con somas pequeños o medianos y campos dendríticos pequeños; y el *tipo III* por células con somas pequeños o medianos y grandes campos dendríticos. Cada uno de estos tres tipos puede ser subdividido en función del nivel de la CPI donde finalizan sus dendritas y el patrón de ramificación de las mismas (Doi *et al.*, 1995).

#### 1.2.2.4.– Células horizontales

El soma de las células horizontales está ubicado en el borde escleral de la CNI, desde donde envía sus prolongaciones a la CPE. Estas prolongaciones se extienden horizontalmente abarcando una gran superficie (Fig. 2).

En humanos se han descrito tres tipos de células horizontales, atendiendo a criterios morfológicos, en preparaciones realizadas siguiendo el método de Golgi (Kolb *et al.*, 1992, 1994; Ahnelt y Kolb, 1994):

- **HI:** sus terminales dendríticos finalizan como elementos laterales de sinapsis *en cinta* con los pedículos de los conos rojos y verdes. Los pedículos de los conos azules no reciben más de uno o dos contactos de los campos dendríticos de las células HI. El axón de estas células contacta con los bastones.
- **HII:** sus dendritas contactan especialmente con los pedículos de los conos azules y los inervan en mucha mayor medida en comparación a como lo hacen con los conos rojos y verdes. Los axones de las células HII parecen contactar exclusivamente con conos azules.
- **HIII:** sus campos dendríticos eluden completamente a los conos azules.

Sin embargo, la retina del ratón difiere notablemente de la retina humana y de otras retinas de mamíferos ya que sólo presenta un tipo de células horizontales denominado **tipo B portador de axón** (Peichl y González-Soriano, 1994) (Fig. 6).

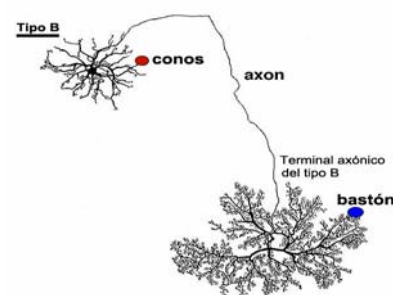


Figura 6: Célula horizontal de tipo B en la retina de ratón (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).



### 1.2.2.5.- Células amacrinas

Estas células presentan el cuerpo celular situado en la CNI y sus prolongaciones se extienden por la CPI (Fig. 2). Tras ser descubiertas por Dogiel, se pensó que estas células no tenían axón, pero hoy día se sabe que algunos tipos de amacrinas presentan largos procesos que pueden actuar como verdaderos axones (Kolb *et al.*, 2000).

En base a la tinción de Golgi se han identificado al menos veinticinco tipos de células amacrinas diferentes en la retina humana, si bien algunos autores llegan hasta los cuarenta tipos diferentes, que pueden clasificarse atendiendo al tamaño del árbol dendrítico, las características de las ramificaciones y, principalmente, por la estratificación de sus dendritas en la CPI (Mariani, 1990; Kolb *et al.*, 1992) (Fig. 7).

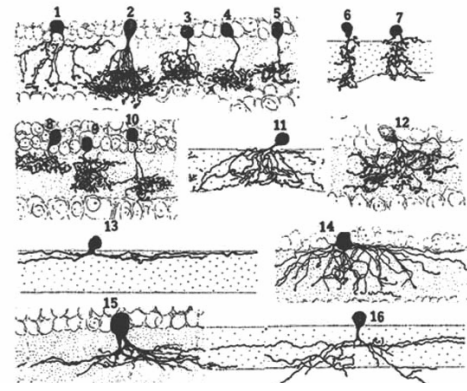


Figura 7: Diferentes tipos morfológicos de células amacrinas. Tinción de Golgi (Modificado de Polyak, 1941).

### 1.2.2.6.- Células interplexiformes

Las células interplexiformes están consideradas por la mayoría de autores como un tipo especial de células amacrinas. En general, tienen su soma ubicado en la CNI y de éste parten una serie de ramificaciones que se extienden por la CPE. Bien desde el propio soma celular o desde una de las ramificaciones primarias salen procesos que ascienden a través de la CNI hasta llegar a la CPE (Gallego, 1971; Kolb y West, 1977; Nakamura *et al.*, 1980; Kolb *et al.*, 1992) (Fig. 8).

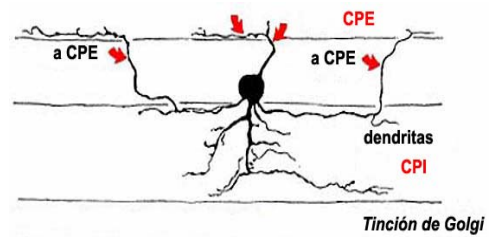


Figura 8. Célula interplexiforme de gato (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).

### 1.2.3.- Tipos gliales

En general, en la retina de los mamíferos pueden identificarse tres tipos de células gliales: las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía (Fig. 9). En algunos tipos de retina, como la del conejo, también pueden encontrarse oligodendrocitos. Sin embargo, ni en la retina humana ni en la de ratón está presente este tipo glial, ya que los largos axones de las células ganglionares no están mielinizados dentro de la retina.

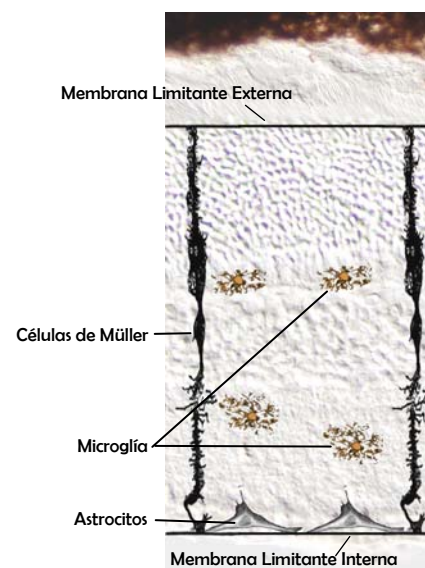


Figura 9. Tipos y localización de las células gliales.



### 1.2.3.1.– Células de Müller

El cuerpo de las células de Müller se sitúa en la CNI, desde donde envía procesos dirigidos a ambos extremos de la retina. Estos procesos de las células de Müller se intercalan entre los somas de las neuronas en las capas nucleares y envuelven procesos neurales en las capas plexiformes.

Una característica de la morfología de estas células es la enorme variedad de formas que se pueden encontrar en función de la especie (Kolb *et al.*, 2000) (Fig. 10). Además, dentro de una misma retina se pueden observar variaciones en la morfología de las células de Müller, según la zona concreta donde se encuentren.

En mamíferos, constituyen los límites de la retina al formar las membranas limitantes externa e interna (MLE y MLI, respectivamente) (Fig. 9). Para formar la MLE se unen procesos de células de Müller entre sí con células fotorreceptoras, a través de desmosomas y zónulas adherentes. En cuanto a la MLI, ésta se encuentra formada por los pies de las células de Müller, pero no se han observado uniones especializadas. Los pies de las células de Müller también rodean los grandes vasos sanguíneos en la superficie interna de la retina (Kolb *et al.*, 2000).

Estas células tienen funciones imprescindibles para la viabilidad y supervivencia neuronal (Reichenbach y Robinson, 1995; Kolb *et al.*, 2000). Así, las células de Müller:

- Son el soporte arquitectónico de la retina, al extenderse radialmente a través del grosor de la misma.
- Proporcionan productos del metabolismo anaeróbico, como combustible para las neuronas.
- Retiran productos de desecho y reciclan los aminoácidos usados en la sinapsis.
- Protegen a las neuronas contra la exposición a excesos de neurotransmisores (como el glutamato), usando mecanismos de recaptura y reciclaje. En este sentido, se caracterizan por la presencia en exclusiva del enzima glutamina sintetasa.
- Parecen estar involucradas en la fagocitosis de desechos neurales y en la liberación de sustancias neuroactivas tales como GABA, taurina y dopamina.
- Se piensa que sintetizan ácido retinóico a partir de retinol (Edwards, 1994).
- Controlan la homeostasis y protegen a las neuronas de los cambios dañinos en el medio iónico, al tomar el exceso de  $K^+$  extracelular y redistribuirlo.

### 1.2.3.2.– Astrocitos

Los astrocitos se encuentran casi exclusivamente al nivel de la CFNO (Kolb *et al.*, 2000). Se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de procesos radiales, si bien su morfología cambia según su localización, de tal forma que pasan de ser muy elongados a nivel

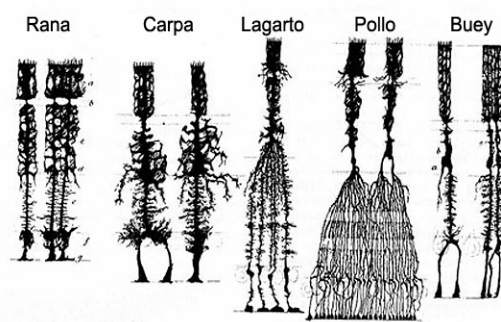


Figura 10. Células de Müller en diferentes especies (modificado de Kolb *et al.*, 2000).



de la retina central a una morfología estrellada en la retina periférica (Schnitzer, 1998) (Fig. 11).

En cuanto a su distribución, los astrocitos alcanzan su pico máximo de densidad en la CNO y desde la misma a la periferia disminuyen uniformemente. En la retina humana, los astrocitos no están presentes en la fóvea avascular ni en la ora serrata (Kolb *et al.*, 2000).

Los astrocitos se disponen sobre la superficie de los haces de axones de las células ganglionares formando un tubo a través del cual discurren dichos axones. Además, están relacionados con los vasos sanguíneos de la CFNO. Estos dos hechos sugieren que los astrocitos constituyen vainas gliales para haces axónicos y vasos sanguíneos y que forman parte de la barrera hematoencefálica. Por otra parte, los astrocitos contienen abundante glucógeno, por lo que podrían tener una función nutritiva proporcionando metabolitos a las neuronas. Por último, se piensa que los astrocitos pueden intervenir en la homeostasis iónica, contribuyendo a regular los niveles extracelulares de potasio, y en la regulación del metabolismo de determinados neurotransmisores (Höllander *et al.*, 1991; Kolb *et al.*, 2000).

También se ha comprobado que los astrocitos son muy resistentes al estrés oxidativo, debido a su elevado contenido en anti-oxidantes enzimáticos y no-enzimáticos y su capacidad para regenerar glutatión y ascorbato (Kettenmann *et al.*, 1996; Wilson, 1997). Estas características podrían aumentar la habilidad de los astrocitos para proteger a las neuronas de los radicales libres (Ridet *et al.*, 1997; Wilson, 1997; Iadecola, 1999).

En procesos degenerativos de la retina, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), los astrocitos presentan una elevada inmunorreactividad a GFAP y los procesos penetran en el humor vítreo desde la CFNO (Ramírez *et al.*, 2001). En casos avanzados de degeneración, los astrocitos presentan una intensa actividad fagocítica. También en retinas afectadas de DMAE se han encontrado astrocitos en el humor vítreo, fuera de la retina. La misión de estos astrocitos podría ser el intercambio de nutrientes y desechos entre el humor vítreo y la retina (Ramírez *et al.*, 2001).

### 1.2.3.3.– Células microgliales

Las células de microglía derivan de células precursoras de la médula ósea y entran en el sistema nervioso central (SNC) acompañando a los vasos sanguíneos durante la embriogénesis (Grossmann *et al.*, 2002).

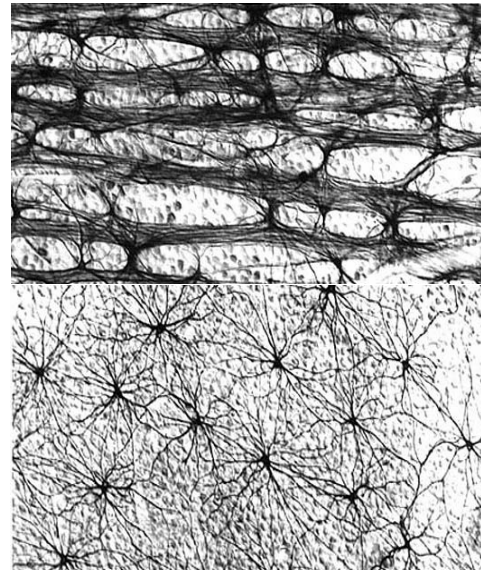


Figura 11: Astrocitos en la zona central (arriba) y en la zona periférica de la retina (abajo) humana. (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).





En la retina normal, la microglía está constituida por células de morfología estrellada que rodean a los vasos sanguíneos de la retina interna y que funcionan como macrófagos residentes (Provis *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2003) (Fig. 12).

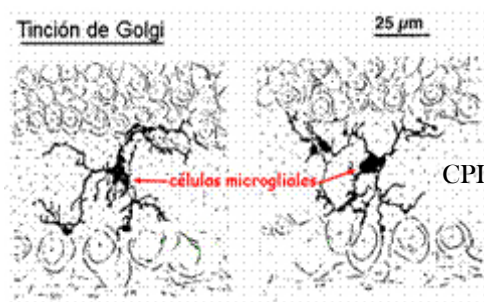
Cuando se produce una lesión en el SNC, incluida la retina, las células microgliales se activan y migran al área dañada, donde fagocitan los desechos celulares generados, denominándose entonces *microglía reactiva* (Kolb *et al.*, 2000). Las células microgliales activas tienen un tamaño mayor que en estado residente y presentan una morfología redondeada o ameboide (Thanos *et al.*, 1994; Roque *et al.*, 1996; Kolb *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que, acompañando a la muerte de los fotorreceptores, se produce la proliferación de células de microglía (Zeiss y Johnson, 2004). También se ha comprobado que las células de microglía liberan diversas sustancias que podrían afectar al resto de células de la retina, especialmente cuando ésta sufre un daño (Harada *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). En este último caso, se ha puesto de manifiesto que la intervención de la microglía puede ejercer efectos opuestos. Por un lado, pueden favorecer la supervivencia de las células fotorreceptoras al liberar factores neurotróficos como el GDNF y el CNTF, que actúan sobre las células de Müller, provocando que éstas últimas incrementen su producción de bFGF, factor que favorece la supervivencia de los fotorreceptores. Por otro lado, el NGF derivado de la microglía reduce la producción de bFGF en las células de Müller, lo que podría inducir la apoptosis de los fotorreceptores (Harada *et al.*, 2002). Asimismo, se ha comprobado que la microglía puede secretar otras moléculas con efectos adversos sobre la supervivencia de las células fotorreceptoras, como son, entre otras, el óxido nítrico, algunas especies reactivas de oxígeno, citoquinas proinflamatorias y proteasas (Lee *et al.*, 2002).

### **1.3.- RED VASCULAR DE LA RETINA**

Hay dos fuentes de suministro sanguíneo en la retina de los mamíferos. Por un lado, los vasos sanguíneos coroideos y, por otro, la arteria retinal central.

Los vasos coroideos son esenciales para el mantenimiento de la retina externa (particularmente de los fotorreceptores). Las arterias coroideas penetran en la esclera alrededor del nervio óptico y se diseminan para formar las tres capas vasculares de la coroides: *externa*, la más escleral, *medial* e *interna*, la más cercana a la membrana de Bruch del EP. Los correspondientes lóbulos venosos drenan en vénulas y venas que discurren hacia el ecuador del globo ocular para constituir las venas "vórtice". Una o dos de estas venas drenan cada uno de los cuatro cuadrantes del globo ocular. Las venas vórtice penetran en la esclera y se fusionan para constituir la vena oftálmica (Kolb *et al.*, 2000).



**Figura 12. Células microgliales** (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).



La arteria retinal central penetra por la cabeza del nervio óptico y nutre las capas internas de la retina. En la retina humana, la arteria central se ramifica en cuatro ramales principales, los cuales alimentan tres capas de redes capilares: los *capilares periféricos radiales*, la *capa interna de capilares* y la *capa externa de capilares*.

Los capilares periféricos radiales constituyen la capa más superficial de capilares y descansan en la parte interna de la CFNO. La capa interna de capilares se sitúa en la CCG y discurre paralela a la anterior. La red externa de capilares se dispone desde la CPI a la CPE, atravesando la CNI (Zhang, 1994). En cuanto al correspondiente retorno venoso, los capilares venosos drenan en vénulas de mayor diámetro que confluyen para formar la vena retinal central (Kolb *et al.*, 2000).

## 2.- FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

### 2.1.- ORGANIZACIÓN DE LOS TIPOS NEURONALES

La luz debe atravesar todo el espesor de la retina hasta llegar a los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales convierten la energía luminosa en cambios de potencial de

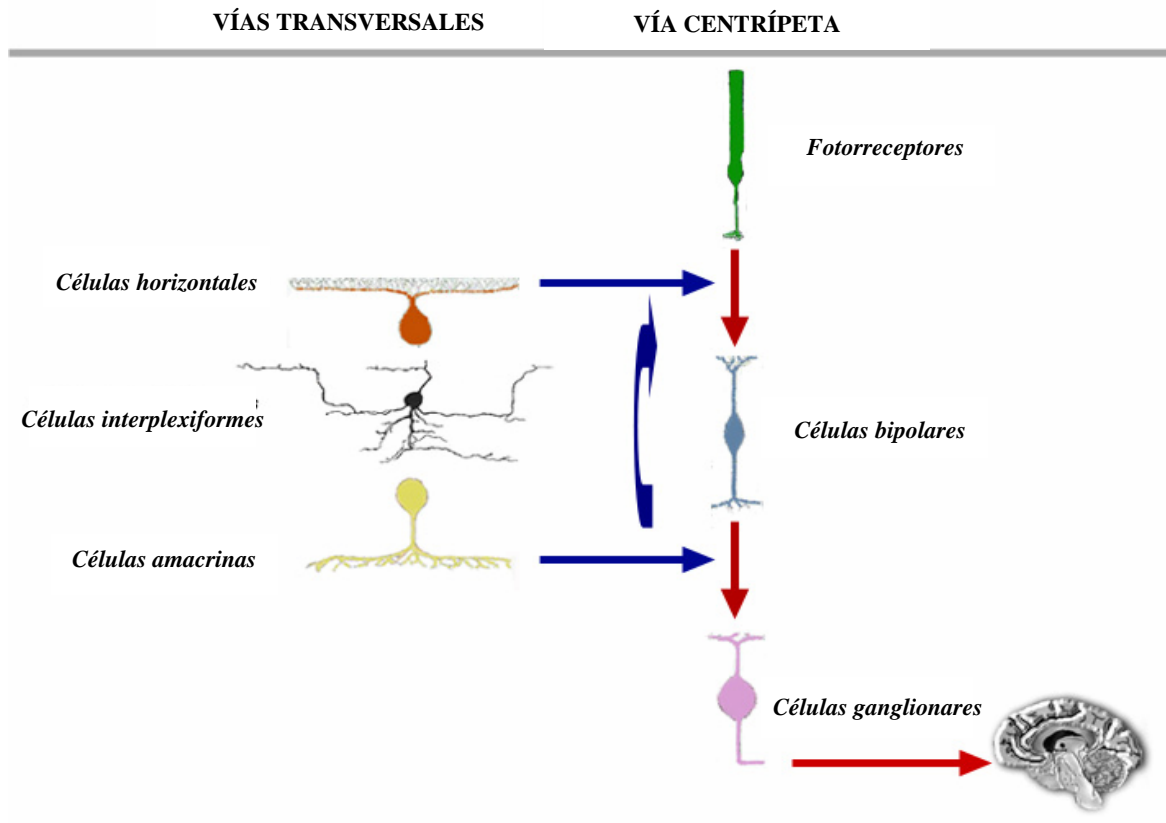


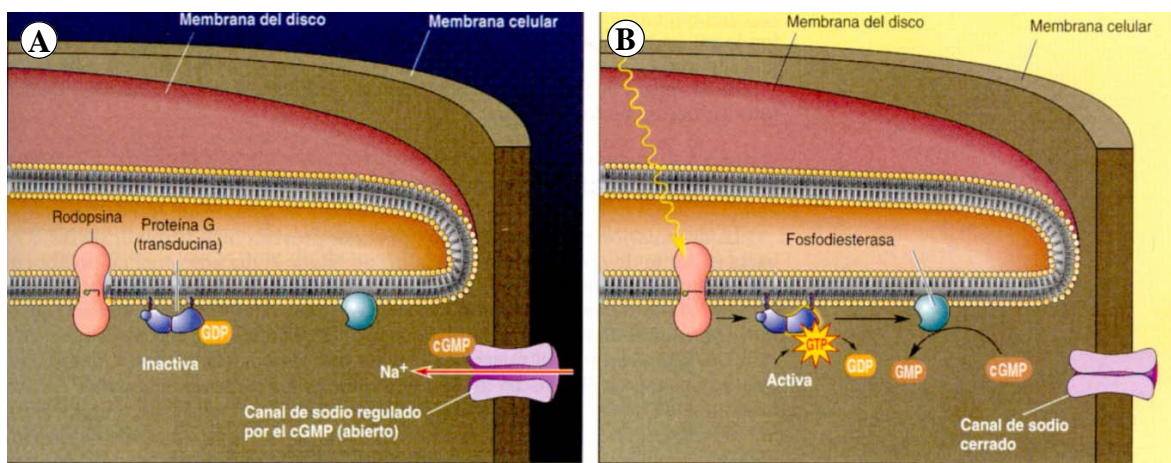
Figura 13: Vía vertical y vías horizontales en la transmisión y modulación de la señal visual. La información visual viaja desde los fotorreceptores al cerebro recorriendo la llamada *vía vertical*. En este viaje se produce la modulación de la señal, en lo que se conoce como *vías horizontales* del procesamiento de la señal visual.

membrana en un proceso conocido como *fototransducción*. La información visual pasa a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares, cuyos axones llevan el mensaje visual al encéfalo (Fig. 13).

En el paso de la información desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares, el mensaje visual es modulado. Esta modulación es ejercida por las células horizontales, amacrinas e interplexiformes (Fig. 13).

## 2.2.- LA FOTOTRANSDUCCIÓN

En condiciones de oscuridad absoluta, el potencial de membrana del segmento externo del fotorreceptor es de unos -30 mV. Esta despolarización respecto al potencial de membrana en reposo de una neurona típica (-65 mV) está causada por la entrada constante de  $\text{Na}^+$  a través de los canales especiales de la membrana del segmento externo. Este movimiento de cargas positivas a través de la membrana recibe el nombre de *corriente en oscuridad*. Los canales de  $\text{Na}^+$  están regulados por el guanosinmonofosfato cíclico (cGMP), el cual es producido de manera constante por el enzima guanilatociclasa, lo que mantiene abiertos los canales de  $\text{Na}^+$  (Fig. 14). La luz disminuye el cGMP, lo que provoca el cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  y el potencial de membrana se vuelve más negativo. Por consiguiente, los fotorreceptores se hiperpolarizan en respuesta a la luz (Bear *et al.*, 1998).



**Figura 14: Cascada bioquímica activada por la luz en un fotorreceptor:** **A:** En la oscuridad, el cGMP regula un canal de sodio y provoca una corriente de  $\text{Na}^+$  hacia el interior y la despolarización de la célula. **B:** La activación de la rodopsina por la energía luminosa hace que la proteína G (transducina) intercambie GDP por GTP, lo que a su vez activa al enzima fosfodiesterasa. La fosfodiesterasa degrada el cGMP y desactiva la corriente de oscuridad. (Tomado de Bear *et al.*, 1998).

La respuesta hiperpolarizante a la luz se inicia por la absorción de la radiación electromagnética por el fotopigmento en la membrana de los segmentos externos. El fotopigmento consta de la proteína opsina y de retinal, un derivado de la vitamina A. La absorción de luz provoca un cambio de conformación en el retinal de modo que activa a la opsina (fenómeno conocido tradicionalmente como "*blanqueamiento*"). El blanqueamiento del



fotopigmento estimula a una proteína G denominada transducina en la membrana del disco que, a su vez, activa al enzima fosfodiesterasa que degrada el cGMP presente en el citoplasma en la oscuridad. La disminución del cGMP provoca el cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  y la hiperpolarización de la membrana (Fig. 14) (Bear *et al.*, 1998).

Mientras los canales están abiertos (oscuridad), los terminales axónicos de los fotorreceptores liberan glutamato. Cuando se cierran en respuesta a la luz, cesa la liberación de glutamato.

Los fotopigmentos de conos y bastones no son iguales. El fotopigmento de los bastones se denomina rodopsina y se diferencia de los presentes en los conos en que éstos necesitan mayor cantidad de energía para blanquearse. Por otra parte, los conos presentan diferentes tipos de opsinas, lo que les hace sensibles a diferentes longitudes de onda de la luz. Así, en la retina de los mamíferos se encuentran conos “azules” porque su pigmento se excita de forma máxima con luz de 430 nm de longitud de onda, conos “verdes” cuyo pigmento se excita al máximo con luz de 530 nm y, en primates, conos “rojos”, activados de forma máxima por luz de 560 nm de longitud de onda (Bear *et al.*, 1998).

La rodopsina de los bastones se activa con un solo fotón, por ello, los bastones son los responsables de la visión en condiciones de escasez de luz (*visión escotópica*). Los fotopigmentos de los conos necesitan mayor intensidad lumínica y permiten la visión en color (*visión fotópica*).

### 2.3.- CÉLULAS BIPOLARES ON Y OFF

Como se acaba de describir, el fotorreceptor se hiperpolariza en respuesta a la luz, con lo que cesa la liberación de glutamato. Las células bipolares pueden responder de dos formas, con una hiperpolarización o con una despolarización de su membrana. La célula bipolar que se hiperpolariza al cesar la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores se denomina **célula bipolar OFF**, mientras que la que se despolariza en las mismas condiciones se denomina **célula bipolar ON** (Werbling y Dowling, 1969; Werbling, 1991) (Fig. 15).

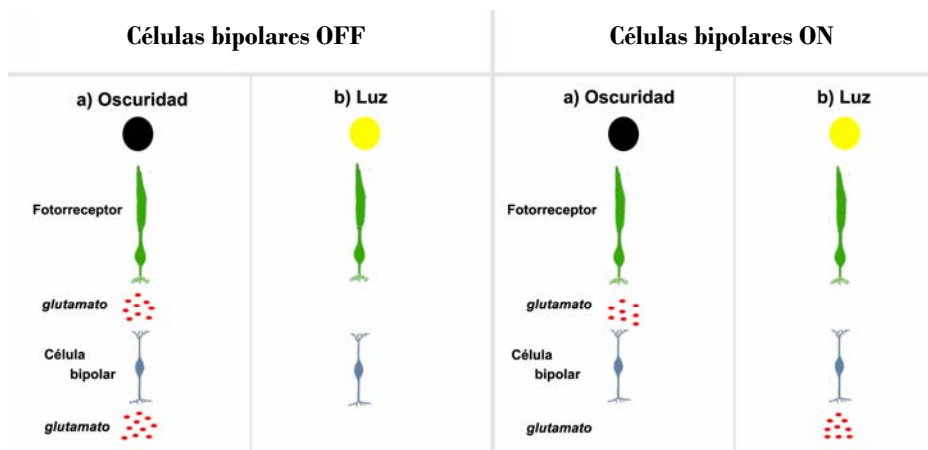


Figura 15: Esquema del funcionamiento de las células bipolares OFF y ON.





Las células bipolares OFF dan lugar a lo que se conoce como *vía OFF* en el procesamiento visual, gracias a la cual se detectan imágenes oscuras sobre fondos claros. Por su parte, las células bipolares ON dan lugar a la *vía ON*, mediante la cual se detectan imágenes claras sobre fondos oscuros (Kolb, 2003).

Dentro de las células bipolares que hacen sinapsis con conos las hay tanto de tipo ON como de tipo OFF. En cuanto al único tipo de célula bipolar que hace sinapsis con bastones, las células bipolares de bastón, son siempre células de tipo ON (Boycott y Wässle, 1991).

Todas las células bipolares de tipo OFF presentan sus terminales axónicos en la mitad externa (escleral) de la CPI, mientras que las células bipolares ON presentan todos sus terminales axónicos en la mitad interna (vitreal) de la CPI. Por este motivo, a la CPI se la subdivide en dos capas: *subcapa OFF* (externa) y *subcapa ON* (interna) (Nelson *et al.*, 1978; Peichl y Wässle, 1981; Boycott y Wässle, 1991; Ghosh *et al.*, 2004) (Fig. 5).

#### 2.4.- CÉLULAS GANGLIONARES ON Y OFF

La distinción ON-OFF se mantiene en el relevo de información entre las células bipolares y las células ganglionares. Así, las células bipolares OFF excitan a células ganglionares OFF, mientras que las células bipolares ON excitan ganglionares ON, a excepción de las células bipolares de bastón que, a pesar de corresponder al tipo ON, no hacen relevo directamente con las células ganglionares, sino que lo hacen a través de las células amacrinas (Kolb *et al.*, 2000).

La respuesta al estímulo luminoso es diferente entre las células ganglionares ON y OFF. Así, en presencia de un estímulo luminoso, la célula ganglionar ON se despolariza y envía potenciales de acción durante el tiempo que dura el estímulo (Fig. 16). Por el contrario, la célula ganglionar OFF se hiperpolariza y deja de emitir potenciales de acción. Tan pronto como el estímulo luminoso desaparece, la célula ganglionar OFF se despolariza y emite nuevamente potenciales de acción (Kolb *et al.*, 2000) (Fig. 16).

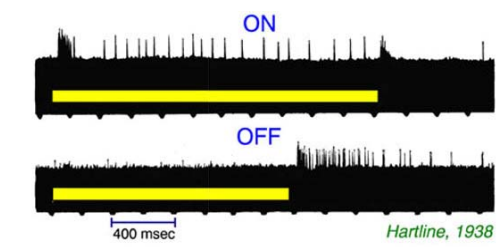


Figura 16: Respuesta de las células ganglionares ON y OFF (Modificado de Kolb *et al.*, 2000).

#### 2.5.- VÍAS TRANSVERSALES EN EL PROCESAMIENTO DE LA SEÑAL VISUAL

##### 2.5.1.- Células horizontales

Las células horizontales reciben sinapsis de fotorreceptores y envían información visual de retorno a los mismos por medio de sinapsis entre ambos tipos neuronales. Las sinapsis con conos potencian el contraste cromático (Kolb *et al.*, 2000). No es conocido el papel funcional de las sinapsis entre células horizontales y bastones (Kolb *et al.*, 2000).



Las células horizontales también ejercen influencia sobre las células bipolares, la cual también tiene como objetivo favorecer el contraste (Kolb *et al.*, 2000).

### 2.5.2.- Células amacrinas

Las células amacrinas no reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con las células ganglionares y retroalimentando a las células bipolares. Por tanto, forman la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna (Kolb *et al.*, 2000).

Las células amacrinas están relacionadas con la integración, modulación e interposición de un dominio temporal al mensaje visual entregado a las células ganglionares (Kolb *et al.*, 2000). En la retina de los vertebrados, la mayoría de las células amacrinas son neuronas inhibitorias y contienen como neurotransmisores GABA o glicina (Kolb *et al.*, 2000).

### 2.6.- ELECTRORRETINOGRAMA DE CAMPO LLENO

El electrorretinograma (ERG) se puede definir como el “registro de superficie de los cambios de potencial de las células de la retina al ser estimuladas por la luz” (Varela, 2002). Una de sus aplicaciones es el estudio y diagnóstico de las degeneraciones de la retina.

En el **ERG de campo lleno** se registra la actividad eléctrica de la retina en su conjunto, para lo cual, la iluminación debe ser homogénea en toda la superficie de la retina (Marmor *et al.*, 2004). La función resultante es la integral de todos los cambios de potencial que se producen en los diferentes tipos celulares al ser la retina estimulada por los haces luminosos.

Para la obtención de este ERG se dispone un electrodo de registro en la superficie corneal (o bien en la conjuntiva ocular) y otro de referencia en la proximidad de la órbita (o en la boca) (Varela, 2002; Marmor *et al.*, 2004) (Fig. 17). Además, un tercer electrodo, denominado “de tierra”, se emplaza en cualquier punto del sujeto (normalmente en la frente o la oreja en caso de pacientes humanos, o en la base de la cola cuando se trata de animales de experimentación) (Varela, 2002; Marmor *et al.*, 2004) (Fig. 17).



Figura 17: Tipos y emplazamiento de los diferentes electrodos en el ERG de campo lleno.

En un trazado electrorretinográfico simple pueden distinguirse dos ondas: la **onda a** y la **onda b**. Se define la onda a como el primer potencial negativo que se registra después del estímulo y la onda b como el potencial positivo que sigue a la onda a (Varela, 2002) (Fig. 18).



Es necesario subrayar que el ERG de campo lleno no proporciona información topográfica sobre la localización de los posibles déficits retinianos y una lesión puntual es poco probable que haga disminuir sustancialmente la respuesta lumínica (Lam, 2005). En estos casos son útiles otros tipos de ERG, como el focal o el multifocal (Lam, 2005).

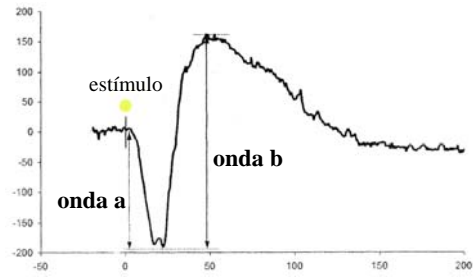


Figura 18: Ejemplo de trazado electroretinográfico (Modificado de Lam, 2005).

### 2.6.1.- Respuestas estándar en el ERG de campo lleno y origen fisiológico

Un electroretinograma estándar debe incluir cinco trazados (Fig. 19). En condiciones escotópicas (ojo adaptado a la oscuridad) debe registrarse la sensibilidad de bastones, la respuesta mixta de conos y bastones y los potenciales oscilatorios; en tanto que en condiciones fotópicas (ojo adaptado a una luz de fondo) se registran la respuesta de conos y la respuesta a estímulos repetidos (flicker) (Marmor *et al.*, 2004; Lam, 2005).

En el ERG de campo lleno estándar, el estímulo luminoso es un flash de luz blanca y la

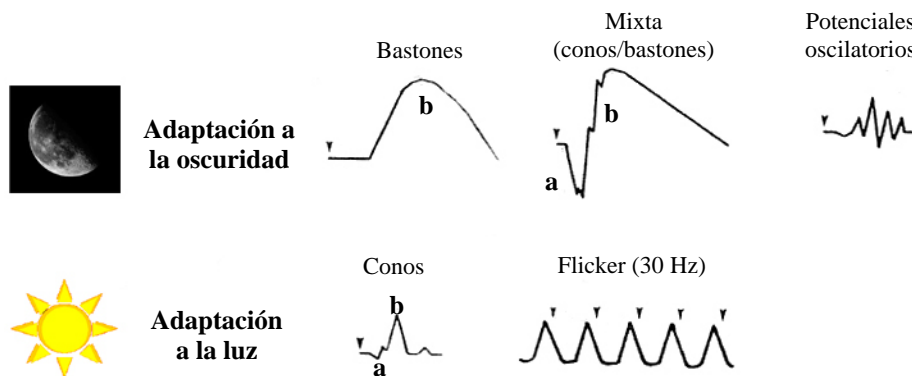


Figura 19: Trazados del ERG estándar (Modificado de Marmor *et al.*, 2004).

intensidad de este estímulo varía en función del trazado que se pretenda registrar; asimismo, en la iluminación de fondo para los registros en condiciones fotópicas también se emplea luz blanca (Marmor *et al.*, 2004; Lam, 2005).

En cada registro, debe medirse la amplitud máxima de cada onda y el tiempo que transcurre desde la aplicación del estímulo luminoso hasta el valor mínimo (onda a) o máximo (onda b) (**tiempo implícito**) (Marmor *et al.*, 2004; Lam, 2005) (Figs. 20-24).

#### 2.6.1.1.- Sensibilidad de bastones

La respuesta escotópica de bastones en el ERG de mamíferos tiene una onda b prominente, pero no onda a (Lam, 2005). Esto es debido a que la respuesta eléctrica de los bastones frente al débil estímulo es demasiado pequeña para ser detectada; sin embargo, esta



señal de los bastones es amplificada del orden de cien veces por las células bipolares ON (despolarizantes) específicas de bastones de la retina interna (Falk, 1988; Lam, 2005) (Fig. 20).

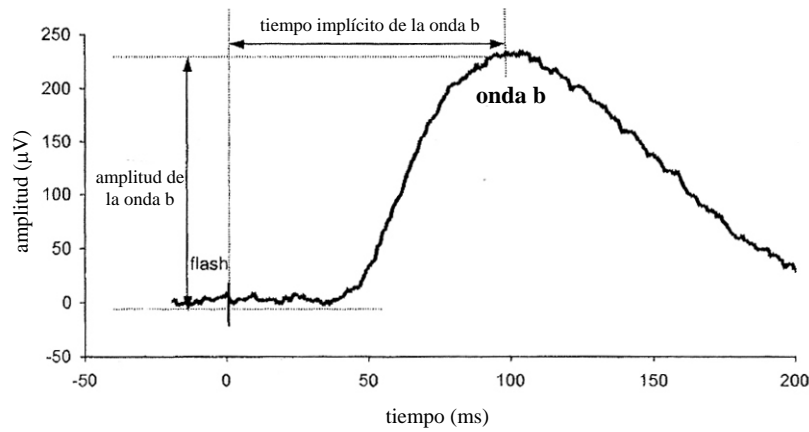


Figura 20: Registro de la respuesta escotópica de bastones (Modificado de Lam, 2005).

### 2.6.1.2.- Respuesta mixta máxima de conos y bastones

La respuesta escotópica combinada de conos y bastones tiene ondas a y b prominentes (Fig. 21). La onda a es debida a la actividad de los fotorreceptores y está directamente relacionada con la actividad eléctrica generada por la cascada de fototransducción (Penn y Hagins, 1969; Pugh y Lamb 1993; Qiu *et al.*, 2002; Lam, 2005). Así, los 14-20 ms iniciales de la respuesta se deben esencialmente a la actividad de los fotorreceptores sin que haya, virtualmente, contribución por parte de la retina interna (Jamison *et al.*, 2001; Lam, 2005).

La onda b se debe primariamente a la actividad de las células bipolares ON (despolarizantes), la cual provoca una liberación inducida por la luz de potasio que, a su vez,

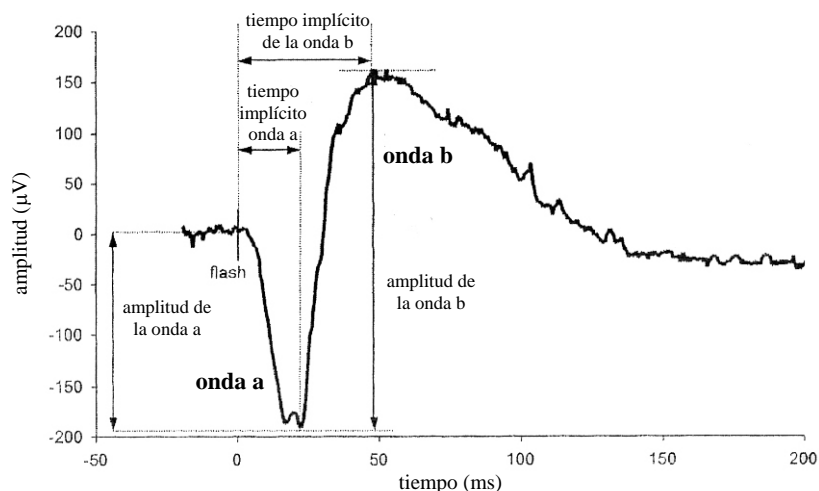
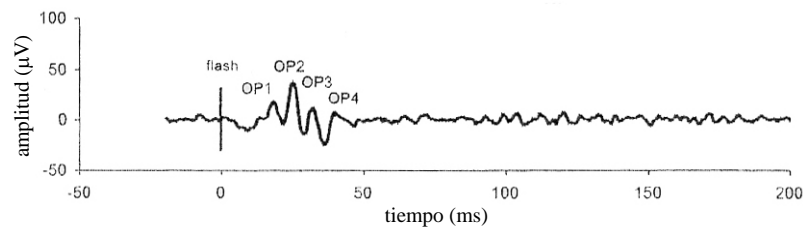


Figura 21: Registro de la respuesta mixta máxima de conos y bastones (Modificado de Lam, 2005).

causa la despolarización de las células de Müller, lo que se traduce en un potencial corneal positivo (Müller y Dowling, 1970; Newman y Odette, 1984; Stockton y Slaughter, 1989; Guervich y Slaughter, 1993; Lam, 2005).

### **2.6.1.3.– Potenciales oscilatorios**

Los potenciales oscilatorios consisten normalmente en tres *wavelets*<sup>1</sup> mayores seguidos por uno más pequeño (Fig. 22). Los *wavelets* se designan en orden de aparición como OP1, OP2, OP3 y así sucesivamente (Lam, 2005) (Fig. 22).



**Figura 22: Registro de los potenciales oscilatorios** (Modificado de Lam, 2005).

Los potenciales oscilatorios tienen un origen fisiológico diferente al de las ondas a y b (Wachmeister, 1980, 1981; Lam, 2005). Los potenciales oscilatorios se deben tanto a la actividad generada por el sistema de bastones como a la generada por el sistema de conos y pueden ser registrados tanto en condiciones escotópicas como fotópicas; si bien suelen obtenerse filtrando los componentes de baja frecuencia (generados en fotorreceptores y células bipolares) en el registro de la respuesta mixta máxima de conos y bastones (Speros y Price, 1981; Li y Yuan 1990; de la Villa y Blanco, 2004; Lam, 2005).

Como origen de los potenciales oscilatorios se ha propuesto la actividad de circuitos inhibitorios retroalimentados en la CPI, aunque parece que un mismo mecanismo no puede aplicarse a todos los potenciales oscilatorios (Lam, 2005). OP1 y OP2 parecen estar mediados fundamentalmente por el sistema de conos, mientras que OP3 y OP4 lo estarían por el de bastones; si bien, esto no explica el hecho de que los potenciales oscilatorios puedan registrarse en todas las condiciones (Janaky *et al.*, 1996; Rousseau y Lachapelle, 1999). En cuanto al origen celular, los potenciales oscilatorios son generados probablemente por las células amacrinas y ganglionares, aunque la contribución de estas últimas no está bien establecida y es motivo de controversia entre diferentes autores (Wachmeister, 1998; de la Villa y Blanco, 2004; Lam, 2005). Por último, conviene indicar que los primeros *wavelets* parecen estar relacionados con la vía ON, mientras que los últimos lo estarían con la vía OFF (Wachmeister, 1998; Lam, 2005).

---

<sup>1</sup> **Wavelet:** un wavelet es un tipo de función matemática usada para dividir una función dada en diferentes componentes.



### 2.6.1.4.– Respuesta de conos

La respuesta de conos fotópica tiene ondas a y b diferenciables (Fig. 23). La fase inicial de la onda a es debida a la actividad eléctrica generada por la fototransducción en los conos (Whitten y Brown, 1973; Brown *et al.*, 1990; Hood y Birch, 1993, 1995; Lam, 2005). Además, la onda a fotópica recibe una contribución significativa de la actividad post-sináptica de los conos, estando su amplitud influida por la actividad del resto de la retina, incluyendo a las células bipolares OFF (hiperpolarizantes) (Bush y Sieving, 1994; Lam, 2005).

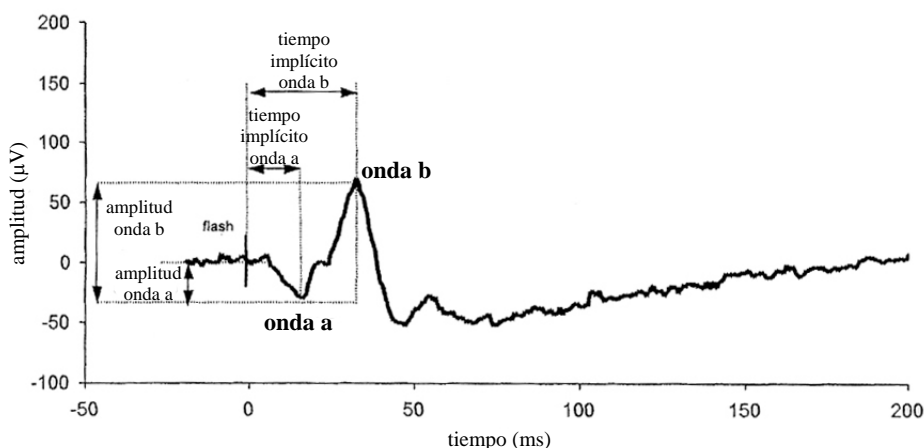


Figura 23: Registro de la respuesta de conos fotópica (flash simple) (Modificado de Lam, 2005).

La onda b fotópica no se debe sólo a la actividad de las células bipolares ON despolarizantes, sino que también está modelada por la actividad de las células bipolares OFF hiperpolarizantes y las células horizontales (Sieving *et al.*, 1994; Lam, 2005). Así, las células bipolares ON contribuyen positivamente a la amplitud de la onda b, pero las células bipolares OFF ejercen el efecto contrario y limitan dicha amplitud (Sieving *et al.*, 1994; Lam, 2005).

### 2.6.1.5.– Respuesta a estímulos repetidos (flicker) de 20Hz

La respuesta fotópica de conos flicker (20Hz) consiste en ondas b debidas a la actividad de la retina interna en respuesta a la actividad de los conos, si bien la contribución directa de

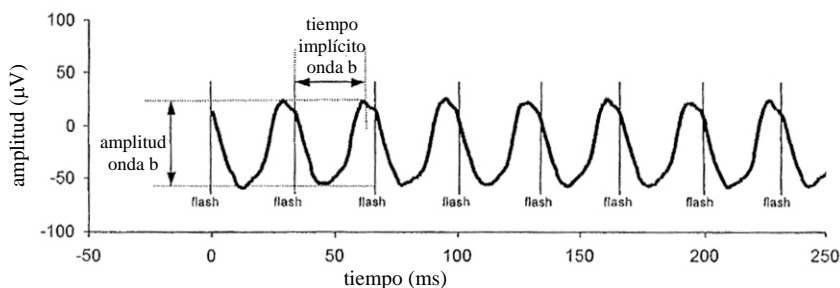


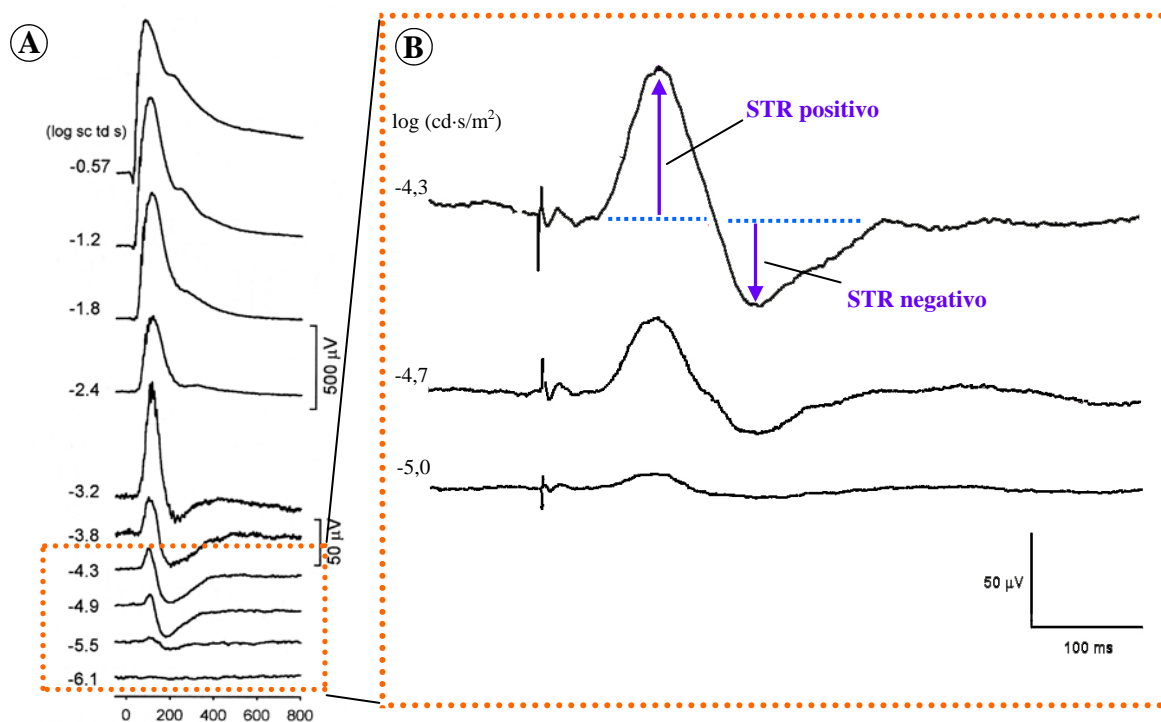
Figura 24: Registro de la respuesta de conos fotópica (flicker, 20Hz) (Modificado de Lam, 2005).

éstos es muy pequeña (Kondo y Sieving 2001, 2002; Lam, 2005) (Fig. 24). Las ondas b del estímulo flicker están compuestas de componentes electroretinográficos ON y OFF, de tal manera que se cancelan parcialmente unos a otros (Kondo y Sieving 2001, 2002; Lam, 2005).

### 2.6.2.- Respuesta escotópica umbral.

Además de los cinco trazados estándar anteriores, es posible registrar la denominada respuesta escotópica umbral (STR; *scotopic threshold response*). En humanos, al emplear estímulos luminosos muy débiles en condiciones escotópicas es posible registrar un pequeño potencial de polaridad opuesta a la onda b (Sieving *et al.*, 1986; Sieving y Nino, 1988; Sieving y Wakabayashi, 1991; Bush y Remé, 1992, Saszik *et al.*, 2002; Lam, 2005). Esta respuesta negativa es más sensible que la onda b escotópica y se satura con niveles lumínicos más bajos (Saszik *et al.*, 2002). El STR se genera más vitrealmente en la retina que la onda b y se piensa que refleja la actividad de células amacrinas y ganglionares (Sieving *et al.*, 1986; Frishman y Steinberg, 1989a, 1989b; Naarendorp y Sieving, 1991, Saszik *et al.*, 2002).

El STR murino está compuesto por componentes tanto positivos como negativos y, como en humanos, es la parte más sensible del ERG (Saszik *et al.*, 2002) (Fig. 25). Se origina en la región vitreal de la retina y es muy sensible a la iluminación de fondo (Saszik *et al.*, 2001, 2002).



**Figura 25: Respuesta escotópica umbral (STR).** A. Trazados electroretinográficos en respuesta a estímulos de intensidad creciente en condiciones escotópicas. El recuadro señala la parte del STR (*modificado de Saszik et al., 2002*). B. Ampliación de los trazados electroretinográficos correspondientes al STR (*elaboración propia*).





### 3.- EL RATÓN MUTANTE *PCD/PCD*

La mutación *pcd* (*Purkinje Cell Degeneration*) surgió espontáneamente en la estirpe C57BR/cdJ del ratón (*Mus musculus* L. 1758) en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EEUU). El gen mutante también se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen *et al.*, 1976). Esta mutación original se denomina *pcd<sup>1J</sup>*. Además, se han identificado 7 alelos mutantes *pcd* adicionales que, por convención, se denominan *pcd<sup>2J</sup>*, *pcd<sup>3J</sup>*, ..., *pcd<sup>8J</sup>* (Fernández-González *et al.*, 2002; Wang y Morgan, 2007) (Tabla 1).

Nombre del alelo	Origen	Mutación genética en <i>nna1</i>
<i>Agtppbp1<sup>pcd-1J</sup></i>	Espontáneo	Desconocida (posiblemente en la región reguladora)
<i>Agtppbp1<sup>pcd-2J</sup></i>	Espontáneo	Inserción entre los exones 14 y 15
<i>Agtppbp1<sup>pcd-3J</sup></i>	Espontáneo	Delección de los exones 7, 8 y 9.
<i>Agtppbp1<sup>pcd-4J</sup></i>	Químicamente inducido	Desconocida
<i>Agtppbp1<sup>pcd-5J</sup></i>	Espontáneo	Inserción de un codo de ácido aspártico en el exón 18.
<i>Agtppbp1<sup>pcd-6J</sup></i>	Químicamente inducido	Desconocida
<i>Agtppbp1<sup>pcd-7J</sup></i>	Espontáneo	Desconocida
<i>Agtppbp1<sup>pcd-8J</sup></i>	Transgénico (aleatorio, disrupción génica)	Desconocida

**Tabla 1:** Características de los alelos *pcd* (Modificado de Wang y Morgan, 2007).

La mutación *pcd* está descrita como autosómica recesiva (Mullen *et al.*, 1976; Mullen, 1977). El locus *pcd* fue mapeado en un intervalo de 5 cM<sup>1</sup> (centiMorgan) en el cromosoma 13 (Campbell y Hess, 1996). Posteriormente, la región *pcd* candidata fue refinada a un segmento genómico de 0.61 ± 0.33 Mb (Fernández-González *et al.*, 2002). De los genes identificados en esta región, uno, *nna1* se expresa en el cerebelo (Harris *et al.*, 2000).

El gen murino *nna1* contiene 25 exones (Wang y Morgan, 2007) (Fig. 26). Se ha comprobado una drástica reducción, o alteraciones importantes, en los ARNm de *nna1* en ratones adultos homocigotos *pcd<sup>1J</sup>*, *pcd<sup>2J</sup>* y *pcd<sup>3J</sup>* (Fernández-González *et al.*, 2002). Además, se conoce la mutación génica en el gen *nna1* en diversos alelos *pcd* (Wang y Morgan, 2007) (Fig. 26).

La mayor parte de la bibliografía existente acerca del fenotipo *pcd* hace referencia a estudios centrados en los efectos producidos por el alelo *pcd<sup>1J</sup>*. Para llevar a cabo este trabajo de Tesis, hemos utilizado ratones portadores de este alelo.

En los animales *pcd<sup>1J</sup>*, el ARNm de *nna1* es indetectable en todos los tejidos examinados, excepto en los testículos, si bien en esta ubicación el nivel de expresión encontrado presentaba una reducción de 20 veces el valor del silvestre (Wang y Morgan, 2007). Además, se puede confirmar la ausencia de la proteína Nna1 en extractos de cerebro y testículos de los ratones *pcd<sup>1J</sup>* (Chakrabarti *et al.*, 2006; Wang y Morgan, 2007) (Fig. 27). En el *pcd<sup>1J</sup>* se sospecha que la mutación se

<sup>1</sup> **CentiMorgan (cM):** un cM es la unidad de los mapas genéticos de ligamiento realizados por recombinación en eucariotas diploides. Equivale a un 1% de frecuencia de recombinación, o lo que es lo mismo, a 1 unidad de mapa.



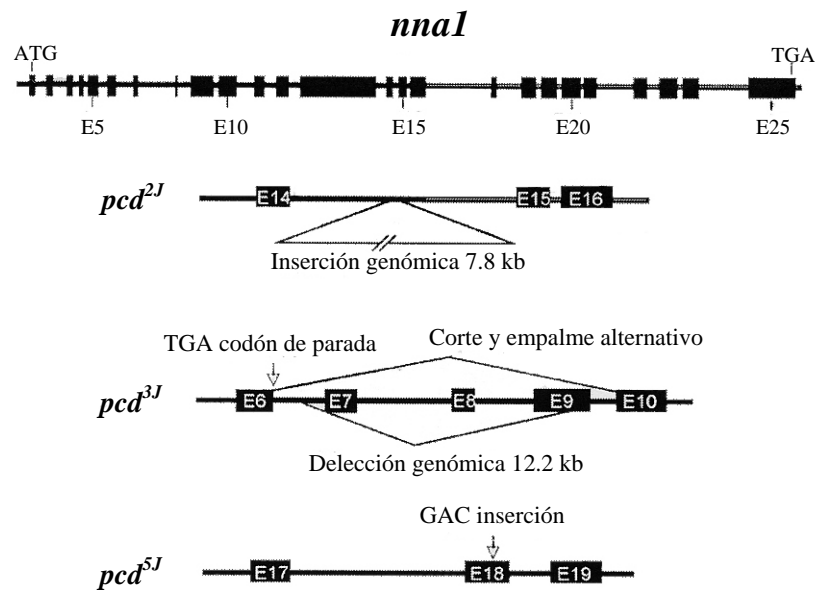


Figura 26: Gen *nna1* y modificaciones conocidas en diferentes alelos *pcd* (Modificado de Wang y Morgan, 2007).

localiza en la región reguladora de *nna1* (Wang y Morgan, 2007).

El gen *nna1* se expresa a lo largo del cerebro, la retina y los testículos. Se detecta una notable expresión del ARNm de *nna1* en las células de Purkinje y de los granos del cerebelo, en las células mitrales del bulbo olfatorio, en neuronas del tálamo y en los fotorreceptores de la retina. Todos estos tipos celulares degeneran en el *pcd* (Harris *et al.*, 2000; Fernández-González *et al.*, 2002; Wang y Morgan, 2007).

Sin embargo, también se demuestra una prominente expresión de *nna1* en los ganglios de la raíz dorsal y en las neuronas CA3 del hipocampo; lugares donde no se han descrito déficits en los ratones *pcd* (Wang y Morgan, 2007). Además, *nna1* también se expresa en tejidos y órganos no-neurales, como el corazón, el músculo esquelético y el riñón (Harris *et al.*, 2000). Por último, la expresión de *nna1* es elevada en muchas regiones del sistema nervioso central y periférico durante la etapa embrionaria (Wang y Morgan, 2007). Por tanto, *nna1* se expresa ampliamente antes de que los déficits comportamentales o anatómicos sean evidentes en los ratones *pcd* y en regiones que no muestran anomalías en el *pcd* (Wang y Morgan, 2007).

El gen *nna1* se descubrió en primer lugar por rastreo diferencial del ARNm aislado de la médula espinal de ratones sometidos a aplastamiento o seccionamiento del nervio ciático (Harris *et al.*, 2000). El transcrito de *nna1* se induce rápidamente en las neuronas motoras afectadas, aunque la duración de la expresión es diferente entre los dos modelos experimentales. Los niveles del

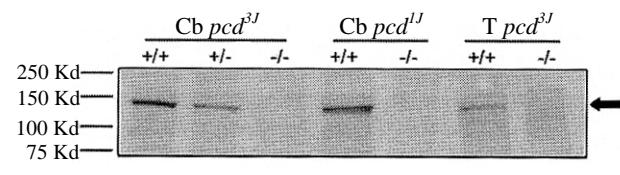
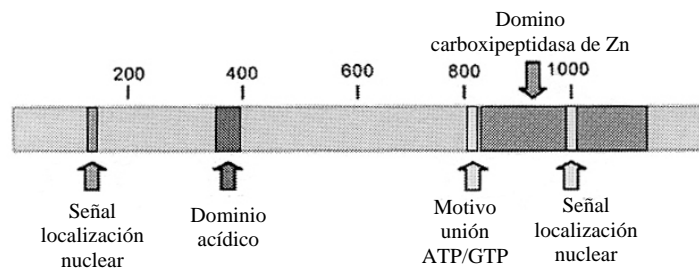


Figura 27: Western blot para la proteína Nna1 en ratones *pcd<sup>2J</sup>* y *pcd<sup>3J</sup>*. Cb: cerebelo, T: testículo (Modificado de Wang y Morgan, 2007).



transcrito de *nna1* disminuyen en las neuronas motoras en 1-2 semanas tras el aplastamiento del nervio, coincidiendo con la reinervación de la diana (Harris *et al.*, 2000). Por contra, si la reinervación se bloquea por corte o ligamiento del nervio, *nna1* se expresa continuamente en las neuronas motoras (Harris *et al.*, 2000). Por ello, se pensó que la función de Nna1 era relevante en el proceso de crecimiento axónico y/o en respuesta a la axotomía. Además, el hecho de que *nna1* se exprese ampliamente en el sistema nervioso en desarrollo al tiempo de la axogénesis añadía argumentos a favor de que la función de Nna1 tiene que ver de algún modo con este proceso (Wang y Morgan, 2007). Sin embargo, la función de Nna1 sigue sin estar clara ya que estas primeras pistas sobre su papel biológico no explican el análisis estructural y su distribución.

La proteína Nna1 contiene varios dominios y motivos que podrían revelar algunos aspectos sobre su función (Fig. 28). El dominio más prominente muestra una gran homología de secuencia con un gran número de carboxipeptidasas de zinc (Wang y Morgan, 2007). Además, algunos



**Figura 28: Organización y función potencial de los dominios de la proteína Nna1** (Modificado de Wang y Morgan, 2007).

aminoácidos esenciales para la función catalítica están conservados entre Nna1 y otras carboxipeptidasas (Wang y Morgan, 2007). Por ello, se sospecha que Nna1 es una carboxipeptidasa de zinc, aunque no hay que olvidar que las aminopeptidasas, desuccinilasas y deacilasas también tienen dominios de unión a zinc (Makarova y Grishin, 1999; Harris *et al.*, 2000; Wang y Morgan, 2007). Las carboxipeptidasas tienen importantes funciones en el sistema nervioso. Su función es eliminar un aminoácido C-terminal (frecuentemente, un residuo de arginina) de péptidos y proteínas secretadas, activando o inhibiendo de este modo a estas moléculas (Wang y Morgan, 2007).

Además del dominio carboxipeptidasa, Nna1 contiene dos señales potenciales de localización nuclear (Wang y Morgan, 2007) (Fig. 28). Se ha comprobado la localización de Nna1 en el núcleo y el citoplasma (Harris *et al.*, 2000). Una de las señales de localización nuclear se ubica dentro del dominio carboxipeptidasa, por lo que su funcionalidad está en duda. La segunda señal se localiza hacia el extremo-N de Nna1 (Wang y Morgan, 2007).

Nna1 y sus ortólogos en mamíferos, peces y anfibios contienen un sitio consenso de unión a ATP/GTP (Wang y Morgan, 2007) (Fig. 28). Además, el gen fue nombrado en base a la presencia de este motivo (*agtpbp1*: *ATP/GTP binding protein 1*). Sin embargo, algunas ambigüedades en la secuencia entre diversas especies y el hecho de que ningún ortólogo invertebrado posea este motivo ponen en duda que sea realmente un sitio funcional de unión a ATP/GTP (Wang y Morgan, 2007).



Por último, aunque no es un motivo funcional en sí mismo, Nna1 contiene una región rica en aminoácidos ácidos (Wang y Morgan, 2007) (Fig. 28). Tales regiones son comunes en dominios de transactivación de factores de transcripción y también pueden mediar interacciones proteína-proteína (Wang y Morgan, 2007).

### 3.1.- FENOTIPO PCD/PCD

El cerebelo del ratón mutante *pcd/pcd* adulto, sus bulbos olfatorios y el del encéfalo son significativamente menores que los de sus hermanos normales (Alcalde, 2003). El peso corporal de los individuos mutantes es también inferior al de los normales, incluso antes de los primeros síntomas neurológicos (Mullen *et al.*, 1976) (Fig. 29).

La expresión del alelo mutado *pcd<sup>fJ</sup>* origina la degeneración post-natal selectiva de casi la totalidad de las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mullen *et al.*, 1976; Fernández-González *et al.*, 2002). La expresión fenotípica de la mutación *pcd/pcd* se manifiesta como una ataxia moderada a partir de la tercera semana de vida post-natal, lo que permite diferenciar a simple vista a los individuos normales de los mutantes (Mullen *et al.*, 1976). Los ratones mutantes *pcd/pcd* presentan, además, una degeneración selectiva de las células mitrales del bulbo olfatorio principal. También degenera el tracto olfatorio lateral, que contiene los axones de las células mitrales (Mullen *et al.*, 1976; Bartolomei y Greer, 1998; Wang y Morgan, 2007), gran parte de la comisura anterior (Baker y Greer, 1990; Wang y Morgan, 2007) y zonas selectivas de los núcleos talámicos (O'Gorman, 1985; O'Gorman y Sidman, 1985; Wang y Morgan, 2007). Además, en estos mutantes existe una degeneración lenta y progresiva de los fotorreceptores de la retina similar a una retinosis pigmentaria (Mullen y LaVail, 1975; LaVail *et al.*, 1982; Wang y Morgan, 2007). Los individuos mutantes machos no son fértiles, presentando esperma anormal, escaso y carente de movilidad. Las hembras mutantes son fértiles, aunque conciben poca descendencia y tienen dificultades para su cría (Mullen *et al.*, 1976; Handel y Dawson, 1981; Wang y Morgan, 2007).

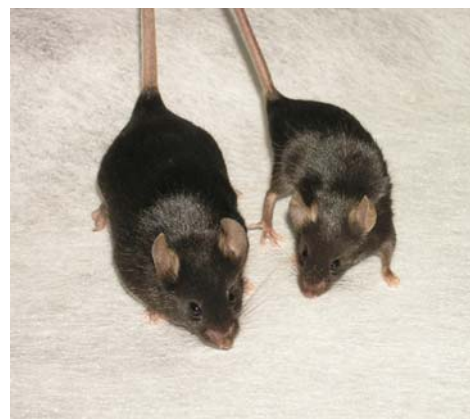


Figura 29: ratón mutante *pcd/pcd* (derecha) y control (izquierda).

#### 3.1.1.- Efectos de la mutación *pcd/pcd* en la retina

En el ratón mutante *pcd/pcd*, el curso de la degeneración retiniana es prolongado en el tiempo (LaVail *et al.*, 1982). A la edad de 18 días post-natales (p18), las retinas de los ratones con genotipo *pcd/pcd* parecen normales, aunque se observa un ligero aumento del número de núcleos de fotorreceptores picnóticos con respecto al silvestre (Blanks *et al.*, 1982). A p25, la muerte de los fotorreceptores ya es patente y se aprecia desorganización en los segmentos externos de



los fotorreceptores (Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982). La pérdida de células fotorreceptoras transcurre a lo largo de un año aproximadamente, acortándose progresivamente los segmentos externos de los fotorreceptores que se mantienen. Los segmentos externos de los bastones van aumentando su diámetro ligeramente, lo que puede deberse a la reducción del número de segmentos externos vecinos como resultado de la muerte celular descrita (LaVail *et al.*, 1982).

El patrón temporal de la degeneración de las células fotorreceptoras en el ratón *pcd/pcd* es distinto para conos y bastones (LaVail *et al.*, 1982). Los bastones degeneran considerablemente más rápido que los conos. A los 3 meses de edad permanecen el 55% de los bastones, el 20% a los 6,5 meses y tan sólo queda el 12% a los 10 meses de edad. Los conos presentan una degeneración menor: el 75% de los conos está presente a los 3 meses de edad y el 50% a los 5,5 meses. Este valor se mantiene estable hasta los 10 meses de edad. En animales más viejos (16 meses), aún permanece el 43% de los conos (LaVail *et al.*, 1982).

Existen diferencias en la tasa de degeneración de los fotorreceptores en distintas regiones del ojo (LaVail *et al.*, 1982). Las diferencias pueden apreciarse tanto en regiones centrales como periféricas de la retina, pero son más marcadas desde la zona central a la periferia, existiendo un gradiente de degeneración centro-periférico influido por las diferencias en la degeneración entre las mitades dorsal y ventral (LaVail y Batelle, 1975; Carter-Dawson *et al.*, 1978; LaVail *et al.*, 1982).

## **3.2.- OTROS MODELOS DE DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES**

### **3.2.1.- Los ratones *rd***

Hay varios modelos de ratones *rd* (*retinal degeneration*), siendo los más estudiados los denominados *rd1* y *rd10*.

#### **3.2.1.1.- Retinal degeneration 1 (*rd1*)**

Los ratones mutantes *rd1* sufren una mutación en la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa de GMPc. La pérdida de fotorreceptores empieza muy pronto (en la segunda semana de vida) y evoluciona muy rápidamente, observándose una degeneración casi completa de la CNE tras tres semanas de vida del animal (Farber y Lolley, 1974; Bowes *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2002).

En la retina de los ratones *rd1*, los árboles dendríticos y los terminales axónicos de las células bipolares de bastón se desarrollan de forma anormal (Strettoi y Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2002; 2003). Además, se ha comprobado que el número de células bipolares de bastón disminuye notablemente (Strettoi y Pignatelli, 2000). Por su parte, las dendritas de las células bipolares de cono sufren un proceso de retracción progresiva, mientras que sus plexos en la CPE se vuelven cada vez más discontinuos (Strettoi *et al.*, 2003).

También se observan alteraciones en los complejos axónicos, las terminales dendríticas y hasta en el propio soma de las células horizontales y, al igual que ocurre con las células bipolares de bastón, se aprecia una disminución del número de estas células en las retinas *rd1* (Strettoi y Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003).



Por contra, en las células amacrinas la morfología general y el número están más preservados que en las células bipolares y horizontales (Strettoi *et al.*, 2002).

En cuanto a las células gliales, sólo se ha descrito el incremento de inmunorreactividad a GFAP por parte de las células de Müller (Strettoi *et al.*, 2003). No se tienen datos acerca de las poblaciones de astrocitos y otras células gliales en este modelo.

En el electroretinograma, las principales diferencias observadas consisten en una reducción general de la amplitud asociada a cambios en la forma de las ondas (Strettoi *et al.*, 2003).

### **3.2.1.2.– Retinal degeneration 10 (rd10)**

Los ratones *rd10* presentan una mutación en el gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa de bastones. La pérdida de fotorreceptores empieza pronto (alrededor de las tres semanas de edad) y avanza rápidamente, aunque a menor ritmo que en el ratón *rd1*. El progreso de la degeneración conduce a la pérdida de la CNE (Chang *et al.*, 2002).

### **3.2.2.– La rata RCS**

Las ratas *RCS* (*Royal College of Surgeons*; Bourne *et al.*, 1938) presentan una degeneración hereditaria de los fotorreceptores en los primeros tres meses de vida (Dowling y Sidman, 1962). Al examinar el fondo de ojo se observan depósitos de pigmento en la retina, disminución del tamaño de los vasos retinianos y palidez del disco óptico (Herron *et al.*, 1974; Szamier y Berson, 1977; Pagon, 1988; Milam y Li, 1995).

Además de la degeneración de los fotorreceptores, con la edad se produce una degeneración retrógrada acompañada de la muerte de las células ganglionares. Esta degeneración puede ser debida a la compresión, estrangulamiento y sección de los axones de estas células por los vasos retinianos, que se encuentran traccionados hacia las capas más externas de la retina por un fenómeno de neo-vascularización retiniana (Villegas-Pérez *et al.*, 1998).

### **3.2.3.– La rata *p23H***

Estas ratas presentan una mutación en el gen de la rodopsina llamada *p23H*, de la cual reciben el nombre (Cuenca *et al.*, 2004).

En la rata *p23H*, la degeneración en la CNE empieza pronto. Así, a los 21 días de edad ya hay una pérdida sustancial de bastones. Tras 40 días de vida del animal, tan sólo se observan 3-4 estratos de fotorreceptores en la zona central de la retina, quedando reducidos a una monocapa en la zona media-periférica. A p270 (día post-natal 270) sólo se pueden reconocer algunos fotorreceptores esporádicos (Cuenca *et al.*, 2004).

Las células bipolares de bastón sufren pronto profundas alteraciones. Las arborizaciones dendríticas son cada vez menos profusas y los terminales axónicos más cortos, con



varicosidades terminales cada vez más pequeñas (Cuenca *et al.*, 2004). Además, en el transcurso de la degeneración pueden observarse procesos dendríticos discurriendo anómalamente por la CPE, así como ramificaciones axonales penetrando de manera atípica en la CCG (Cuenca *et al.*, 2004).

#### **4.- RETINOSIS PIGMENTARIA HUMANA**

El término Retinosis Pigmentaria (RP) hace referencia a un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que causan la degeneración de las células fotorreceptoras de la retina humana (Gutiérrez-Torre, 1995; Milam *et al.*, 1998). La RP es la distrofia retiniana más frecuente, siendo la cuarta causa de ceguera en el mundo (Gutiérrez-Torre, 1995).

Los primeros síntomas de la enfermedad, que aparecen con frecuencia en la adolescencia, son la perturbación de la visión nocturna y la pérdida del campo visual medio-periférico (Milam *et al.*, 1998). En la RP, la disfunción de los bastones, que suele preceder a la de los conos, causa la temprana pérdida de visión nocturna. La pérdida visual causada por la muerte de los bastones y conos suele comenzar con frecuencia en la zona medio-periférica; posteriormente, la muerte de los fotorreceptores ubicados en la mácula reduce la visión central. La pérdida de los bastones y los conos está acompañada por cambios en las células del EP, las neuronas de la retina interna, los vasos sanguíneos y la glía (Milam *et al.*, 1998).

##### **4.1.- GENÉTICA DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA**

La RP es genéticamente heterogénea, mostrando herencia autosómica dominante, autosómica recesiva (la más frecuente) o rasgos de herencia recesiva ligada al cromosoma X (Dryja, 1992; Gutiérrez-Torre, 1995; Milam *et al.*, 1998). La RP también forma parte de más de 30 síndromes, en la mayoría de los cuales presenta herencia autosómica recesiva. El síndrome mejor conocido es el síndrome de Usher (Pagon, 1993).

Se han propuesto varios genes candidatos para la RP que, de forma general, se pueden clasificar en función del tipo de proteínas que codifican (Valverde, 2001):

- *Proteínas de la cascada de transducción:* como, por ejemplo, los genes de la fosfodiesterasa de bastones (Danciger *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995; Valverde *et al.*, 1996), la *rodopsina* (Dryja y Berson, 1995; Dryja y Li, 1995) y de la subunidad  $\alpha$  del canal de GMPc del segmento externo de los bastones (Dryja *et al.*, 1995).
- *Factores de transcripción:* dentro de este grupo se encuentran el gen *nrl* (neuroretina-linked leucine zipper) y el gen *crx* (cone-rod homeobox) (Valverde, 2001).
- *Proteínas estructurales:* destaca en este apartado el gen de la RDS/periferina que codifica una proteína estructural presente en los segmentos externos de los conos y bastones (Nichols *et al.*, 1993; Weleber *et al.*, 1993; Wells *et al.*, 1993).





- *Proteínas de transporte*: como las pertenecientes a la familia Rab, RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator), PDE6D (subunidad  $\delta$  de la fosfodiesterasa) y Rep-1 (Rab escort protein) (Valverde, 2001).
- *Proteínas de función desconocida*: engloba genes que, por su localización en el genoma, se consideran genes candidatos, aunque no se conoce con exactitud su función (Valverde, 2001).

## **4.2.- HISTOPATOLOGÍA DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA HUMANA**

Aunque la RP es una enfermedad caracterizada por la pérdida de los fotorreceptores, también es posible observar variaciones en otras poblaciones celulares de la retina, así como en el EP y el sistema vascular.

### **4.2.1.- Epitelio pigmentario**

Tras la muerte de todos los fotorreceptores, las células del EP, a menudo, migran a regiones perivasculares dentro de la retina interna (Milam *et al.*, 1998).

### **4.2.2.- Fotorreceptores**

El primero y más notable cambio en las retinas con RP es la degeneración y desaparición de las células fotorreceptoras. La degeneración afecta primero y es más acusada en los bastones; si bien, posteriormente, arrastra también a los conos (Gutiérrez-Torre, 1995; Milam *et al.*, 1998). La apoptosis parece ser el mecanismo de muerte de los fotorreceptores en las retinas de pacientes afectados de RP (Li y Milam, 1995; Milam *et al.*, 1998).

La muerte de los bastones comienza normalmente en la retina medio-periférica (ecuatorial) y progresa con el tiempo hasta afectar a la mácula y la retina más periférica (Milam *et al.*, 1998). Las causas de estas diferencias regionales en la muerte de los bastones son desconocidas, aunque se apunta a los niveles de incidencia lumínica en las distintas partes del ojo, especialmente en las retinosis provocadas por ciertas mutaciones en el gen de la rodopsina (Heckenlively *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1994; Milam *et al.*, 1998). El cambio histopatológico más temprano en los bastones es el acortamiento de sus segmentos externos (Milam *et al.*, 1998). También se ha comprobado que los bastones periféricos en las retinas con RP presentan largos procesos neuríticos parecidos a axones que proyectan, de manera anómala, a distancias considerables dentro de la retina interna (Li *et al.*, 1995a; Milam *et al.*, 1996, 1998). Estas neuritas evitan las dendritas de las células bipolares de bastón y de las células horizontales, las dianas normales, y están estrechamente asociadas con procesos hipertróficos de células de Müller que han sufrido gliosis reactiva (Milam *et al.*, 1998).



La muerte de los bastones en las retinas con RP está normalmente acompañada de cambios en los conos vecinos, incluyendo acortamiento de los segmentos externos, densificación citoplásmica, elongación axonal y, por último, la muerte (Li *et al.*, 1994; Milam *et al.*, 1996, 1998). La degeneración de los conos ocurre en todas las formas genéticas de RP (Milam *et al.*, 1998). Los conos no parecen presentar brotes de neuritas como los bastones, aunque los axones de algunos conos periféricos están elongados y parecen proyectar a la CPI (Li *et al.*, 1994; Milam *et al.*, 1996, 1998).

#### **4.2.3.- Neuronas de la CNI**

En las células horizontales se han encontrado procesos anormales que, surgiendo del soma, se extienden apicalmente para terminar cerca de la MLE (Fariss *et al.*, 2000).

También se han encontrado procesos aberrantes en las células amacrinas, tanto gabaérgicas como glicinérgicas (Fariss *et al.*, 2000). Así, se pueden observar procesos positivos a GABA originados en las células amacrinas entre las células ganglionares y las fibras del nervio óptico y extendiéndose anómalamente a través de la CPE y la CNE, llegando incluso a la MLE (Fariss *et al.*, 2000). Además, un porcentaje elevado de células amacrinas es contactado por las neuritas originadas en los bastones (Fariss *et al.*, 2000).

#### **4.2.4.- Neuronas de la CCG**

Se ha comprobado la reducción significativa de células ganglionares en las máculas de pacientes con RP (Stone *et al.*, 1992). La pérdida de células ganglionares es paralela a la pérdida de los fotorreceptores y es más severa en las formas de RP con herencia ligada al sexo o autosómica dominante (Stone *et al.*, 1992).

#### **4.2.5.- Células gliales**

Los cambios en las células de Müller incluyen hipertrofia celular y migración del núcleo desde la CNI a la retina externa (Milam *et al.*, 1998). También se ha comprobado que las células de Müller contienen elevadas cantidades de GFAP (Milam *et al.*, 1998). En la RP avanzada, los fotorreceptores degenerados son reemplazados por una capa de gruesos procesos de células de Müller (Milam *et al.*, 1998).

Se han encontrado astrocitos inmunorreactivos a GFAP rodeando a vasos sanguíneos en la CFNO (Gariano *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996). También se ha comprobado que en estadios finales de la RP, cuando se ha producido una muerte significativa de células ganglionares, muchos de los núcleos de la retina interna pertenecen a astrocitos que han sufrido hiperplasia reactiva (Milam *et al.*, 1998).





En humanos, no se conoce el papel exacto que juegan las células microgliales en la retina de pacientes con RP; si bien se ha verificado la presencia de microglía activa en la CNI, CNE y en el espacio subretinal en la zona donde se produce la muerte de los fotorreceptores (Milam *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2003).

#### **4.2.6.- Vasos sanguíneos de la retina**

Un rasgo distintivo de la RP es la atenuación de los vasos sanguíneos de la retina (Milam *et al.*, 1998). Se ha observado que las células del EP que han migrado a la retina interna provocan alteraciones notables en los vasos sanguíneos de la misma (Li *et al.*, 1995b; Milam *et al.*, 1998). Una capa de matriz extracelular se deposita normalmente entre las células del EP emigrantes y las células endoteliales de la pared de vénulas y capilares (Li *et al.*, 1995b). Estos gruesos depósitos perivasculares, particularmente aquellos ricos en lípidos hidrofóbicos y elastina, pueden comprometer el flujo de nutrientes desde la luz del vaso a las neuronas de la retina interna (Milam *et al.*, 1998).

#### **4.2.7.- Otras alteraciones**

Además de las alteraciones descritas anteriormente, también se ha comprobado la formación de drusas en la CNO (Milam *et al.*, 1998), la formación de membranas epiretinianas (Szamier, 1981) y la pérdida de la corio-capilar en las regiones de retina que han perdido los fotorreceptores (Li *et al.*, 1995b).



# Justificación y objetivos

---



## **1.- UN MODELO ANIMAL DE RETINOSIS PIGMENTARIA**

Como se menciona en el capítulo de Introducción, la retinosis pigmentaria es una causa importante de ceguera en el mundo. Desgraciadamente, todavía no existe un tratamiento eficaz para esta enfermedad, aunque se están ensayando estrategias bastante prometedoras, como la terapia génica y el trasplante de células madre o progenitores neuronales.

Para ensayar estas estrategias y otras de carácter farmacológico es necesario emplear modelos animales. La experimentación en animales, siempre conforme a la normativa vigente en cuanto al manejo y cuidado de animales de laboratorio, constituye la denominada *fase 1* de cualquier investigación que tenga como objetivo final la aplicación de una determinada terapia o fármaco en humanos. Por ello, es imprescindible caracterizar modelos animales que reproduzcan lo más fielmente posible el proceso fisiológico o patológico objeto de estudio.

Los datos obtenidos directamente del procesamiento histológico de ojos procedentes de autopsias de pacientes afectados de retinosis pigmentaria son de una utilidad de indudable valor. Sin embargo, la mayoría de este material procede de individuos de edad más o menos avanzada, cuando la degeneración de la retina y la pérdida de función visual son muy acusadas, por lo que es difícil caracterizar de este modo los estadios tempranos y el progreso inicial de las alteraciones de la retina.

Además, en los modelos animales se pueden llevar a cabo ensayos que son imposibles de realizar en humanos. Algunos ejemplos de estas técnicas son la inyección de BrdU (bromodeoxiuridina) para establecer la existencia de divisiones celulares y localizar las células marcadas procedentes de estas divisiones, la inyección de trazadores para el estudio de las vías nerviosas y sus conexiones, la obtención de secciones gruesas de tejido fresco para técnicas de estimulación, registro y marcaje unicelular, etc.

## **2.- EL RATÓN *PCD/PCD* COMO MODELO DE RETINOSIS PIGMENTARIA**

Hasta la fecha, se han utilizado varias especies de animales como modelos de retinosis pigmentaria. Entre estos modelos cabe destacar a los antes mencionados ratones *rd* y las ratas *RCS* y *p23H*.

Estos modelos tienen en común la pérdida más o menos rápida de las células fotorreceptoras de la retina. Sin embargo, y a pesar de la heterogeneidad característica de esta enfermedad, en muchos casos de retinosis pigmentaria, la pérdida de células fotorreceptoras empieza en torno a la adolescencia y progresa lentamente, pudiendo transcurrir muchos años hasta la ceguera total del individuo (Gutiérrez-Torre, 1995; Milam *et al.*, 1998). En este sentido, los modelos animales mencionados anteriormente no se ajustan al curso temporal de estas retinosis pigmentarias.

En el ratón mutante *pcd/pcd* se ha descrito que la pérdida de fotorreceptores de la retina empieza a hacerse evidente tras varios meses de vida del animal y progresa con lentitud, de tal forma que todavía es posible observar células fotorreceptoras en animales viejos. Por tanto, la degeneración que se produce en las retinas de animales *pcd/pcd* transcurre de modo semejante



al patrón temporal observado en un gran número de retinosis pigmentarias humanas. Por este motivo, se ha escogido este animal como modelo de esta distrofia retiniana.

### 3.- LÍNEAS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS

Como ya se ha mencionado, se están ensayando estrategias terapéuticas como la terapia génica y el trasplante de células madre. No obstante, no es suficiente con obtener nuevas células fotorreceptoras. También es imprescindible conocer cómo se ven afectadas las siguientes células en la transmisión de la información visual recogida por conos y bastones, esto es, células bipolares y células ganglionares, así como de las neuronas encargadas de modular esta información, como son las células horizontales y las amacrinas. Estudios recientes han descrito pequeñas variaciones morfológicas en las células bipolares y horizontales en algunos modelos de RP (Hanitzsch *et al.*, 1998; Strettoi y Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2002, 2003; Cuenca *et al.*, 2004). Un propósito del presente trabajo es aportar nuevos datos acerca de las posibles variaciones estructurales de las distintas poblaciones neuronales y las capas que ocupan en un modelo donde las células fotorreceptoras se pierden lentamente.

Además, es importante conocer el papel que juegan las distintas poblaciones gliales durante el proceso degenerativo. Hay evidencias de que los diferentes tipos gliales de la retina participan activamente, pudiendo favorecer la degeneración al impedir que las neuronas dañadas que sobreviven puedan regenerar (Giulian y Baker, 1986; Thanos *et al.*, 1995). No obstante, todavía queda mucho por saber sobre los efectos concretos del concurso de la glía y del modo de llevarse a cabo. Particularmente llamativo es el caso de las células microgliales, ya que se ha comprobado que pueden producir y liberar tanto factores positivos como negativos para la supervivencia neuronal y que la participación de unos u otros parece depender de interacciones entre estas células y otros tipos gliales, especialmente células de Müller (Harada *et al.*, 2002). En esta Tesis se llevan a cabo estudios estructurales de las poblaciones gliales que pueden añadir más datos sobre el papel de la glía en los procesos de degeneración de la retina.

Por último, en el que se podría denominar tercer bloque dentro de esta Tesis tras el estudio de las poblaciones neuronales y gliales, se analizará la funcionalidad de la retina, con objeto de establecer la relación entre los cambios estructurales y la pérdida de función visual.

### 4.- OBJETIVOS

#### 4.1.- Poblaciones neuronales

- Establecer el patrón de muerte de los fotorreceptores, apoptosis o necrosis, en las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd*.
- Analizar las características morfológicas e inmunocitoquímicas de las poblaciones de interneuronas y neuronas de proyección en las retinas de los ratones *pcd/pcd*.
- Determinar si en las retinas *pcd/pcd* se producen cambios en la expresión de proteínas vinculadas a la sinapsis.

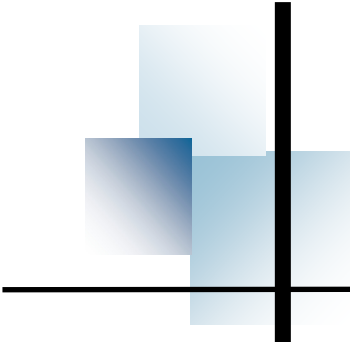


#### 4.2.- Poblaciones gliales

- Estudiar la respuesta de las células de Müller y astrocitos a medida que progresa la degeneración de las células fotorreceptoras en los ratones *pcd/pcd*. Analizar la posible proliferación de estas células, la formación de prolongaciones reactivas y la variación en la expresión de proteínas y de enzimas.
- Analizar la respuesta de las células microgliales en toda la extensión de la retina durante la degeneración de los fotorreceptores. Se estudiará la proliferación celular, los procesos de migración y la modificación de su morfología.

#### 4.3.- Fisiología

- Análisis de las respuestas eléctricas en las retinas de animales *pcd/pcd* y silvestres.



# Material y métodos

---

## **1.- ANIMALES**

La especie de experimentación empleada en el presente trabajo ha sido el ratón (*Mus musculus*, L. 1758). Hemos empleado la línea C57BL/DBA portadora de la mutación *pcd<sup>1J</sup>* en homocigosis como objeto de estudio y la misma línea sin mutación, que sirvió como control.

En este estudio se han empleado 10 animales mutantes y 10 silvestres para cada estadio de edad considerado, que fueron 45, 60, 90, 180 y 270 días de edad.

Los ratones se mantuvieron hasta su sacrificio en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperíodo artificial de 12/12 horas.

Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según las líneas establecidas en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC) y la Legislación Española (REAL DECRETO 1201/2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

## **2.- GENOTIPADO DE LOS ANIMALES**

El genotipo homocigoto *pcd/pcd* es fácil de reconocer por la ataxia acusada que sufren los ratones portadores. De hecho, el test de la varilla rotatoria (*rotarod*) fue empleado durante mucho tiempo para determinar dichos homocigotos. En este test, se dispone al animal sobre un eje al que se imprimen diferentes velocidades de giro. Los animales *pcd/pcd* permanecen muy poco tiempo sobre el eje y caen a velocidades bajas de giro, mientras que el resto es capaz de permanecer sobre el eje más tiempo y con velocidades de giro más altas. Sin embargo, con este test es muy difícil distinguir entre los genotipos silvestres y los heterocigotos para la mutación. Esta distinción es importante no sólo para el estudio comparativo entre animales *pcd/pcd* y silvestres, sino también para poder efectuar los cruces adecuados (puesto que, como se anota en apartados anteriores, los machos *pcd/pcd* son estériles y los apareamientos deben hacerse entre individuos *+/pcd*).

Para solventar este problema en la identificación, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto una estrategia basada en la amplificación de los marcadores moleculares adecuados gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Valero, 2006). Debido a que la mutación *pcd<sup>1J</sup>* se encuentra en una región reguladora todavía desconocida (ver Introducción), se tuvo que recurrir a la amplificación de microsatélites<sup>1</sup> para el genotipado (Valero, 2006). Para ello, en primer lugar, se cruzaron ratones macho de la estirpe C57BL/6J heterocigotos para la mutación *pcd<sup>1J</sup>* con hembras silvestres de la estirpe DBA/2J. Mediante estos cruces se consiguió asociar el alelo *pcd<sup>1J</sup>* al fondo genético de la línea C57BL/6J y el alelo normal al fondo genético de la estirpe DBA/2J. Se eligió como marcador la región portadora de microsatélites D13Mit250, la cual,

---

<sup>1</sup> **Microsatélites:** Los microsatélites consisten en nucleótidos repetidos en tándem y son abundantes en el genoma eucariota. Son muy polimórficos, por lo que se utilizan como marcadores moleculares intraespecíficos.



aunque está presente en ambas líneas, tiene un tamaño en pares de bases diferente en las dos estirpes, con lo que se consiguen productos de amplificación diferenciables al separarlos mediante electroforesis en gel. Por último, se comprobó que la región elegida estuviese lo suficientemente cerca del gen portador de la mutación *pcd*, para poder aceptar la hipótesis de una transmisión ligada entre el gen *pcd* y la región portadora del microsatélite (Valero, 2006).

## 2.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN

- *Seccionar una porción de cola a cada animal.* Para esta operación se deben utilizar pinzas y tijeras estériles. El tejido se conserva a  $-20^{\circ}$  en eppendorfs autoclavados hasta el siguiente paso.
- *Incubar el tejido con el tampón de lisis.* Este tampón está compuesto por Fornace (90%)(Cuadro 1), sodiododecilsulfato (SDS; 0,9%), EDTA (20mM) y proteinasa K (2mg/5ml). Se añaden 700  $\mu$ l a cada eppendorf y se deja incubar toda la noche a  $55^{\circ}$ .
- *Centrifugar a velocidad máxima durante 30 s.*
- *Añadir acetato sódico 3M.* 70  $\mu$ l de acetato por eppendorf.
- *Extracción con fenol.* Para ello se añaden 770  $\mu$ l de fenol en cada eppendorf y se agita hasta que el contenido queda homogéneo.
- *Centrifugar a velocidad máxima durante 5 min.* Así se separan claramente dos fases. El ADN y los lípidos quedarán en la fase orgánica (superior). Tras centrifugar, se toman 450  $\mu$ l de la fase orgánica y se deposita en nuevos eppendorfs estériles. La fase inferior se desecha.
- *Extracción con cloroformo.* Para ello se añaden 450  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo e isoamiloalcohol (3-metil-1-butanol). La relación entre estos dos componentes es de 24:1 (cloroformo:isoamiloalcohol). El contenido de los eppendorfs se agita hasta quedar homogéneo.
- *Centrifugar a velocidad máxima durante 5 min.* Con ello aparecen nuevamente dos fases. Tras centrifugar, se toman 400  $\mu$ l de la fase superior y se depositan en nuevos eppendorfs estériles.
- *Precipitar con etanol absoluto.* Se añade 1 ml de etanol y se mezcla ligeramente. El ADN con el etanol se deja un mínimo de 2 h a  $-20^{\circ}$ .
- *Centrifugar a 8000 rpm.* Durante 15 min a  $4^{\circ}$ . Comprobar que se ha formado precipitado.
- *Desechar el etanol absoluto.* Con cuidado de no arrastrar el precipitado.
- *Añadir etanol de  $70^{\circ}$ .* Se añaden 600  $\mu$ l a cada eppendorf y se deja durante 5 min.
- *Centrifugar a 13200 rpm.* 5 min a temperatura ambiente.

• Sacarosa:	8,56% (p/v)
• Tris-HCl 1M pH 8.0:	5% (v/v)
• KCl 1M:	2,5% (p/v)
• MgCl <sub>2</sub> 1M:	0,5% (p/v)
• H <sub>2</sub> O dest.	

Cuadro 1: Fornace



- *Secar el precipitado.* El etanol se desecha con especial atención de no eliminar nada del precipitado. Tras retirar el etanol, se mantiene durante 15 min a temperatura ambiente.
- *Resuspender el precipitado.* Se añaden 200 µl de H<sub>2</sub>O estéril.
- *Congelar.* Mantener a -20°C hasta el momento de la PCR.

## 2.2.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez obtenido el ADN de cada ratón, se procede a llevar a cabo la PCR. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

- *Preparar la mezcla de reacción junto con el ADN* (Cuadro 2). En el control negativo de la reacción se sustituye el ADN por un volumen igual de H<sub>2</sub>O estéril.
- *Reacción.* Se introducen los eppendorfs en el termociclador y se lleva a cabo la reacción usando el ciclo adecuado (Cuadro 3).
- *Conservación.* El producto de la PCR se mantiene a -20°C.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores tienen la denominación D13Mit250 (Genotek) y sus secuencias son:

5`- ACA CTC ATT TCC ATG CAC GA -3`.

5`- AGG TCC TCA AAT CTC ACA AGT AGG -3`.

• H <sub>2</sub> O estéril:	11.9 µl.
• Tampón 10x:	2.0 µl.
• Dimetilsulfóxido (DMSO):	1.0 µl.
• MgCl <sub>2</sub> 25 mM:	1.2 µl.
• dNTP, 10mM:	0.4 µl.
• Oligonucleótido I:	0.5 µl.
• Oligonucleótido II:	0.5 µl.
• Taq polimerasa 5 U/µl:	0.5 µl.
• ADN	2.0 µl.

**Cuadro 2:** Mezcla de reacción de la PCR (20 µl x muestra).

Ciclo		
94º	5 minutos	
94º	1 minuto	X 40
54º	1 minuto	
72º	1,5 minuto	
72º	10 minutos	
4º	∞	

**Cuadro 3:** Ciclos de la PCR.

## 2.3.- ELECTROFORESIS

Los fragmentos genómicos obtenidos por PCR se separan mediante una electroforesis en gel de agarosa. El protocolo seguido consta de los siguientes pasos:

- *Preparar el gel de agarosa.* En este trabajo se ha usado agarosa especial MS8 (cat. 8065, Pronadisa) al 3% en TBE 0.5X (Cuadro 4). Una vez disuelta la agarosa, se calienta la mezcla en un microondas hasta que se vuelve transparente y se añaden 2 µl de bromuro de etidio. Se agita, se vierte en el molde de electroforesis (al que se le han colocado con anterioridad los topes y los

• Tris-base:	0,54 % (p/v).
• Ácido bórico:	0,27% (p/v).
• EDTA 0.5M pH 8:	0,02% (v/v).
• H <sub>2</sub> O destilada.	

**Cuadro 4:** TBE 0,5%.



peines) y se deja solidificar a 4°C entre 30 y 45 min.

- *Preparar la cubeta de electroforesis.* El molde con el gel solidificado se coloca en su ubicación dentro de la cubeta de electroforesis, se retiran los topes y los peines y se añade TBE 0.5X hasta el nivel de la cubeta.
- *Cargar el ADN.* Se mezclan 10 µl de ADN con 2 µl de tampón de carga (Cuadro 5) y se añade en los pocillos que deja el peine en el gel. Se reserva un pocillo para el marcador de peso molecular (pBR322 DNA-Msp I Digest; New England BioLabs), el cual se mezcla también con 2 µl de tampón de carga.
- *Correr a 120-130V.*
- *Visualización de las bandas.* Para ello se emplea una lámpara de ultravioleta.
- *Fotografía.* El gel se fotografía en una cámara especial de ultravioleta.

Si el animal es homocigoto silvestre se observa una banda de unas 116 pares de bases (pb), mientras que si el animal es homocigoto para la mutación *pcd* aparece una banda de unas 130 pb (Fig. 30). Cuando el animal es heterocigoto se observan dos bandas, una de 116 pb y otra de 130 pb (Fig. 30).

• Sacarosa:	40% (p/v)
• EDTA 0.5M pH 8:	2% (v/v)
• TAE 50X*:	2% (v/v)
• Azul de bromofenol:	0.25% (v/v)
• Xylen cianol:	0.25% (v/v)
• H <sub>2</sub> O destilada.	
* <b>TAE 50x:</b>	
• Tris-base:	24,2% (p/v)
• Ácido acético glacial	5,71% (v/v)
• EDTA 0.5M pH 8.0:	10,0% (v/v)
• H <sub>2</sub> O destilada.	

Cuadro 5: Tampón de carga.

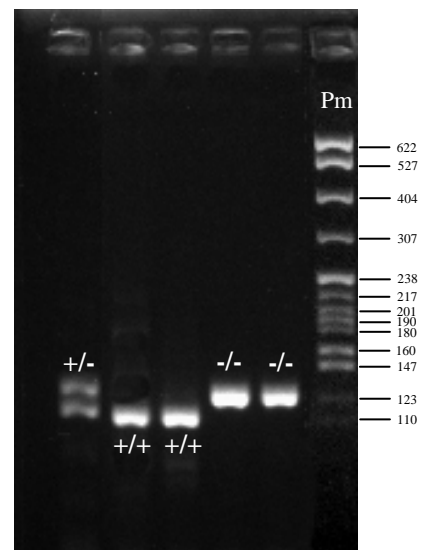


Figura 30: Genotipaje. +/- heterocigoto; +/+ homocigoto silvestre; -/- homocigoto *pcd/pcd*; Pm: marcador de pb.

### 3.- FIJACIÓN, ENCASTRADO Y CORTE

#### 3.1.- FIJACIÓN

- *Anestesia del animal.* Los animales se anestesian con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 5% (10 µl/g de peso del animal).
- *Perfusión.* En primer lugar, se inyectan intracardiácamente 90 µl de heparina, tras lo cual se introduce la cánula en el cono aórtico y se comienza la perfusión, primero con solución salina al 0.9% y posteriormente con la mezcla fijadora (Cuadro 6).

• Paraformaldehido:	4 % (p/v)
• Ácido pícrico:	0,2% (v/v)
• Tampón fosfato (TF) 0.1M pH 7.4	

Cuadro 6: Mezcla fijadora.

- *Extracción de los ojos del animal fijado.*
- *Post-fijación.* Los ojos se someten a una post-fijación por inmersión durante 2-4 h a temperatura ambiente. Para ello, se utiliza el mismo fijador empleado en la perfusión.
- *Lavados.* El tejido se lava varias veces con tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (TF), para eliminar los restos de fijador.

### 3.2.- ENCASTRADO

- *Crioprotección del tejido.* Las muestras se congelan para ser cortadas con un criostato. Antes de poder congelar el tejido es necesario crioprotegerlo, para evitar que se formen en su interior cristales de hielo que pueden dañarlo. Para ello, las muestras se sumergen en una disolución de sacarosa al 30% en TF durante una noche a 4°C.
- *Encastrado.* Una vez crioprotegidas, las muestras se embeben en un medio apropiado para la congelación (Tissue-Tek® O.C.T.™, Sakura).
- *Congelación.* Para llevar a cabo la congelación, se usa nitrógeno líquido.
- *Conservación.* Las muestras así encastradas se mantienen a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.3.- CORTE

Se obtuvieron secciones seriadas de 14-16 µm de grosor usando un criostato (Leyca). Las secciones se adhirieron a portaobjetos gelatinizados y fueron conservadas a -20°C hasta su uso.

## 4.- HISTOLOGÍA BÁSICA

### 4.1.- TINCIÓN NUCLEAR

Los primeros datos de las retinas estudiadas se obtuvieron empleando dos fluorocromos que se unen al ADN: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y yoduro de propidio (IP) (Tabla 2).

Con esta técnica determinamos la estructura de las capas nucleares de las retinas de los animales silvestres y *pcd/pcd*. Asimismo, la pérdida

Compuesto	λ absorción	λ emisión	Concentración	Procedencia
DAPI	350 nm	470 nm	0,01 %	Sigma
IP	536 nm	623 nm	0,05 %	Sigma

Tabla 2: Tinción nuclear.

de células fotorreceptoras en los ratones *pcd/pcd* a lo largo del intervalo de edades considerado se evaluó mediante el recuento de los núcleos positivos a DAPI o IP en la CNE de la retina de estos animales.



Además, estos marcadores se usaron como contraste nuclear en la técnica de TUNEL y en la técnica inmunohistoquímica.

#### 4.1.1.- Protocolo

- *Secciones.* Las secciones fueron descongeladas y mantenidas a temperatura ambiente durante 1 h.
- *Lavados.* Con TF (3 x 10 min).
- *Eliminación de la autofluorescencia del tejido.*  
Especialmente importante si la fijación se llevó a cabo usando aldehídos. Se bañaron las secciones durante 5 min en borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>) disuelto en TF (5 mg/ml disolución).
- *Lavados.* Con TF (3 x 10 min).
- *Incubación con el marcador.* Disuelto en TF a la concentración estipulada según el compuesto (Tabla 2). Durante 10 min a temperatura ambiente.
- *Lavados.* Con TF (3 x 10 min).
- *Montaje.* Usando un medio con propiedades protectoras de la fluorescencia (Cuadro 7).

• Glicina:	0,42% (p/v)
• NaOH:	0,021% (p/v)
• NaCl:	0,51% (p/v)
• Azida sódica:	0,03% (p/v)
• N-propil galato:	5% (p/v)
• Glicerina:	70% (v/v)
• H <sub>2</sub> O dest.	

**Cuadro 7: Medio de montaje para fluorescencia.**

## 5.- MARCAJE TUNEL

La detección de cuerpos apoptóticos se llevó a cabo usando la técnica de TUNEL (marcaje con dUTP de extremos mellados mediado por la desoxinucleotidil transferasa; *terminal dUDP nick-end labeling*). En la muerte celular apoptótica, el primer evento bioquímico es la rotura del ADN de cadena sencilla, seguido por la abertura del ADN de doble cadena en las regiones entre nucleosomas (Peitch *et al.*, 1993; Oba y Koji, 2000). El marcaje TUNEL es una técnica molecular usada para detectar estas roturas en el ADN. Se basa en la adición repetida de dUTP-biotinado a los extremos 3'-OH generados en el ADN tisular durante la apoptosis. Esta adición la lleva a cabo el enzima desoxinucleotidil-transferasa. Posteriormente, el dUTP se puede localizar gracias a la molécula de biotina conjugada (Oba y Koji, 2000).

### 5.1.- PROTOCOLO

- *Tratamiento previo de las secciones:* con una mezcla de etanol y ácido acético en una proporción de 2:1 durante 5 min.
- *Lavado:* con tampón fosfato salino 0.1M pH 7.4 (TFS). 3 lavados de 10 min.
- *Permeabilizado:* con una solución de Triton X-100 al 0,2% y citrato de sodio al 0.1% durante 15 min.
- *Lavado:* con TFS, 2 lavados de 5 min.

- **Inmersión en tampón TUNEL** (Cuadro 8). Durante 30 min.
- **Incubación:** durante 1h y 30 min con terminal transferasa (800 U/ml)(Roche) y dUTP biotinado (1 mM) (Roche). Ambos componentes se disuelven en tampón TUNEL.
- **Fin de la reacción:** 2 lavados con tampón CSS (*citrato de sodio salino*) durante 10 min (Cuadro 9).
- **Lavado:** primero con TFS (2 lavados de 10 min) y después con TF (2 lavados de 10 min).
- **Revelado:** incubando con estreptoavidina conjugada con la molécula fluorescente cianina (Cy2). La estreptoavidina-Cy2 se disuelve al 0,4% en TF y se lleva a cabo la incubación durante 1 h y 30 min protegiendo a las secciones de la luz.
- **Contraste nuclear:** con yoduro de propidio disuelto al 0,05% en TF durante 10 min.
- **Lavado:** 3 lavados de 10 min con TF.
- **Eliminación de la autofluorescencia del tejido:** tras sumergirlas brevemente en alcohol de 70°, las secciones se bañan durante 3 min en una disolución de sudán negro al 1% (p/v) en una mezcla de etanol-agua (7:3). Posteriormente, las secciones se sumergen de nuevo brevemente en alcohol de 70°.
- **Lavado:** 6 lavados de 10 min con TF.
- **Montaje:** usando un medio con propiedades protectoras de la fluorescencia (Cuadro 7).

• Cacodilato de sodio:	3 % (p/v)
• Cloruro de cobalto:	0,023% (p/v)
• Triton X-100:	0,3 % (p/v)
• Tris-HCl 0,2 M pH 7,2	15 % (v/v)
• H2O destilada.	

**Cuadro 8: Tampón TUNEL.**

• Cloruro de sodio:	0,87 % (p/v)
• Citrato de sodio:	0,44 % (p/v)
• H2O destilada.	

**Cuadro 9: Tampón CSS.**

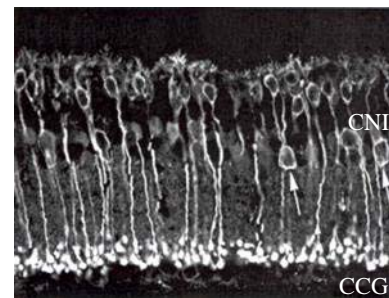
## 6.- INMUNOHISTOQUÍMICA

### 6.1.- MARCADORES NEURONALES

#### 6.1.1.- Proteína quinasa C alpha (PKCα)

Esta proteína pertenece a la gran familia de las *proteína quinasa*, encargadas de la fosforilación de otras proteínas con diversos fines. La proteína quinasa “C” se denomina así por ser dependiente de Ca<sup>2+</sup>.

Las mayores concentraciones de PKC se han localizado en el cerebro, donde, entre otras cosas, fosforila los canales iónicos de las células nerviosas, alterando sus propiedades y, por lo tanto, variando la excitabilidad de la membrana plasmática de las células nerviosas (Alberts *et al.*, 1996).



**Figura 31: Inmunorreactividad a PKCα en la retina del ratón.** (Modificado de Haverkamp y Wässle, 2000).



Tanto en la retina humana como en la del ratón, la isoforma  $\alpha$  de la PKC es un excelente marcador de las células bipolares de bastón, aunque también son inmunorreactivas algunas células amacrinas (Grünert y Martin, 1991; Haverkamp y Wässle, 2000) (Fig. 31).

#### 6.1.2.- Islet1

El factor de transcripción Islet1 pertenece a la familia de proteínas caracterizadas por la presencia del homeodominio LIM. El término LIM hace referencia a las iniciales de los tres grupos prototipos: **Lin-11**, **Isl-1** y **Mec-3** (Freyd *et al.*, 1990; Karlsson *et al.*, 1990). La función exacta de los dominios LIM es todavía desconocida, aunque se sabe que este tipo de moléculas están implicadas en la determinación celular en algunos tipos tisulares (Thor *et al.*, 1991; Ericson *et al.*, 1992; Arenzana, 2006). Además del homeodominio LIM, estas proteínas presentan dos motivos Cys-His repetidos en tándem (Pfaff *et al.*, 1996).

En mamíferos adultos, se ha detectado la presencia de islet1 tanto en el sistema nervioso central como periférico (Thor *et al.*, 1991). En la retina de pollo, la proteína islet1 se considera un marcador específico de las células ganglionares en la CCG (Austin *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 2002), comenzando su expresión en dichas células una vez que éstas han finalizado su migración hasta la superficie vitreal y comienzan su diferenciación (Sakagami *et al.*, 2003). En estadios posteriores, el gen *islet1* se expresa en células amacrinas colinérgicas (Galli-Resta *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2002) y en células bipolares (Fischer *et al.*, 2002).

#### 6.1.3.- RT97

El anticuerpo RT97 se utiliza para marcar una clase de filamentos intermedios, los neurofilamentos. Concretamente, se utiliza en mamíferos para reconocer las subunidades fosforiladas de los neurofilamentos de 200 kDa (Wood y Anderton, 1981). Asimismo, detecta, aunque con menor afinidad, otros neurofilamentos fosforilados de 155 kDa y las marañas de proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer (Anderton *et al.*, 1982, 1983; Ksiezak-Reding *et al.*, 1987; Coleman y Anderton, 1990).

En la retina, el anticuerpo RT97 se ha usado como marcador de los axones de las células ganglionares (Velasco *et al.*, 2000). También se ha descrito marcaje de las células horizontales en la retina de la tenca con este anticuerpo (Velasco *et al.*, 2000).

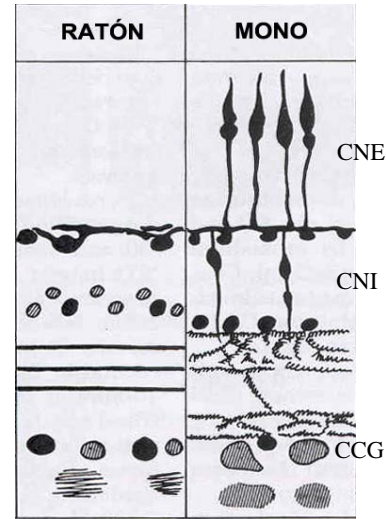
#### 6.1.4.- Calbindina (CB)

Esta proteína fue descrita por primera vez por Wassermann y Taylor, quienes la encontraron en la mucosa intestinal del pollo y la bautizaron con el descriptivo nombre de *proteína ligante de calcio de 28K inducida por vitamina D* (Wassermann y Taylor, 1966). Posteriormente, recibió la denominación actual de calbindina D-28K (Wassermann, 1985).

El papel de esta proteína se relaciona con el transporte y tamponado de iones de calcio, regulando de este modo la concentración y distribución del mismo en el interior celular (Wassermann y Taylor, 1966; Roth *et al.*, 1981).

En la retina del mono, los conos son positivos a CB (excepto en la fovea) y las células horizontales se marcan intensamente. Algunas células amacrinas y bipolares también son inmunorreactivas a CB, así como la mayoría de células ganglionares y la capa de las fibras, que muestran un marcaje intenso. La CPI muestra una inmunotinción difusa (Pochet *et al.*, 1991) (Fig. 32).

El patrón de inmunorreactividad a CB en el ratón es diferente al que se encuentra en la retina de primates (Fig. 32). En la retina del ratón, los fotorreceptores y las células bipolares no presentan inmunorreactividad a CB, pero las células horizontales presentan una fuerte inmunorreactividad a este marcador. También son positivas algunas células amacrinas y ganglionares, así como la capa de las fibras. En la CPI aparecen tres bandas inmunorreactivas (Pochet *et al.*, 1991; Haverkamp y Wässle, 2000).



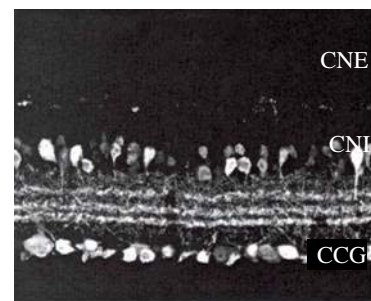
**Figura 32: Patrón de inmunorreactividad a calbindina en el ratón y en el mono.** (Modificado de Pochet *et al.*, 1991).

### 6.1.5.- Calretinina (CR)

Esta proteína se identificó inicialmente en la retina de pollo (Rogers, 1987) y su existencia se demostró con posterioridad en otras regiones del sistema nervioso y en el timo (Andressen *et al.*, 1993; Seto-Oshima, 1994). La CR constituye un sistema tamponador altamente sensible a las bajas concentraciones intracelulares de calcio (Rogers, 1987).

En la retina humana, los conos se marcan débilmente cerca del disco óptico, incrementándose gradualmente la inmunorreactividad radialmente desde el mismo. En la CNI aparecen algunas células bipolares débilmente marcadas y una hilera de células amacrinas intensamente teñidas ubicadas en la parte más vitreal de la capa. También presentan inmunorreactividad a calretinina la CPI, las células ganglionares y la CFNO (Nag y Wadhwa, 1999).

En la retina del ratón son inmunorreactivos a calretinina muchos tipos diferentes de células amacrinas, las células amacrinas desplazadas y posiblemente todas las células ganglionares. De modo similar a lo que sucedía con la calbindina, aparecen marcados tres estratos en la CPI (Haverkamp y Wässle, 2000) (Fig. 33).



**Figura 33: Inmunorreactividad a calretinina en la retina del ratón.** (Modificado de Haverkamp y Wässle, 2000).





### 6.1.6.- Sintaxina

Las sintaxinas han sido caracterizadas como proteínas de anclaje, que se unen a la superficie citoplasmática de la membrana celular y se asocian a varias proteínas involucradas en la exocitosis de vesículas sinápticas para que puedan llevar a cabo su función con eficacia (Bennett *et al.*, 1993; Yamaguchi y Akagawa, 1994; McMahon y Südhof, 1995).

En la retina humana adulta, la sintaxina está presente en ambas capas plexiformes, si bien en la CPE aparece solo como una delgada banda teñida. Además, se observa una débil inmunorreactividad por parte de algunas células amacrinas y de algunos cuerpos celulares de células horizontales próximas a la CPE (Nag y Wadhwa, 2001). El mismo patrón de tinción se observa en la rata (Greenlee *et al.*, 2001).

### 6.1.7.- Sinapsina

Las sinapsinas son fosfoproteínas asociadas a las vesículas sinápticas que regulan la exocitosis de dichas vesículas y que podrían estar involucradas en la sinaptogénesis (Melloni y DeGennaro, 1994; Hosaka y Südhof, 1998).

Tanto en la rata como en el mono, los mayores niveles de expresión se han encontrado en ambas capas plexiformes. En condiciones normales, en la retina de la rata, la inmunorreactividad a sinapsina queda reducida a la CPI, pero en ambientes muy ricos en estímulos también aparece fuerte inmunorreactividad en la CPE (Pinaud *et al.*, 2002, 2003).

### 6.1.8.- Bassoon

Bassoon es una proteína que se localiza en las terminales nerviosas pre-sinápticas, concentrándose en los sitios opuestos a las densidades post-sinápticas (tom Dieck *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 1999). Bassoon ha sido clonado y caracterizado en rata y ratón (tom Dieck *et al.*, 1998), así como en humanos (Winter *et al.*, 1999).

En base a la secuencia de aminoácidos, se ha predicho que la proteína bassoon contiene dos dedos de zinc, tres regiones “hélice enrollada” y dos dominios poli-glutamina (tom Dieck *et al.*, 1998); no obstante, no ha podido ser incluida en ninguna familia de proteínas conocida.

En cuanto a la función de esta proteína, se piensa que interviene en la organización estructural y funcional del ciclo de las vesículas sinápticas y en la disposición del citoesqueleto en el lugar de liberación del neurotransmisor (tom Dieck *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 1999).

En la retina de los vertebrados se ha encontrado una intensa inmunorreactividad a bassoon en ambas capas plexiformes (Brandstätter *et al.*, 1999). En la CPE, bassoon se localiza en las sinapsis “en cinta” formadas por conos y bastones, pero está ausente en los contactos sinápticos basales de los conos. En la CPI, se ha encontrado inmunorreactividad a bassoon en las sinapsis GABAérgicas inhibitorias llevadas a cabo por las células amacrinas; mientras que no se ha demostrado su presencia en las sinapsis “en cinta” efectuadas por las células bipolares (Brandstätter *et al.*, 1999).



## **6.2.- MARCADORES GLIALES**

### **6.2.1.- Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**

La GFAP fue descrita por primera vez en 1971 como el principal componente de los filamentos intermedios en los astrocitos (Eng *et al.*, 1971). Desde entonces se ha encontrado sobre todo en astrocitos (Dahl y Bignami, 1973; Hajós y Kálmán, 1989; Schmidt-Kastner y Szymas, 1990), aunque también se ha detectado en endotelios y glía radial (Dahl y Bignami, 1973; Hajós y Kálmán, 1989; Cardone y Roots, 1990; Monzón-Mayor *et al.*, 1990; Schmidt-Kastner y Szymas, 1990; Velasco, 1992).

En la retina adulta son inmunorreactivos a GFAP los astrocitos, los cuales se encuentran asociados con los vasos a lo largo de toda la CFNO y en la porción más interna de la CPI. También son inmunopositivos los pies vitreales de las células de Müller (Karim *et al.*, 1996). Esta última afirmación es motivo de controversia puesto que algunos autores opinan que, en condiciones normales, las células de Müller del ratón no expresan GFAP, o lo hacen en bajas cantidades (Sarchy *et al.*, 1991; Sarchy y Egal, 1995).

### **6.2.2.- Transportador de aminoácidos excitatorios 4 (EAAT-4)**

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro. En humanos se han clonado cinco transportadores de glutamato: GLAST (EAAT-1), GLT1 (EAAT-2), EAAC1 (EAAT-3), EAAT-4 y EAAT-5 (Danbolt *et al.*, 1998; Seal y Amara, 1999; Ward *et al.*, 2004). Los homólogos en ratas de los transportadores EAAT1-4 también han sido clonados (Kanai y Hediger, 1992; Pines *et al.*, 1992; Stork *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 2004). Estos transportadores juegan un papel crítico en la reducción de las concentraciones extracelulares potencialmente tóxicas de glutamato, mediante una rápida recaptura en los terminales nerviosos y las células gliales (Dunlop *et al.*, 1999; Levenson *et al.*, 2002; Rodríguez-Kern *et al.*, 2003; Petralia *et al.*, 2004; Pignataro *et al.*, 2005). Cada transportador demuestra una afinidad variable por el glutamato y presenta una ruta de señalización distintiva (Ward *et al.*, 2004).

EAAT-4 fue localizado primariamente en las células de Purkinje del cerebelo (Fairman *et al.*, 1995; Nagao *et al.*, 1997; Dehnes *et al.*, 1998; Pignataro *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la expresión de este transportador en el córtex, el tronco del encéfalo y en el hipocampo (Furuta *et al.*, 1997; Massie *et al.*, 2001). En la retina se ha descrito la expresión de EAAT-4 en los astrocitos presentes en la CFNO (Ward *et al.*, 2004).

### **6.2.3.- S100**

Las proteínas S100 constituyen una familia de proteínas ligantes de calcio que engloba 20 miembros conocidos (humanos), cada uno codificado por un gen particular (Salama *et al.*, 2007). Las proteínas S100 se han descrito únicamente en vertebrados (Donato, 2003; Salama *et al.*, 2007). El primer miembro de esta familia fue identificado en 1965 por Moore, que dio el nombre de "S100" a una fracción subcelular procedente de cerebro bovino porque era soluble en sulfato de amonio 100% saturado (Moore, 1965; Zimmer *et al.*, 1995). La nomenclatura de estas proteínas era muy



compleja, ya que cada proteína individual se conocía con diversos nombres; pero, este defecto ha sido debatido y corregido recientemente (revisado en Salama *et al.*, 2007).

Las proteínas S100 pertenecen a la superfamilia de proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  con motivo “mano E-F” y tienen habilidad para formar homodímeros, heterodímeros y oligómeros (Salama *et al.*, 2007).

Estas proteínas realizan numerosas funciones, tanto intracelulares como extracelulares. Dentro de las funciones intracelulares se encuentra la regulación de diferentes procesos como la fosforilación de proteínas, la actividad de ciertos enzimas, la homeostasis del calcio y la dinámica de los componentes del citoesqueleto (interacciona con los microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos) (Donato, 1999; Salama *et al.*, 2007). A nivel extracelular, algunos miembros de la familia actúan como quimioatrayentes de leucocitos, activadores de macrófagos y moduladores de la proliferación celular (Devery *et al.*, 1994; Lau *et al.*, 1995; Cornish *et al.*, 1996; Yen *et al.*, 1997; Hiratsuka *et al.*, 2006; Salama *et al.*, 2007). Por último, también se le ha asignado a S100 un papel en la modulación del aprendizaje y la memoria, así como en procesos inflamatorios y de coagulación sanguínea (Donato, 1999).

En la retina humana se ha encontrado inmunorreactividad a S100 en astrocitos y células ganglionares (Karim e Itoh, 1997). En la retina murina se ha localizado inmunorreactividad a S100 en la CNI, células ganglionares, CPI y CPE y en los cuerpos celulares de las células gliales del nervio óptico (Das *et al.*, 1984).

#### 6.2.4.- Glutamina sintetasa (GS)

La GS es el enzima que cataliza la amidación del glutamato a glutamina en una reacción que conlleva un gasto energético.

Esta actividad enzimática fue descrita por primera vez por Noremborg (1979) en astrocitos. Los astrocitos que poseen GS captan el L-glutamato liberado por las neuronas y lo transforman en glutamina, la cual se exportará de nuevo a las neuronas para su transformación nuevamente en L-glutamato o en ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Otra de las funciones de la GS en el cerebro y en el resto de tejidos es la detoxificación del ión amonio (Noremborg y Martínez-Hernández, 1979).

En la retina, las únicas células dotadas con el enzima GS son las células de Müller (Linser y Moscona, 1979; Lewis *et al.*, 1988). El ratón no es una excepción y la GS marca exclusivamente a las células de Müller en toda su extensión, con los cuerpos celulares en el centro de la CNI y con procesos radiales que terminan en la MLE y MLI (Haverkamp y Wässle, 2000) (Fig. 34).

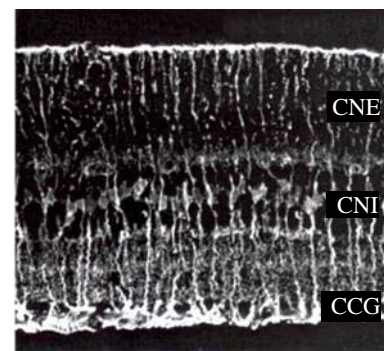


Figura 34: Inmunorreactividad a glutamina sintetasa en la retina del ratón. (Modificado de Haverkamp y Wässle, 2000).

### **6.2.5.- Iba-1**

El factor inflamatorio del aloinjerto-1 (AIF-1 o Iba1; *allograft inflammatory factor-1*) es una proteína citoplasmática de unión a calcio inducida por citoquinas (Deininger *et al.*, 2002). Esta proteína se descubrió por primera vez en aloinjertos cardíacos en ratas con rechazo crónico (Utans *et al.*, 1995). Iba1 se expresa en tejidos humanos relacionados con la inmunidad y juega un papel importante en la activación y función de los macrófagos (Neville y Campbell, 1999; Kuschel *et al.*, 2000).

Iba-1 está presente en microglía residente, activada y fagocítica (Graeber *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1998; 2001; Nakajima *et al.*, 1998). En la retina normal, la inmunorreactividad a Iba-1 se observa en células microgliales presentes en las capas internas de la retina (Harada *et al.*, 2002). En retinas dañadas, se han localizado células microgliales positivas a Iba-1 tanto en las capas internas como externas (Harada *et al.*, 2002).

### **6.2.6.- CD68 (ED1)**

CD68 es una glicoproteína que se expresa predominantemente en la membrana lisosomal de las células mieloides. El antígeno es expresado por los macrófagos y, débilmente, por los granulocitos de la sangre periférica (Dijkstra *et al.*, 1985; Damoiseaux *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 1994).

CD68 también es un marcador intracelular de microglía activada "in vivo" (Graeber *et al.*, 1990). En retinas normales, todas las células positivas a Iba-1 son negativas a CD68 (Harada *et al.*, 2002). Sin embargo, en condiciones de daño de la retina, casi todas las células microgliales presentes en la retina externa presentan doble tinción Iba1/CD68, mientras que las ubicadas en las capas más internas permanecen negativas a CD68 (Harada *et al.*, 2002).

### **6.2.7.- Óxido nítrico sintasa inducible (NOSi)**

La producción de óxido nítrico se lleva a cabo por las denominadas sintasas del óxido nítrico (NOS).

Se han identificado tres isoformas principales de la NOS, catalogadas en función del tejido donde se localizan: NOS neuronal (NOSn), NOS endotelial (NOSe) y NOS inmunológica (NOSi). Las isoformas NOSn y NOSe se expresan de manera constitutiva, mientras que la isoforma NOSi es de expresión inducible (Dawson y Snyder, 1994; Knowles y Moncada, 1994; Masters, 1994; Griffith y Stuehr, 1995). Todas las isoformas de la NOS tienen las mismas propiedades catalíticas, pero la regulación de cada una de ellas es diferente (Kröncke *et al.*, 1995; Kone *et al.*, 2003).

En el SNC, la NOSi se induce en las células microgliales y astrocitarias ante determinadas condiciones patológicas (Loihl y Murphy, 1998; Heneka y Feinstein, 2001; Sardón *et al.*, 2004). Asimismo, se ha comprobado la producción de óxido nítrico en las células de microglía de retinas que han sufrido daños (Lee *et al.*, 2002).



### 6.3.- RESUMEN

En la *tabla 3* se resumen los marcadores proteicos empleados en base a las poblaciones celulares que marcan.

Marcadores neuronales	
Células bipolares	PKC $\alpha$
Células ganglionares	Calbindina, calretinina, islet1, S100, RT97
Células horizontales	Calbindina, RT97
Células amacrinias	Calbindina, calretinina, islet1
Proteínas relacionadas con la sinapsis	Sintaxina, sinapsina, bassoon
Marcadores gliales	
Células de Müller	GFAP, GS, S100, EAAT4
Astrocitos	GFAP, S100, EAAT4
Células de microglía	Iba1, CD68, NOSi

**Tabla 3:** Marcadores proteicos en función de la población celular.

### 6.4.- ANTICUERPOS

En la *tabla 4* se recoge la información referente a los anticuerpos primarios empleados para detectar las neuronas y células gliales.

En ninguno de estos casos el anticuerpo primario estaba marcado en modo alguno, por lo que se usaron anticuerpos secundarios unidos a diferentes moléculas. Éstos, sus propiedades y la concentración a la que fueron usados se exponen en la *tabla 5*.

### 6.5.- PROTOCOLO

#### 6.5.1.- Método Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC)

- *Secciones.* Para la realización de la técnica inmunohistoquímica según el método ABC, las secciones fueron descongeladas y mantenidas a temperatura ambiente al menos durante 1 h.
- *Lavados.* En tampón fosfato salino 0.1M pH 7.4 (TFS) (3 x 10 min).
- *Eliminación de la actividad peroxidasa endógena del tejido.* Para ello se somete a las muestras a un baño de 5 min en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03% diluido en metanol.
- *Lavados.* En TFS (3 x 10 min).
- *Preincubación.* Durante 1 h con un medio compuesto por TFS, Triton<sup>®</sup>X-100 (Tx-100) al 0,2% (v/v) y suero albúmina bovina (BSA) al 2% (p/v).
- *Incubación con el anticuerpo primario.* Diluido en el mismo medio en el que se llevó a cabo la preincubación (ver concentraciones en tabla 3). Esta incubación transcurrió a temperatura ambiente durante 12 h.

Anticuerpo	Tipo	Donador	Concentración	Procedencia
Anti-PKC $\alpha$	Policlonal	Conejo	1:5000	Sigma
Anti-islet1	Monoclonal	Ratón	1:500	Hibridoma Bank
RT97	Monoclonal	Rata	1:1000	Dr. Wood
Anti-calbindina	Policlonal	Conejo	1:1000	Swant
Anti-calretinina	Monoclonal	Ratón	1:5000	Swant
	Policlonal	Conejo	1:10000	Schwaller
Anti-sintaxina	Policlonal	Conejo	1:400	Santa Cruz
Anti-sinapsina	Policlonal	Cabra	1:400	Santa Cruz
Anti-bassoon	Monoclonal	Ratón	1:200	Stressgen
Anti-GFAP	Monoclonal	Ratón	1:400	Sigma
Anti-EAAT4	Policlonal	Conejo	1:100	Alpha diagnostic
Anti-S100	Policlonal	Conejo	1:1000	Dako
Anti-GS	Monoclonal	Ratón	1:1000	Chemicon
Anti-Iba1	Monoclonal	Ratón	1:400	Santa Cruz
Anti-CD68	Monoclonal	Ratón	1:200	Serotec
Anti-NOSi	Monoclonal	Ratón	1:150	Transduction
Anti-H5A5	Monoclonal	Ratón	1:200	Hibridoma Bank
Anti-MHC II	Monoclonal	Ratón	1:200	Hibridoma Bank

**Tabla 4: Anticuerpos primarios empleados.**

Anticuerpo	Donador	Marca	Concentración	Procedencia
Anti-IgG de cobaya	Cabra	Biotina	1:1000	Vector
Anti-IgG de ratón	Caballo	Biotina	1:200	Vector
Anti-IgG de conejo	Cabra	Biotina	1:200	Vector
Anti-IgG de cabra	Conejo	Biotina	1:200	Jackson
Anti-IgG de ratón	Cabra	Molécula fluorescente Cy <sup>TM</sup> 2	1:200	Jackson
Anti-IgG de conejo	Cabra	Molécula fluorescente Cy <sup>TM</sup> 5	1:200	Jackson

**Tabla 5: Anticuerpos secundarios empleados.**

- Lavados. Con TFS (3 x 10 min).
- Incubación con el anticuerpo secundario. Durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (ver tabla 4) disuelto en una solución compuesta por TFS, Tx-100 al 0,2% (v/v) y BSA al 2% (p/v).
- Lavados. Con TFS (3 x 10 min).
- Incubación con el complejo ABC (Vector). Las secciones se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con el complejo ABC diluido hasta una concentración de 1:200 en TFS y Tx-100 al 0,2% (v/v).
- Lavados. Con TFS (3 x 10 min).



- *Lavado*. Con tampón tris-clorhídrico 0.1M pH 7.6 (TTC) (1 x 10 min).
- *Revelado*. Con una mezcla compuesta por TTC, 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0,02% como cromógeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003%.
- *Lavados*. La reacción de revelado se controla bajo el microscopio y se detiene lavando las secciones con TTC (1 x 10 min). Posteriormente, las secciones se lavan en TFS (2 x 10 min).
- *Deshidratación y montaje*. Las secciones se deshidratan en una batería de alcoholes de graduación creciente, se aclaran en xilol y se montan con Entellan.

Se realizaron diferentes tipos de controles negativos con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos utilizados:

- Eliminación del anticuerpo primario en la primera incubación, para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- Eliminación del anticuerpo secundario, con el fin de analizar la posible interacción entre el complejo ABC y los anticuerpos primarios.
- Eliminación del complejo ABC, para poner de manifiesto posibles peroxidases endógenas en el tejido.

#### **6.5.2.- Marcaje fluorescente y doble marcaje fluorescente**

- *Secciones*. Al igual que en el caso anterior, las secciones fueron descongeladas y mantenidas a temperatura ambiente al menos durante 1 h.
- *Lavados*. Con TF (3 x 10 min).
- *Eliminación de la autofluorescencia del tejido*. Especialmente importante si la fijación se llevó a cabo usando aldehídos. Se bañaron las secciones durante 5 min en borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>) disuelto en TF (5 mg/ml disolución).
- *Lavados*. En TFS (3 x 10 min).
- *Preincubación*. Al igual que en el método ABC, las secciones se incubaron durante 1 h en una solución compuesta por TFS, Tx-100 al 0.2% y suero de bloqueo al 2% (v/v).
- *Incubación con el anticuerpo primario*. La incubación transcurre durante una noche (aprox. 12 h) con el anticuerpo primario (marcaje simple) o los anticuerpos primarios (marcaje doble) disueltos a la concentración adecuada (tabla 3) en un medio de igual composición al usado en la preincubación.
- *Lavados*. Con TFS (3 x 10 min); para eliminar los anticuerpos excedentes.

- *Incubación con el anticuerpo secundario.* La incubación transcurre durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente (marcaje simple), o los anticuerpos secundarios (marcaje doble) disueltos a la concentración estipulada (tabla 4) en un medio compuesto por TFS y suero de bloqueo al 2% (v/v).
- *Lavados.* Con TFS (3 x 10 min) para eliminar los anticuerpos secundarios que no se hayan unido.
- *Montaje.* Las secciones se montan sin deshidratar, usando un medio protector de la fluorescencia (Cuadro 7). Posteriormente se sella el cubreobjetos para evitar que el medio de montaje se pierda.

Al igual que en el método ABC, hemos llevado a cabo diferentes tipos de controles negativos para asegurar la especificidad del marcaje obtenido:

- Eliminación de la incubación con el anticuerpo primario, para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- Eliminación de la incubación con el anticuerpo secundario, para determinar la presencia de autofluorescencia en el tejido.

## **7.- MARCAJE CON Tx-100 E IgG ANTI-IgG DE RATÓN**

Esta técnica constituye un método sencillo para identificar mielina, microglía y los vasos sanguíneos (Weruaga *et al.*, 1998).

El Tx-100 es un detergente que se utiliza en histoquímica e inmunohistoquímica para que los reactivos usados en estas técnicas puedan penetrar a través de las membranas biológicas. Además, se ha comprobado que el Tx-100 ayuda a reducir la tinción no-específica. Las concentraciones a las que se usa el Tx-100 cuando se aplica la técnica inmunohistoquímica en muestras de sistema nervioso central varían entre 0,01% y 0,2%.

Se ha descrito que el empleo de anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón diluidos en el medio de incubación con elevadas concentraciones de Tx-100 (entre 0,2 y 2,5%), y sin ningún antisuero primario específico, permite distinguir tres elementos: los vasos sanguíneos, las vainas de mielina y las células microgliales; elementos que no aparecen si se elimina el Tx-100 del medio de incubación (Weruaga *et al.*, 1998). Por tanto, el marcaje es resultado de la unión inespecífica de anti-inmunoglobulinas secundarias originado por la adición de elevadas concentraciones de Tx-100 al medio de incubación (Weruaga *et al.*, 1998). El marcaje de mielina se piensa que es debido a fuertes interacciones hidrofóbicas con los componentes de la misma. En cuanto al marcaje de microglía, se ha descrito una acumulación selectiva de IgG<sub>s</sub> en células con forma de microglía en el cerebro del ratón, la cual no parecía ser consecuencia de la fagocitosis no-selectiva del fluido extracelular, ya que la seroalbúmina no fue detectada en aquellas células microgliales (Fishman y Savitt, 1989; Weruaga *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha



demostrado la presencia de receptores para la fracción Fc en la superficie de las células microgliales de roedores. En cualquier caso, el marcaje parece deberse más bien a las IgG presentes en las células que a la unión del fragmento Fc al receptor respectivo (Weruaga *et al.*, 1998).

### 7.1.- PROTOCOLO

- *Secciones.* Las secciones fueron descongeladas y mantenidas a temperatura ambiente durante, al menos, 1 h.
- *Lavados.* Con TF (3 x 10 min).
- *Inhibición de las peroxidasas endógenas del tejido.* Sometiendo las secciones a un baño de 5 min en una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% en metanol.
- *Lavados.* Con TFS (3 x 10 min).
- *Incubación.* En un medio compuesto por TFS y Tx-100 al 1% (v/v). La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h.
- *Lavados.* Con TFS (3 x 10 min).
- *Incubación con el complejo ABC (Vector).* Las secciones se incuban durante 3 h a temperatura ambiente con el complejo ABC diluido hasta una concentración de 1:200 en TFS y Tx-100 al 0,2% (v/v).
- *Lavados.* Con TFS (3 x 10 min).
- *Lavado.* Con tampón tris-clorhídrico 0.1M pH 7.6 (TTC) (1 x 10 min).
- *Revelado.* Con una mezcla compuesta por TTC, 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0,02% como cromógeno, níquel amonio sulfato<sup>1</sup> al 0,16% (p/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003% (v/v).
- *Lavados.* La reacción de revelado se controla bajo el microscopio y se detiene lavando las secciones con TTC (1 x 10 min). Posteriormente, las secciones se lavan en TFS (2 x 10 min).
- *Deshidratación y montaje.* Las secciones se deshidratan en una batería de alcoholes de graduación creciente, se aclaran en xilol y se montan con Entellan.

### 8.- CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS

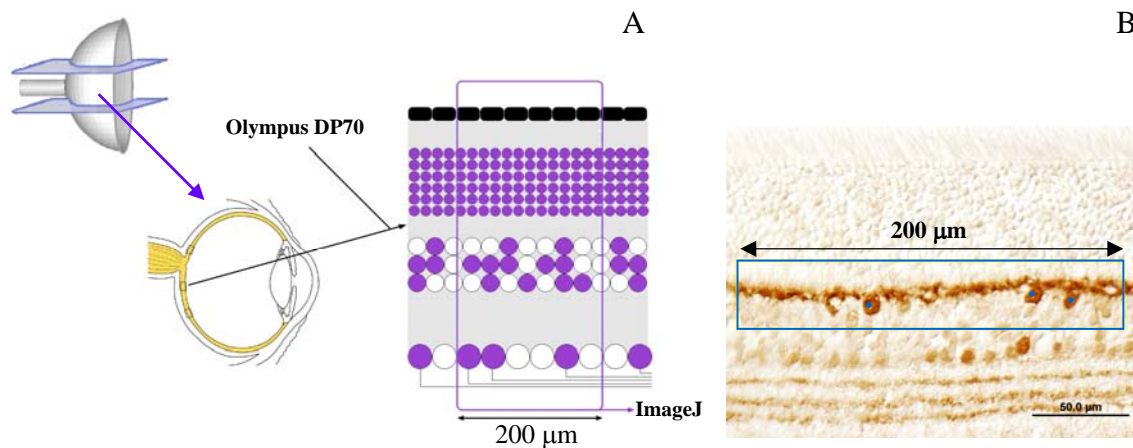
En primer lugar, se eligieron secciones transversales de 14 µm de grosor obtenidas de la región media de la retina (Fig. 35). Para contar el número de células positivas a los diferentes marcadores se tomaron imágenes en dichas secciones con una cámara digital (DP70; Olympus). Posteriormente se usó el software *ImageJ* para definir campos rectangulares cuyo lado paralelo

---

<sup>1</sup> *Níquel amonio sulfato:* este compuesto se usa para intensificar el revelado.



al eje longitudinal de la sección de retina fuese de 200  $\mu\text{m}$  (Fig. 35). Escogimos como parámetro fijo el lado longitudinal en vez del área del campo porque el espesor de la retina no es constante entre las retinas de animales silvestres y las retinas de animales *pcd/pcd*, ni entre retinas de animales *pcd/pcd* de diferentes edades, por lo que no es posible verificar un valor fijo para el lado transversal del campo. Por último, se empleó el mismo software ImageJ para contar el número de células marcadas en cada caso (Fig. 35).



**Figura 35:** A. Esquema de la estrategia empleada para contar el número de células positivas a los diferentes marcadores. B. Ejemplo de la cuantificación de células horizontales positivas a calbindina.

Para cada sección estudiada se delimitaron 3 campos con las características descritas y se halló el valor medio del número de células marcadas por campo.

En el análisis estadístico posterior se compararon los valores obtenidos en animales silvestres y *pcd/pcd* de cada grupo de edad con ayuda del programa informático SPSS 15.0. Tras comprobar la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene, se aplicó el test de la t de Student. Se consideraron los valores de  $p < 0,05$  como diferencias moderadamente significativas,  $p < 0,01$  como significativas y  $p < 0,001$  como altamente significativas.

## 9.- REGISTRO ELECTORRETINOGRÁFICO

En el presente estudio se usó la técnica de registro electroretinográfico de *campo completo*. Esta técnica requiere una iluminación homogénea (iso-luminante) de toda la retina del animal donde se va a realizar el registro. Para obtener dicha iluminación se utilizaron dos fuentes de luz:

- **Diodos de emisión de luz** (*Light Emission Diode, LED*): debido al pequeño tamaño del ojo del ratón, la utilización con LEDs permite una iluminación



**Figura 36:** LED.



homogénea de toda la retina (Viswanathan *et al.*, 2001) (Fig. 36). Se emplearon LED de la firma comercial RS-Amidata (rf. 310-6707), alimentados por una fuente diseñada por la casa CIBERTEC S.A. Los LEDs son dispositivos electrónicos que emiten una cantidad de luz proporcional a la corriente eléctrica que circula por sus polos. La iluminación proporcionada por los LEDs fue medida con un fotómetro (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg) y ajustada a las necesidades de cada protocolo experimental.

- **Pantalla de Ganzfeld:** consiste en una semiesfera o cúpula como campo de estimulación que proporciona una luz homogénea en los 120° centrales de la retina (Dieterle y Gordon, 1956) (Fig. 37). La estructura esférica de la pantalla permite que la iluminación del fondo de la misma se distribuya de forma homogénea por todo su interior. La iluminación del interior de la esfera se consiguió gracias a la utilización de LEDs (Kooijman y Damhof, 1980) cuya intensidad se calibró convenientemente.



Figura 37: Pantalla de Ganzfeld.

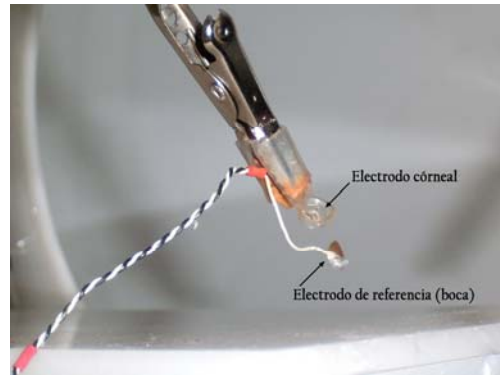
### 9.1.- PROTOCOLO

- *Adaptación a la oscuridad.* Los animales permanecían en oscuridad absoluta un mínimo de 12 h.
- *Anestesia.* Intraperitoneal, con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y xylazina (7 mg/kg) diluidos en solución salina (NaCl, 0.9% en agua destilada).
- *Caja de Faraday.* El animal se introduce en una caja de Faraday, donde se llevan a cabo el resto de las tareas preparatorias y el registro electrofisiológico (Fig. 38). Dentro de la caja, los animales son mantenidos a una temperatura corporal de 37°C mediante una manta calefactora (Hot-Cold, Pelton-Sherpherd Industries, CA, USA). El efecto caja de Faraday provoca que el campo electromagnético en el interior sea nulo, anulando interferencias debidas a campos electromagnéticos externos.
- *Dilatación de la pupila.* Antes de realizar el registro se aplicaron 2 gotas de colirio de tropicamida (Colircusí Tropicamida, Alcon Cusí, SA) al 1% en el ojo a registrar.
- *Preservación de la córnea.* Para optimizar el registro electrofisiológico y preservar la superficie corneal de la desecación, se administró tópicamente Methocel (Ciba Vision AG) al 2% en cada ojo.



Figura 38: Caja de Faraday.

- **Colocación de los electrodos.** En cada caso se colocaron 3 electrodos de registro:
  1. Electrodo de tierra: conectado a una aguja subcutánea colocada en la cola del animal.
  2. Electrodo de referencia: conectado a una placa de oro, dispuesto en la boca del animal (Fig. 39).
  3. Electrodo corneal: electrodo comercial (Burian-Allen, Hansen Ophthalmic Development Lab, Coralville, IA) fabricado en metacrilato transparente y oro (Fig. 39). Este electrodo se dispone en el eje visual a  $\approx 5$  mm de la córnea.



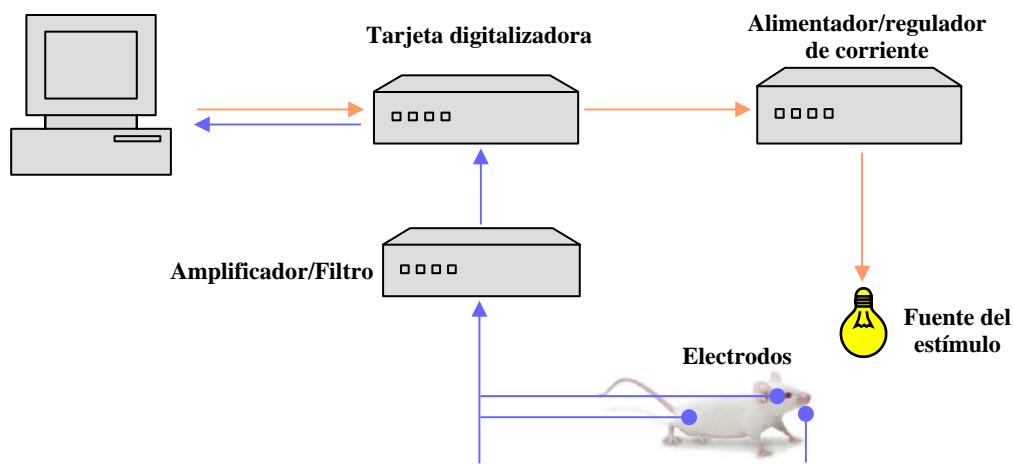
**Figura 39: Electrodo córneo y de referencia.**

- **Registro.** Una vez colocados los tres electrodos y con el animal en absoluta oscuridad, se comienza el registro de las respuestas electroretinográficas. Según el protocolo a realizar, o bien se introducía el animal en la pantalla de Ganzfeld o se disponía el LED de iluminación en la proximidad del electrodo corneal, orientado al eje visual.

Las tareas de anestesia, instilación ocular y disposición de los electrodos se realiza bajo una iluminación monocromática roja ( $\approx 650$  nm) tenue.

### 9.2.- APARATAJE Y SOFTWARE

Mediante la utilización de un estimulador eléctrico diseñado específicamente para el control de las fuentes de iluminación (CIBERTEC S.A.) se procede a alimentar los dispositivos luminosos, consiguiendo intensidades lumínicas de entre  $-5$  y  $3 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . Las intensidades lumínicas aplicadas en cada caso se determinaron con un fotómetro (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg, GE). La señal electrofisiológica registrada fue después amplificada y filtrada con un



**Figura 40: Disposición del aparataje utilizado en los registros electroretinográficos.**

amplificador (CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA) y digitalizada a 10 KHz con una tarjeta de adquisición de datos PowerLab (ADInstruments Ltd., Oxfordshire, Reino Unido). La señal fue finalmente representada en la pantalla de un ordenador PC-compatible. Tanto para la representación gráfica de las señales registradas como para el control del estimulador luminoso se empleó el software comercial Scope v6.4 del PowerLab.

En la figura 40 se muestra de forma esquemática el equipamiento utilizado en la realización de los registros electroretinográficos.

### 9.3.- PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN

Para la realización de los protocolos se ha procurado normalizar los registros electroretinográficos en animales de experimentación, siguiendo las mismas normas dictadas para los registros electroretinográficos en pacientes humanos (Marmor *et al.*, 2004; www.iscev.org). Siguiendo dichas normas, se han obtenido las 5 respuestas electroretinográficas estándar descritas, esto es, respuesta de bastones, respuesta mixta, potenciales oscilatorios, respuesta de conos y respuesta flicker. Además, una vez puesta a punto, añadimos a los 5 registros anteriores la respuesta escotópica umbral (STR).

#### 9.3.1.- Respuesta escotópica umbral (STR)

Se obtuvo, tras más de 12 h de adaptación a la oscuridad, utilizando la pantalla de Ganzfeld. Se aplicaron estímulos de entre  $-5$  y  $-4,3$   $\log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (Fig. 41). Tras 100 ms de registro basal, se aplicaron estímulos de entre 1.0 y 3.0 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta retiniana (Fig. 41). Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1Hz y de paso bajo de 1000Hz. Se promediaron un total de 100 respuestas con un intervalo entre estímulos de entre 3 y 10 s.

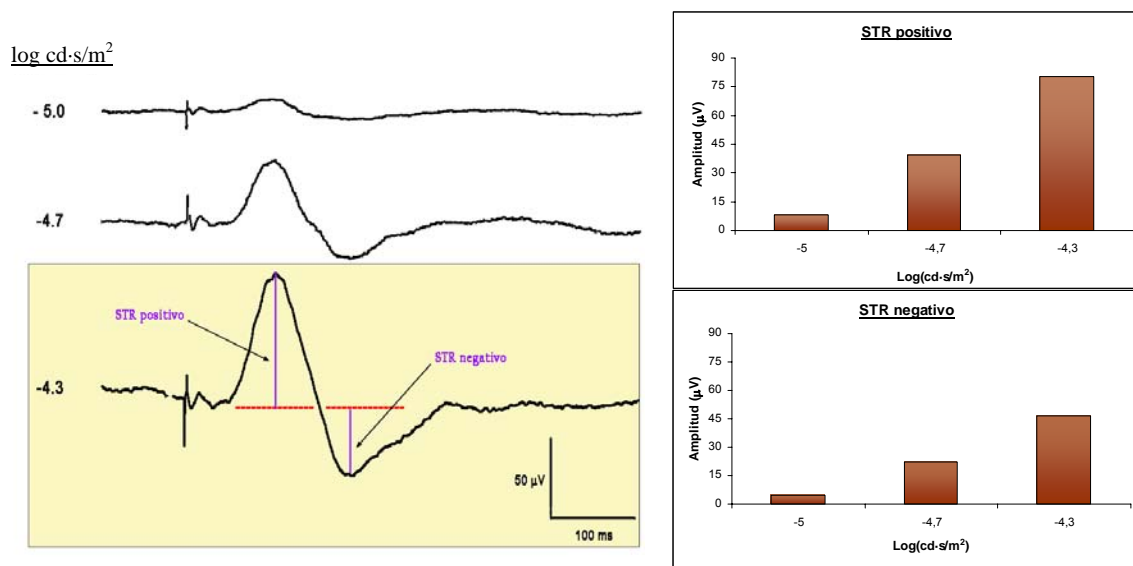


Figura 41. Puesta a punto del registro de la respuesta escotópica umbral (STR).

Para nuestro estudio, comparamos las respuestas obtenidas en las retinas *pcd/pcd* y control en los diferentes estadios considerados empleando una intensidad lumínica de  $-4.3 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ .

### 9.3.2.- Respuesta de bastones

La respuesta de los bastones en las retinas *pcd/pcd* y control se obtuvo en condiciones escotópicas y con el animal dentro de la pantalla de Ganzfeld. Aplicamos estímulos luminosos con una intensidad comprendida entre  $-4,0$  y  $-2,1 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (Fig. 42). Tras 100 ms de registro basal, se aplicó un estímulo de 5 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta de la retina (Fig. 42). Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1Hz y de paso bajo de 1000Hz. Se promediaron un total de 60 respuestas, con un intervalo entre estímulos de entre 5 y 10 s.

Para nuestro estudio, comparamos las respuestas obtenidas en las retinas *pcd/pcd* y control en los diferentes estadios considerados empleando una intensidad lumínica de  $-2,1 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (sombreado Fig. 42), tras comprobar que obteníamos el máximo de respuesta sin estimular también a los conos.

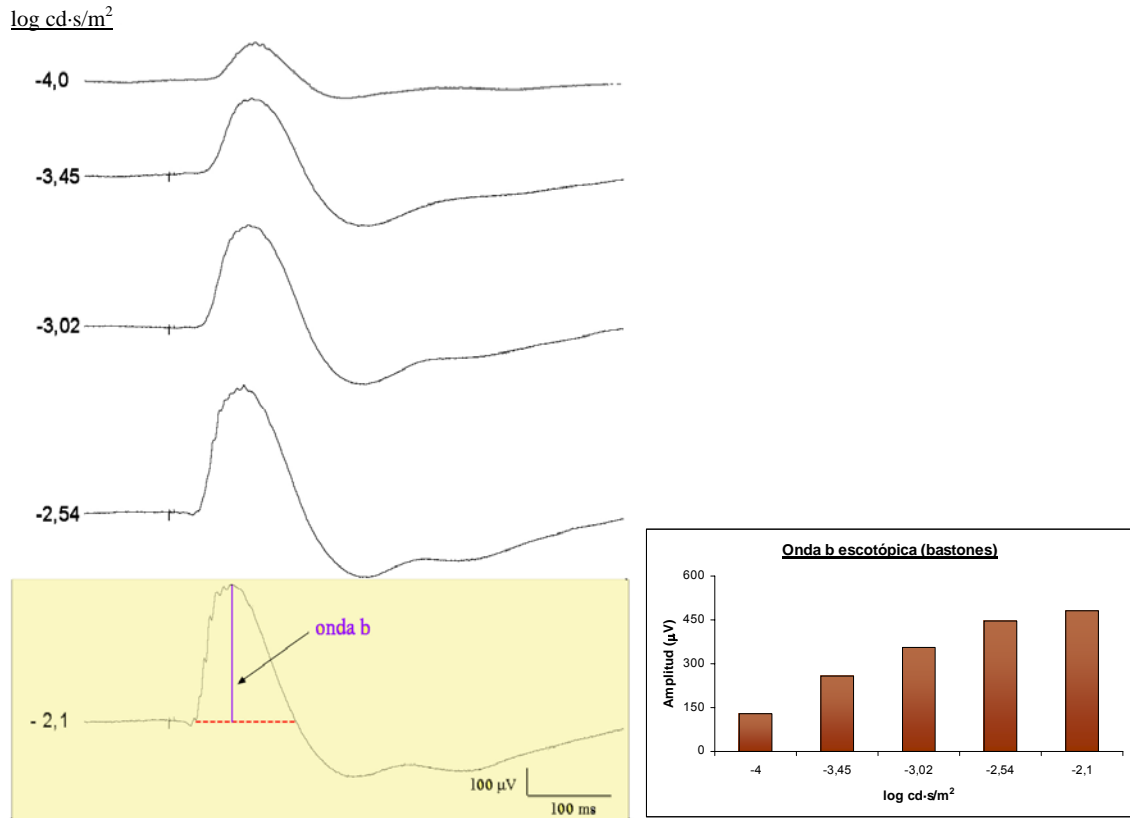


Figura 42. Puesta a punto del registro de la onda b escotópica (bastones).

### 9.3.3.- Respuesta escotópica mixta

Este registro se obtiene tras haber obtenido la respuesta de bastones, manteniendo las condiciones escotópicas. En primer lugar, aplicamos estímulos luminosos comprendidos entre  $-1,64$  y  $3,22 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (Fig. 43). Los estímulos comprendidos entre  $-1,64$  y  $-1,01$  se obtienen empleando la pantalla de Ganzfeld, mientras que los estímulos de mayor intensidad se consiguen usando un LED en la disposición descrita en apartados anteriores. Al final, la intensidad lumínica escogida para comparar las ondas a y b escotópicas mixtas en nuestras retinas de estudio fue  $2,71 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , ya que por debajo de esta intensidad no se conseguía la respuesta máxima y por encima se saturaba la respuesta (sombreado, Fig. 43).

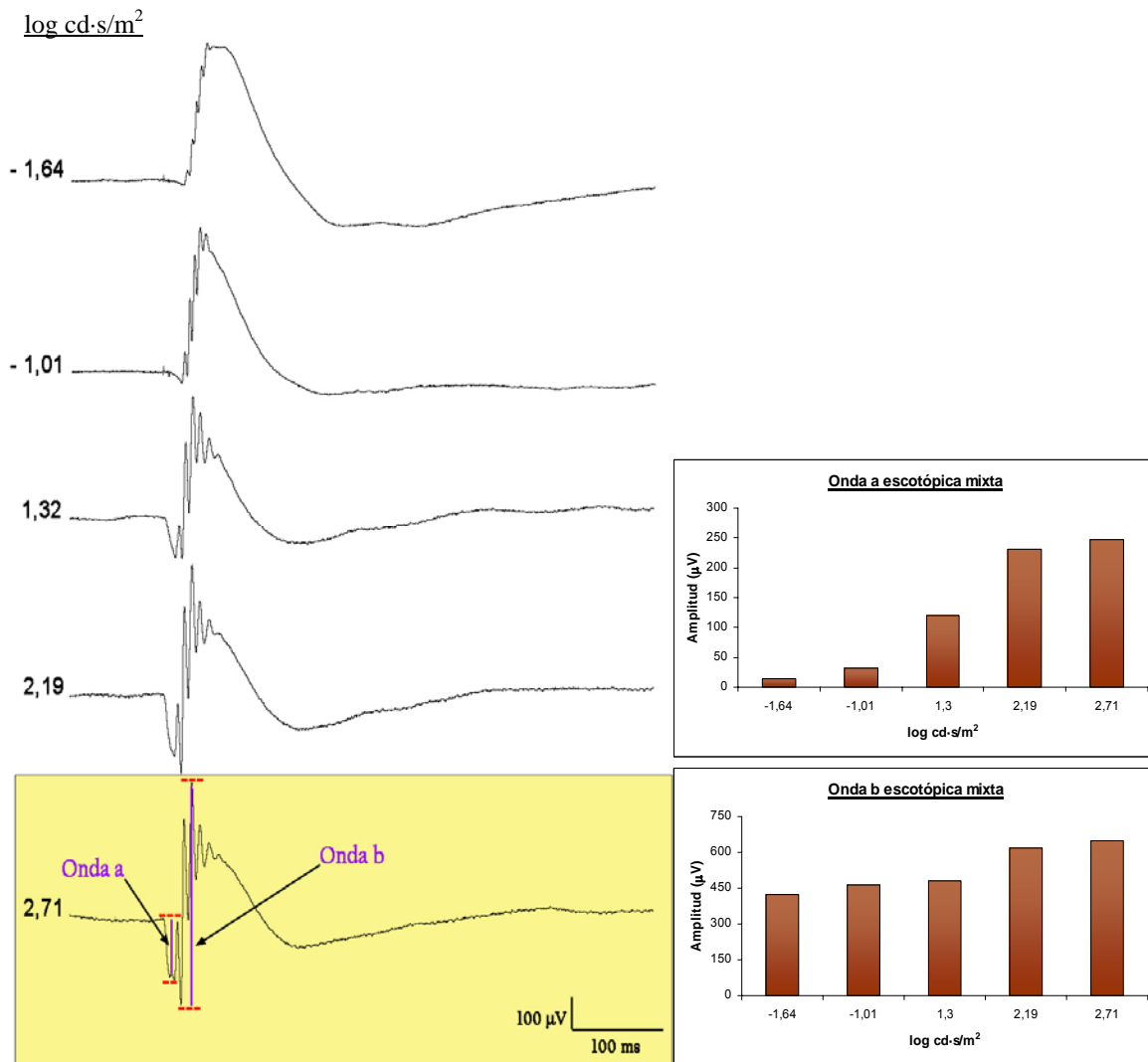


Figura 43. Puesta a punto del registro de las ondas a y b escotópicas (mixtas).

Como en el caso anterior, tras 100 ms de registro basal, se aplicó un estímulo de 5 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta de la retina. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz y se promediaron un total de 60 respuestas con un intervalo entre estímulos de 30 s.

### 9.3.4.- Potenciales oscilatorios

El registro de los potenciales oscilatorios se efectúa con el animal dentro de la pantalla de Ganzfeld y manteniendo las condiciones escotópicas. Se emplea una intensidad lumínica de  $-1,01 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . Al igual que en los registros anteriores, tras 100 ms de registro basal se aplica un estímulo de 5 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta retiniana (Fig. 44). Para medir los potenciales oscilatorios se filtra la señal utilizando un filtro de paso alto de **30 Hz** y de paso bajo de **10000 Hz**. Se promediaron un total de 60 respuestas con un intervalo entre estímulos de 15 s.

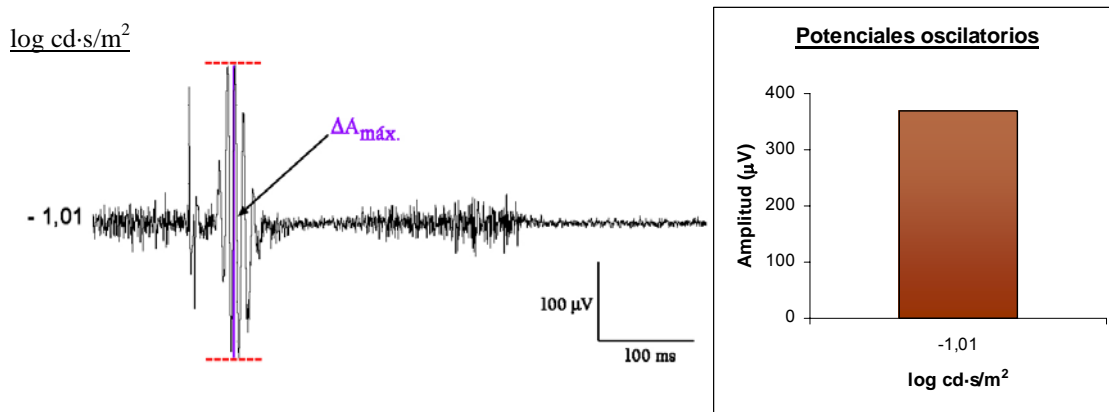


Figura 44. Puesta a punto del registro de los potenciales oscilatorios.

### 9.3.5.- Respuesta de conos

Finalizados los registros en condiciones escotópicas, se expone al animal de experimentación a una iluminación basal de  $30 \text{cd}/\text{m}^2$  durante 5 min, con el fin de adaptar la retina a la luz (condiciones fotópicas). El registro de las respuestas de conos se llevó a cabo

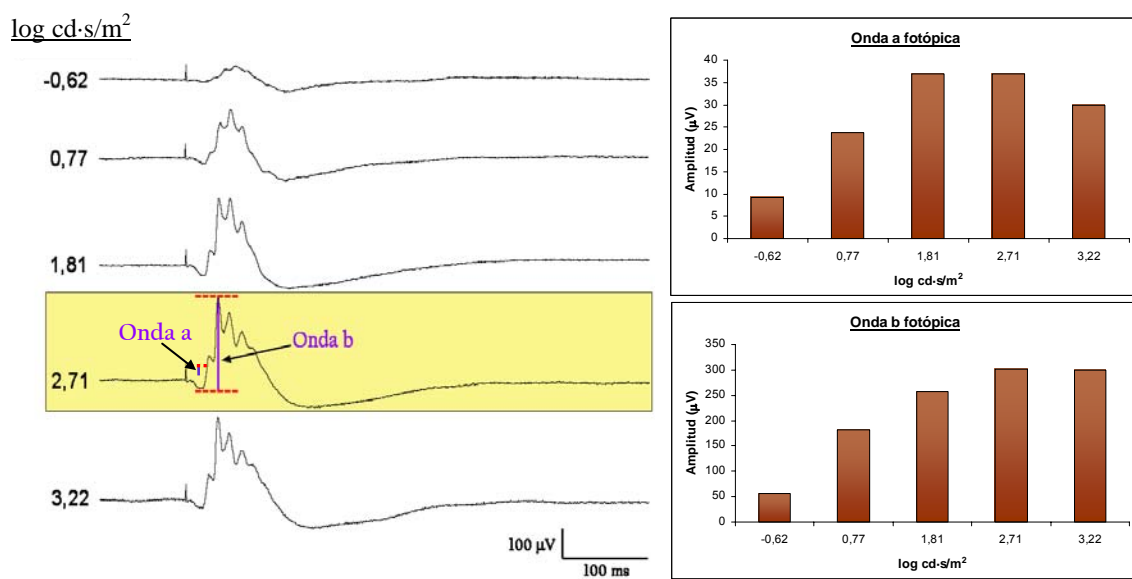


Figura 45. Puesta a punto del registro de la respuesta de conos.

mediante iluminación con LEDs. Para ello, una vez adaptada la retina a la luz, aplicamos estímulos luminosos de intensidad comprendida entre  $-0,62$  y  $3,22 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (Fig. 45).

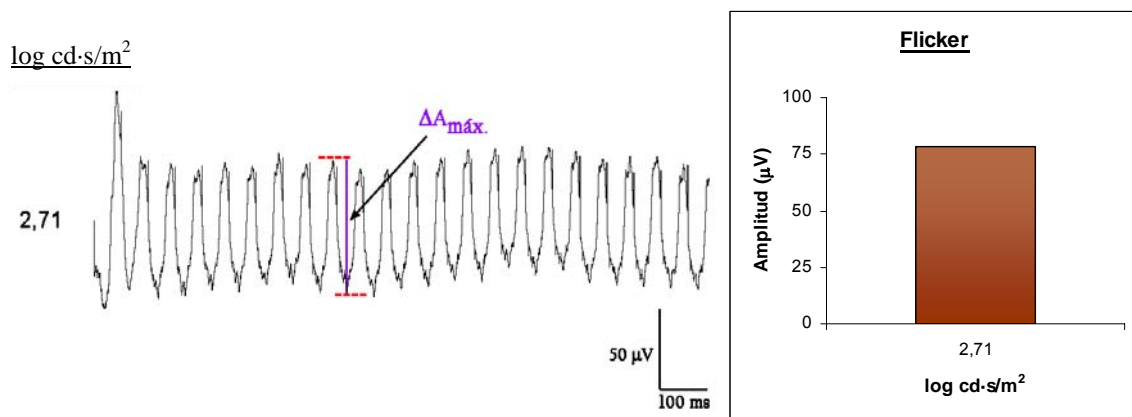
Tras 100 ms de registro basal, se aplicó un estímulo de 5 ms de duración para, a continuación, registrar durante 500 ms la respuesta de la retina (Fig. 45). Para realizar el registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz y se promediaron un total de 60 respuestas con un intervalo entre estímulos de 1 s. Durante la duración de la prueba se mantiene la iluminación basal, lo que permite conservar el estado de adaptación a la luz.

Para nuestro estudio comparativo, se consideró una intensidad lumínica de  $2,71 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ; tras comprobar que con menor intensidad no se obtenía la máxima respuesta y que intensidades superiores no aumentaban la amplitud de la respuesta (Fig. 45).

### 9.3.6.- Flicker

Manteniendo las condiciones de adaptación a la luz, se aplican estímulos luminosos de intensidad  $2,71 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  de 5 ms de duración cada 50 ms (es decir, con una frecuencia de 20 Hz) de forma continuada (Fig. 46).

Se promediaron un total de 60 ciclos de 1,2 s de duración con un intervalo entre uno y otro de 1 s. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz.



**Figura 46.** Puesta a punto del registro de la respuesta flicker.

## 9.4. ANÁLISIS DE DATOS

Los valores obtenidos en los registros electroretinográficos se trataron estadísticamente de igual forma a la descrita para la cuantificación de células.





# IV. Resultados

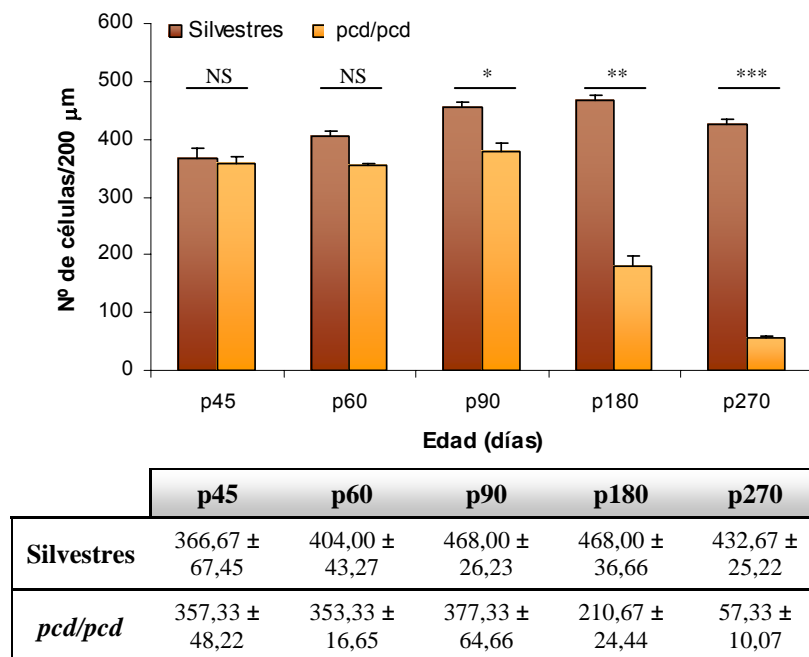
---

## 1.- FOTORRECEPTORES

La retina de los animales silvestres presenta 14-15 hileras de células fotorreceptoras en la CNE (Iconografía, Fig. 47A); un espesor que se conserva en todos los estadios de edad considerados.

En la retina de los animales mutantes *pcd/pcd*, la CNE pierde progresivamente filas de fotorreceptores (Fig. 47B-D), si bien hasta p90 no tiene un reflejo histológico evidente (Fig. 47E). No obstante, en el intervalo de edades considerado, p45-270, la CNE nunca llega a desaparecer completamente en las retinas *pcd/pcd*, pudiéndose observar entre 2 y 3 estratos de células fotorreceptoras a p270 (Fig. 47F).

El recuento de núcleos positivos a yoduro de propidio muestra una progresiva reducción del número de células fotorreceptoras en las retinas de animales *pcd/pcd* respecto a los animales silvestres (Gráfica 1). A partir de p90 esta disminución es significativa, siendo mucho más notable a los 270 días, donde la diferencia es altamente significativa y se conserva solamente el 13,25% de las células fotorreceptoras en la CNE respecto al valor obtenido en los animales controles.



**Gráfica 1.** Número de células en la CNE por cada 200 µm de sección longitudinal de retina. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

## 2.- MUERTE CELULAR

La presencia de apoptosis en la retina tanto de los animales silvestres como de los mutantes *pcd/pcd* fue evaluada mediante la técnica de TUNEL. En las retinas controles no hemos encontrado células positivas a TUNEL en ninguna de las secciones estudiadas (Fig. 48A-C).

Por contra, las retinas de los animales *pcd/pcd* presentan células positivas a TUNEL en todos los estadios de edad considerados (Fig. 48D-O). En las secciones de retinas *pcd/pcd* estudiadas, todas las células apoptóticas visualizadas se localizaron en la CNE, sin que hayamos observado la presencia de células positivas a TUNEL en ninguna otra capa nuclear de la retina en el intervalo p45-270 (Fig. 48D-O). El número de células apoptóticas contabilizadas se mantiene constante entre los cinco grupos de edad objeto del estudio, alcanzando valores entre 1-2 células positivas a TUNEL por campo (200  $\mu\text{m}$  x 160  $\mu\text{m}$  de sección transversal de retina).

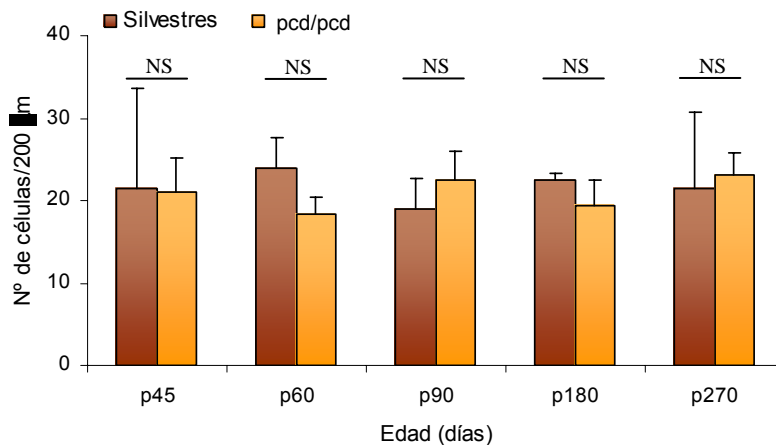
### 3.- POBLACIONES NEURONALES

#### 3.1.- CÉLULAS BIPOLARES

##### 3.1.1.- Inmunorreactividad a proteína quinasa C $\alpha$ (PKC $\alpha$ )

En las retinas de los animales silvestres, la población de células bipolares de bastón muestra una fuerte inmunorreactividad para este marcador (Figs. 49A y 50A-B). Estas células presentan abundantes penachos dendríticos marcados en la CPE (Figs. 49A y 50A). Asimismo, los terminales axónicos de estas células bipolares tienen varicosidades bien definidas e intensamente inmunorreactivas a PKC $\alpha$  localizadas en la sublámina 5 de la CPI (Figs. 49A y 50B).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* conservan sus poblaciones de células bipolares de bastón en lo que al número de dichas células se refiere (Gráfica 2). Así, no hemos encontrado variaciones significativas en el número de células bipolares positivas a PKC $\alpha$  entre las retinas de los animales silvestres y los animales *pcd/pcd*, en ninguno de los grupos de edad considerados en este estudio.



Gráfica 2. Número de células bipolares marcadas con PKC $\alpha$ . En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).

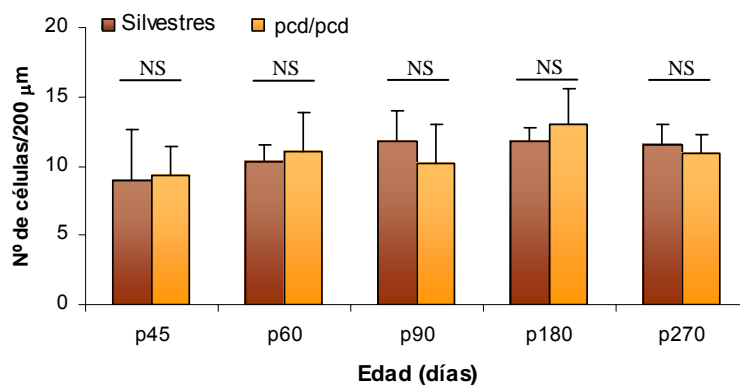
No obstante, a medida que avanza la degeneración de los fotorreceptores en las retinas *pcd/pcd*, es posible apreciar cambios morfológicos en las prolongaciones de las células bipolares de bastón (Figs. 49B-F y 50C-J). En el intervalo de p45 a p90, las células bipolares de bastón de las retinas *pcd/pcd* no presentan cambios morfológicos evidentes en sus penachos dendríticos, respecto a los animales silvestres (Fig. 49C y 50C-E); pero a partir de p90, sufren la retracción progresiva de sus dendritas; las cuales llegan casi a desaparecer a p270 (Fig. 49G y 50G-I). En cuanto a los terminales axónicos, las células bipolares de bastón de las retinas *pcd/pcd* presentan una morfología normal, con varicosidades grandes e intensamente teñidas, entre p45 y p60 (Fig. 50D). En estadios posteriores, se observan terminales axónicos con varicosidades de menor tamaño y menor inmunorreactividad que en los animales silvestres (Fig. 50F,H,J).

### 3.2.- CÉLULAS GANGLIONARES

#### 3.2.1.- Inmunorreactividad a islet-1

En la retina de los animales silvestres se observan nítidamente células ganglionares positivas a islet-1 (Fig. 51A). En estas células, el marcaje se localiza exclusivamente en el soma sin que se haya encontrado ningún proceso inmunorreactivo para islet-1 en ninguna de las secciones estudiadas (Fig. 51A). Entre las células ganglionares marcadas existe una ligera variación en la intensidad de la tinción (Fig. 51A).

El patrón de inmunorreactividad a islet-1 que presentan las retinas *pcd/pcd* entre p45 y p270 es esencialmente idéntico al que acabamos de describir para las retinas de animales silvestres (Fig. 51B). Asimismo, no hemos encontrado diferencias significativas en el número de células ganglionares positivas a islet-1 entre retinas de animales *pcd/pcd* y silvestres en ninguno de los estadios de edad considerados en este estudio (Gráfica 3).



	p45	p60	p90	p180	p270
<b>Silvestres</b>	9,00 ± 3,61	10,33 ± 1,21	11,83 ± 2,21	11,75 ± 0,99	11,50 ± 1,52
<b><i>pcd/pcd</i></b>	9,33 ± 2,07	11,00 ± 2,90	10,17 ± 2,79	13,00 ± 2,53	10,92 ± 1,36

**Gráfica 3. Número de células ganglionares marcadas con islet-1.** En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).

### **3.2.2.- Inmunorreactividad a RT97**

En la retina de los animales silvestres, las fibras del nervio óptico se tiñen intensamente con Rt97. La inmunorreactividad aumenta desde la periferia hacia el centro como consecuencia de la progresiva convergencia de axones de células ganglionares en busca de la CNO (Fig. 52A).

Al igual que en los animales silvestres, los axones de las células ganglionares de las retinas *pcd/pcd* se tiñen intensamente con anticuerpos Rt97 (Fig. 52B). Estos axones convergen formando haces y salen de la retina por la CNO, sin que hayamos encontrado diferencias aparentes en los animales *pcd/pcd* respecto a los animales silvestres en el intervalo p45-270 (Fig. 52B).

### **3.2.3.- Inmunorreactividad a calbindina y calretinina**

En la CCG de las retinas de animales silvestres, numerosas células presentan inmunorreactividad al emplear anticuerpos contra las proteínas ligantes de calcio calbindina y calretinina (Figs. 53A y 54A respectivamente). No obstante, con estos dos marcadores proteicos no es posible diferenciar a las células ganglionares de las células amacrinas desplazadas.

A pesar de este inconveniente, conviene destacar que no hemos encontrado modificaciones en el patrón de inmunorreactividad a calbindina y calretinina en la CCG de las retinas de animales *pcd/pcd* respecto a lo descrito en los animales silvestres en ninguno de los grupos de edad estudiados (Figs. 53B-F y 54B-F, respectivamente).

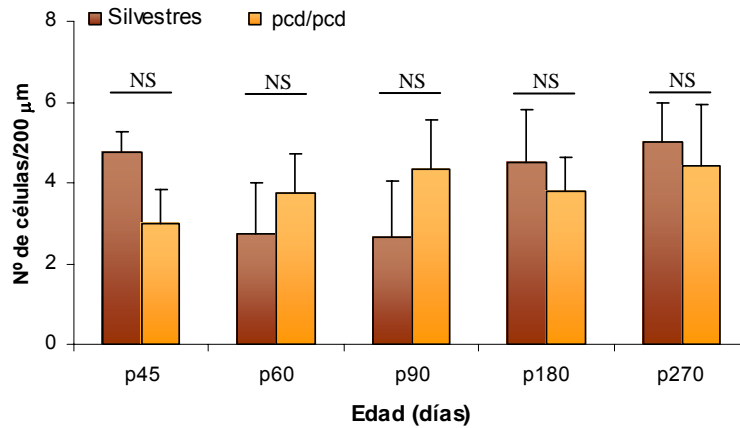
## **3.3.- CÉLULAS HORIZONTALES**

### **3.3.1.- Inmunorreactividad a calbindina**

En la retina de los animales silvestres, las células horizontales positivas presentan un soma intensamente teñido ubicado muy próximo al límite, o en el mismo límite, con la CPE (Fig. 53A). Numerosos procesos de estas células presentes en la propia CPE también se tiñen intensamente (Fig. 53A). Estos procesos se disponen paralelos a las capas de la retina (Fig. 53A).

El patrón de inmunorreactividad a calbindina en las células horizontales de las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd* es similar al descrito en las retinas silvestres (Fig. 53B-F). Asimismo, no hemos encontrado procesos de células horizontales que, de manera anómala, penetren en las capas nucleares externa e interna. Sin embargo, en las retinas de los animales *pcd/pcd* si es posible apreciar una ligera disminución de la inmunorreactividad a calbindina en los procesos de las células horizontales ubicados en la CPE en relación a los animales silvestres. Esta reducción se observa desde p45, si bien no se aprecia que dicha disminución se incremente notablemente en los siguientes estadios de edad (Fig. 53B-F). Además, en las retinas de animales *pcd/pcd* de 180 y 270 días de edad aparecen somas de células horizontales en posiciones más esclerales de lo habitual, incluso en la misma CNE (Fig. 53G-H).

Al efectuar el recuento de células horizontales positivas a calbindina, no hemos encontrado variaciones significativas en el número de estas células entre animales silvestres y *pcd/pcd* en el intervalo p45-270 (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Número de células horizontales positivas a calbindina.** En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).

	p45	p60	p90	p180	p270
Silvestres	4,75 ± 0,50	2,75 ± 1,26	2,67 ± 1,37	4,50 ± 1,21	5,00 ± 1,00
<i>pcd/pcd</i>	3,00 ± 0,82	3,75 ± 0,96	4,33 ± 1,21	3,80 ± 0,84	4,40 ± 1,52

### 3.3.2.- Inmunorreactividad a RT97

En la retina de los animales silvestres, los procesos de las células horizontales son positivos a Rt97, apareciendo intensamente teñidos a lo largo de toda la extensión de la retina (Fig. 52C).

En las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd* no hemos encontrado diferencias respecto a los animales silvestres en la inmunorreactividad a Rt97 que presentan los procesos de las células horizontales (Fig. 52D).

## 3.4.- CÉLULAS AMACRINAS

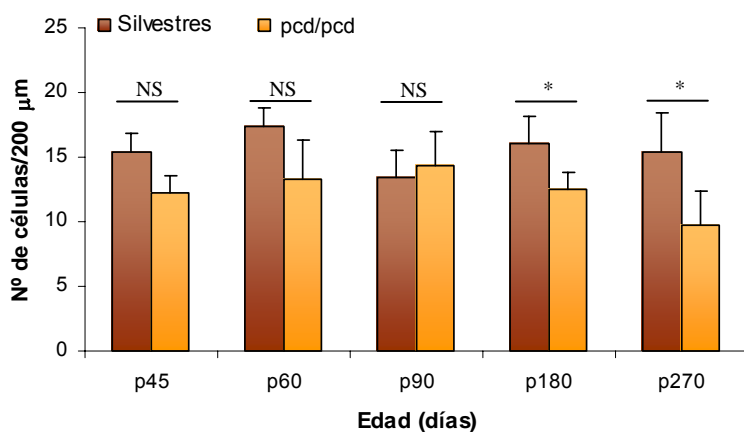
### 3.4.1.- Inmunorreactividad a calbindina

En la retina de los animales silvestres se puede observar una nutrida hilera de somas de células amacrinas positivas a calbindina en la porción vitreal de la CNI (muy próximos a la CPI) (Fig. 53A). En la propia CPI, y de manera análoga a lo descrito al emplear anticuerpos contra calretinina, los procesos inmunorreactivos de estas células forman tres bandas paralelas entre sí y longitudinales al eje mayor de la retina (Fig. 53A).

En las retinas de los animales *pcd/pcd* también es posible observar células amacrinas positivas a calbindina en la CNI, así como las tres bandas inmunorreactivas de la CPI, en todo el

intervalo de edades considerado en este estudio (Fig. 53B-F). Sin embargo, se observa que la intensidad de esta tinción es inferior en las retinas *pcd/pcd* que en los controles (Fig. 53A-F). Esta modificación es evidente en secciones de retina de animales *pcd/pcd* de 45 días (Fig. 53B), y puede constatarse igualmente en el resto de grupos de edad considerados en este estudio (Fig. 53C-F).

Sin embargo, aunque la pérdida de intensidad en la inmunorreactividad es visible en todo el intervalo temporal, sólo se demuestra una reducción significativa del número de células amacrininas positivas a calbindina en las retinas *pcd/pcd* respecto al silvestre en los dos últimos estadios, esto es, p180 y p270 (Gráfica 5).



	p45	p60	p90	p180	p270
Silvestres	15,33 ± 1,53	17,33 ± 1,53	13,40 ± 2,07	16,00 ± 2,16	15,33 ± 3,06
<i>pcd/pcd</i>	12,25 ± 1,26	13,25 ± 3,10	14,33 ± 2,58	12,50 ± 1,29	9,80 ± 2,59

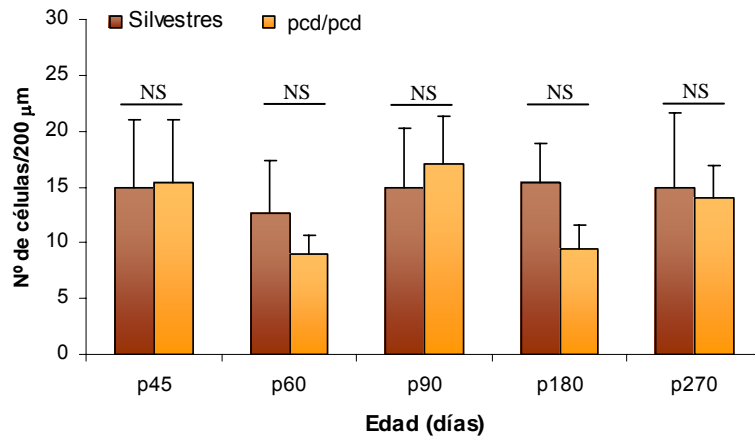
Gráfica 5. Número de células amacrininas inmunorreactivas a calbindina. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. Test de la T de Student (NS: no significativo, \*:  $p < 0,05$ ).

### 3.4.2.- Inmunorreactividad a calretinina

En las retinas de los animales silvestres, la CNI presenta numerosas células amacrininas positivas a calretinina en la mitad vitreal de la capa, estando más intensamente teñidas las más próximas a la CPI (Fig. 54A). Además, en la propia CPI se observan fuertemente marcadas tres bandas longitudinales paralelas entre sí, que corresponden a las ramificaciones inmunorreactivas de las células amacrininas (Fig. 54A). En la CCG, hay muchas células positivas a calretinina, si bien, como se mencionó con anterioridad, no es posible distinguir en este caso las células amacrininas desplazadas de las células ganglionares (Fig. 54A).

En las retinas de los animales *pcd/pcd*, el patrón de inmunorreactividad a calretinina es similar al que presentan los animales silvestres (Fig. 54B-F). De este modo, en todos los estadios de edad considerados, es posible identificar células amacrininas intensamente teñidas en la CNI, así como las tres bandas longitudinales marcadas de la CPI (Fig. 54B-F).

Al realizar el conteo de las células amacrininas positivas a calretinina en la CNV no se han hallado diferencias significativas entre las retinas de los animales mutantes respecto a los silvestres en ninguno de los estadios de edad considerados (Gráfica 6).



Gráfica 6. Número de células amacrininas inmunorreactivas a calretinina. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. Test de la T de Student (NS: no significativo).

	p45	p60	p90	p180	p270
Silvestres	15,00 ± 6,00	12,67 ± 4,73	15,00 ± 5,29	15,33 ± 3,51	15,00 ± 6,56
pcd/pcd	15,33 ± 5,69	9,00 ± 1,73	17,00 ± 4,36	9,40 ± 2,19	14,00 ± 2,92

### 3.4.3.- Doble marcaje calretinina/calbindina

Tanto en las retinas de los animales silvestres como en las de los ratones *pcd/pcd* pueden distinguirse tres subpoblaciones de células amacrininas en base a la expresión que presentan de estos marcadores: CR<sup>+</sup>/CB<sup>-</sup>, CR<sup>-</sup>/CB<sup>+</sup> y CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> (las menos numerosas) (Fig. 55A-B).

## 3.5.- MARCADORES DE SINAPSIS

### 3.5.1.- Inmunorreactividad a syntaxina

En los animales silvestres, la CPI muestra una intensa inmunorreactividad a syntaxina a lo largo de toda la extensión de la retina (Fig. 56A). Dentro de la propia CPI, destaca la tinción en la sublámina 5, claramente superior al resto (Fig. 56A). Además de la CPI, en las retinas de los animales silvestres también presenta inmunorreactividad a este marcador la CPE, si bien en este caso de forma ténue (Fig. 56A).

En las retinas de los animales *pcd/pcd* no se aprecian modificaciones en la inmunorreactividad a syntaxina, respecto a los animales controles durante el intervalo p45-180. Sin embargo, en animales *pcd/pcd* de 270 días se aprecia una evidente disminución de la



inmunorreactividad en ambas capas plexiformes (Fig. 56B). Así, apenas si llega a observarse tinción en la CPE, mientras que la intensidad de aquella está reducida en la CPI (Fig. 56B). A pesar de esta disminución, la sublámina 5 sigue apareciendo como la zona más destacada dentro de la CPI (Fig. 56B).

### **3.5.2.- Inmunorreactividad a sinapsina**

La inmunorreactividad a sinapsina en la retina de los animales silvestres se localiza en la CPI, la cual se tiñe en toda su extensión, aunque de manera más intensa en la sublámina 5 (Fig. 57A-B).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* presentan un patrón de inmunorreactividad a sinapsina muy similar al de los animales silvestres entre p45 y p180. Sin embargo, en animales *pcd/pcd* de 270 días de edad es posible observar un ligero, pero nítido, incremento de la inmunorreactividad a sinapsina en la sublámina 1 de la CPI, en relación a la misma zona de la retina de animales silvestres (Fig. 57C). No obstante, este aumento en la intensidad de la tinción en la sublámina 1 no es apreciable en toda la extensión de las retinas *pcd/pcd*, ya que en la periferia de estas retinas esta zona de la CPI no destaca especialmente, mostrando una intensidad de tinción similar a la que se observa en las retinas silvestres (Fig. 57D).

### **3.5.3.- Inmunorreactividad a bassoon**

En la retina de los animales silvestres ambas capas plexiformes presentan inmunorreactividad para bassoon, observable como un punteado, si bien el marcaje es visiblemente más intenso en la CPI (Fig. 58A). Asimismo, también es posible observar algunos puntos inmunorreactivos entre las células más vitreales de la CNI (Fig. 58A).

En los tres primeros estadios de edad considerados (p45-60-90), las retinas de los animales *pcd/pcd* muestran idéntica inmunorreactividad en ambas capas plexiformes a la que se observa en las retinas silvestres. Por contra, en animales *pcd/pcd* de 180 días, es posible apreciar una ligera disminución de la inmunorreactividad a bassoon en la CPE de la retina en relación a los animales silvestres de la misma edad. La reducción del marcaje en esta capa es aún más evidente en las retinas de animales *pcd/pcd* de 270 días de edad (Fig. 58B). Sin embargo, en la CPI de estas mismas retinas *pcd/pcd* (p180-270) no hemos encontrado modificaciones visibles en la inmunorreactividad a este marcador en comparación con las retinas de los respectivos animales controles (Fig. 58B).

## **4.- POBLACIONES GLIALES**

### **4.1.- CÉLULAS DE MÜLLER Y ASTROCITOS**

#### **4.1.1.- Inmunorreactividad a GFAP**

En la retina de los animales silvestres, la inmunorreactividad a GFAP se localiza en los astrocitos ubicados en la CFNO y en un número reducido de procesos transversales localizados en la periferia (Fig. 59A-B). Los procesos marcados de estos astrocitos están en estrecho contacto con los vasos sanguíneos, observándose alguno de estos procesos penetrando ligeramente en la retina acompañando a algún vaso sanguíneo. En las retinas estudiadas, los elementos marcados en la CFNO se concentran en la zona central, sobre todo cerca de la CNO. En cuanto a los procesos transversales teñidos en la periferia, éstos tienen su origen, probablemente, en las células de Müller.

En la retina de los animales *pcd/pcd*, la inmunorreactividad a GFAP aumenta de forma notable respecto a las retinas silvestres a medida que progresa la degeneración de los fotorreceptores (Fig. 59C-H). Este incremento es evidente tanto en la CFNO, donde aparecen mayor cantidad de procesos marcados, como en la periferia de la retina, donde se tiñen numerosos procesos transversales (Fig. 59C-H). El número de estos procesos transversales positivos a GFAP aumenta progresivamente a medida que los animales *pcd/pcd* envejecen, verificándose un gradiente periferia → centro (Fig. 59C-H).

Esta gliosis reactiva se verifica en las retinas *pcd/pcd* en todos los grupos de edad considerados (p45-270), aumentando el marcaje en la CFNO, así como el número de procesos transversales inmunorreactivos, a medida que la edad del animal *pcd/pcd* aumenta.

Además, a partir de p90, en la retina de los ratones *pcd/pcd* aparecen astrocitos intensamente teñidos en el interior de la CPI (Fig. 59C,E,G). Estos astrocitos se concentran mayoritariamente en la retina central. Morfológicamente, destacan por su gran tamaño y por presentar numerosos procesos largos e intensamente inmunorreactivos. Parte de estos procesos se dirige vitrealmente y contacta o bien con los vasos sanguíneos localizados en la CFNO, o bien con la MLI (Fig. 59C,E,G). Asimismo, otra parte de los procesos de estos grandes astrocitos discurre tangencialmente dentro de la CPI (Fig. 59C,E,G).

Por otra parte, el entrelazado que forman los procesos astrocitarios positivos a GFAP en la CFNO es más denso en los animales *pcd/pcd* que en los silvestres, observándose un incremento del número de “celdillas” formadas por los procesos astrocitarios en las retinas de los ratones mutantes (Fig. 63A,C,D,F).

#### **4.1.2.- Inmunorreactividad a EAAT-4**

El patrón de inmunorreactividad a EAAT-4 en las retinas de los animales silvestres es muy parecido al descrito para la GFAP. Así, es posible observar astrocitos marcados en la CFNO y un número muy reducido de procesos transversales inmunorreactivos en la periferia de la retina (Fig. 60A-B).

En las retinas de los animales *pcd/pcd* se aprecia un incremento de la inmunorreactividad a EAAT-4 a medida que progresa la degeneración de las células fotorreceptoras, análogo al observado al estudiar la inmunorreactividad a GFAP, aunque con menor extensión e intensidad (Fig. 60C-H). Este incremento es evidente en la CFNO, donde hay un aumento visible del número de elementos marcados (Fig. 60C,E,G). Asimismo, en la periferia de la retina de los animales *pcd/pcd* puede apreciarse un número progresivamente mayor de procesos transversales teñidos (Fig. 60D,F,H). La aparición de procesos inmunorreactivos en la periferia de las retinas *pcd/pcd* verifica un gradiente periferia → centro.

Al igual que en el caso de la GFAP, el incremento de inmunorreactividad a EAAT4 respecto al silvestre es apreciable en las retinas *pcd/pcd* en todos los grupos de edad considerados, incrementándose la tinción en la CFNO y el número de procesos transversales inmunorreactivos en la periferia a lo largo del intervalo p45-270.

Por otra parte, en contra de lo observado con anticuerpos contra GFAP, no se han encontrado astrocitos positivos a EAAT-4 en la CPI en ninguna de las secciones de retinas *pcd/pcd* estudiadas.

#### **4.1.3.- Inmunorreactividad a S100**

En la retina de los animales silvestres presentan inmunorreactividad a S100 algunas células de Müller y los astrocitos de la CFNO (Fig. 61A).

Los somas de las células de Müller positivos a S100 se hallan en la CNI, ubicados al mismo nivel dentro de la capa (hacia la mitad de la misma o ligeramente esclerales). Como consecuencia de esta disposición, en una sección transversal de retina, puede observarse una hilera ordenada de cuerpos de células de Müller inmunorreactivos que se disponen longitudinalmente a la CNI (Fig. 61C). Del soma de las células de Müller parten, en sentidos opuestos, dos procesos inmunorreactivos a S100, ambos perpendiculares al eje mayor de la retina.

En la retina de los animales silvestres, la MLI aparece intensamente teñida (Fig. 61E). Por contra, se aprecia poca inmunorreactividad en las capas externas de la retina, por lo que la MLE presenta escaso o nulo marcaje (Fig. 61A).

Por su parte, los astrocitos de la CFNO demuestran una intensa inmunorreactividad a S100, tanto en su cuerpo celular como en sus numerosos procesos. Estos procesos astrocitarios forman una malla y presentan una estrecha relación con los vasos sanguíneos que discurren por la zona (Figs. 62A y 63B-C).

De forma general, las retinas de los animales *pcd/pcd* conservan el patrón de inmunorreactividad que acabamos de describir para los animales silvestres. Así, en las retinas *pcd/pcd* se marcan con S100 algunas células de Müller y los astrocitos de la CFNO (Fig. 61B). No obstante, es posible apreciar algunas diferencias en el mismo.

La modificación más evidente es la disposición alterada de los cuerpos celulares de las células de Müller que, en una sección transversal de retina *pcd/pcd*, no aparecen como aquella ordenada hilera longitudinal de cuerpos celulares positivos a S100 vista en los animales silvestres (Fig. 61E), sino que se disponen a diferentes niveles dentro de la CNI, generalmente más esclerales de lo habitual (Fig. 61D). Además, en las retinas *pcd/pcd* se observa un ligero incremento de la inmunorreactividad a S100 en los procesos de estas células en las capas CNI y CPI (Fig. 61B y D).

En cuanto a la población astrocitaria, la malla que forman los procesos de estas células en la CFNO es más densa en las retinas de los animales *pcd/pcd* que en su contrapartida silvestre (Figs. 61F, 62B y 63E-F). La inmunorreactividad a S100 en esta capa es especialmente intensa alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 62B).

El patrón temporal que siguen estas alteraciones en la inmunorreactividad a S100 en las retinas *pcd/pcd* es similar al descrito en los casos de las proteínas GFAP y EAAT4; esto es, un progresivo incremento a medida que la edad de los animales *pcd/pcd* aumenta.

#### **4.1.4.- Inmunorreactividad a glutamina sintetasa (GS)**

En la retina de los animales silvestres, la práctica totalidad de las células de Müller muestra inmunorreactividad a GS, tanto las ubicadas en la zona central de la retina como las que están localizadas en la periferia de la misma (Fig. 64A-B). En estas células, la tinción aparece tanto en el cuerpo celular como en sus extensas prolongaciones.

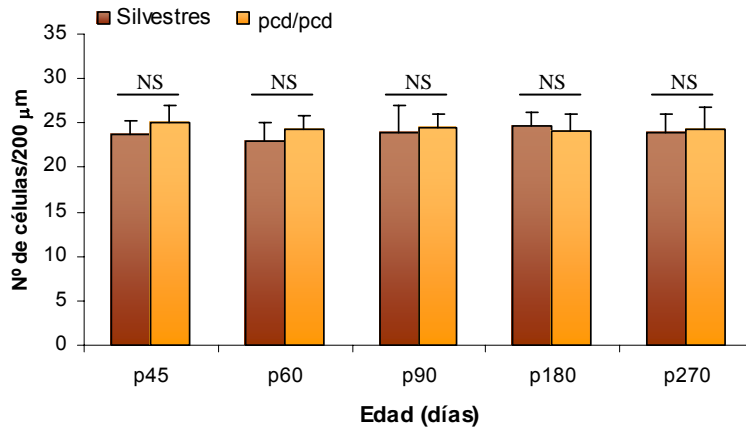
Los cuerpos celulares de las células de Müller positivos a GS se hallan en la CNI, localizados todos ellos al mismo nivel dentro de esta capa (hacia la mitad de la misma o ligeramente esclerales). Debido a esta disposición, en una sección transversal de retina se observa una ordenada hilera de cuerpos celulares marcados que recorre longitudinalmente la CNI (Fig. 65A).

Del cuerpo de las células de Müller parten, en sentidos opuestos, dos procesos positivos a GS, ambos perpendiculares al eje mayor de la retina. Uno de estos procesos discurre por las capas más internas de la retina y alcanza la MLI; mientras que el otro discurre por las capas externas de la retina hasta alcanzar la MLE. La inmunorreactividad a GS en estos procesos no es homogénea en toda la longitud de los mismos, pudiéndose observar tramos donde la tinción es especialmente débil o, incluso, nula. En la retina de los animales silvestres, ambas membranas limitantes se tiñen de manera intensa (especialmente la MLI) en toda su extensión (Fig. 65C).

Por último, conviene destacar que, en las retinas de los animales silvestres, los procesos esclerales de las células de Müller se ramifican lateralmente en la CPE. Como consecuencia de ello, en secciones transversales de retina es posible observar una banda inmunorreactiva a GS que recorre longitudinalmente la CPE (Fig. 65E).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* conservan sus poblaciones de células de Müller positivas a GS, tanto en la zona central de la retina como en la periferia de la misma (Fig. 64C-

D). A este respecto, no hemos encontrado diferencias significativas en el número de células de Müller marcadas con GS entre retinas de animales silvestres y *pcd/pcd* en ninguno de los estadios de edad considerados en este trabajo de Tesis (Gráfica 7).



	p45	p60	p90	p180	p270
Silvestres	23,67 ± 1,53	23,00 ± 2,00	24,00 ± 3,00	24,67 ± 1,53	24,00 ± 2,00
<i>pcd/pcd</i>	25,00 ± 2,00	24,33 ± 1,53	24,50 ± 1,50	24,17 ± 1,89	24,33 ± 2,52

Gráfica 7. Número de células de Müller marcadas con GS. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).

No obstante, es posible observar algunas modificaciones en el patrón de inmunorreactividad a este marcador en las retinas de animales *pcd/pcd* respecto a lo descrito para los animales silvestres. Estas variaciones son evidentes a partir de p90 (verificándose un patrón de tinción muy similar entre animales silvestres y *pcd/pcd* en el intervalo p45-60) y, al igual que en los casos anteriores, se acentúan a medida que los ratones *pcd/pcd* envejecen.

Un cambio particularmente notorio es la disposición alterada de los cuerpos de las células de Müller dentro de la CNI. Así, en una sección transversal de retina *pcd/pcd* ya no se observa una hilera longitudinal de cuerpos celulares positivos a GS, sino que éstos se disponen a diferentes niveles dentro de la CNI, generalmente más esclerales de lo habitual (Fig. 65B).

También se observan ligeras variaciones en el patrón de tinción de los procesos esclerales de las células de Müller. En este sentido, la diferencia más notable es la menor presencia de ramificaciones laterales inmunorreactivas a GS en torno al límite entre las capas CNI y CPE, con lo cual deja de observarse la nítida banda inmunorreactiva descrita en las retinas de animales silvestres (Fig. 65F).

Por último, en las retinas *pcd/pcd*, la tinción de la MLE no es homogénea en toda su extensión. Así, mientras que unas zonas presentan una intensa inmunorreactividad en la MLE, en otras apenas se observa marcaje en dicha membrana (Fig. 65D).

## **4.2.- CÉLULAS DE MICROGLIA**

### **4.2.1.- Marcaje con Tx-100 e IgG anti-IgG de ratón**

En las retinas de los animales silvestres se observan células microgliales ramificadas, con procesos delgados y numerosos, morfología típica de las células microgliales no activadas (Fig.66A). Estas células microgliales se ubican en ambas capas plexiformes y nunca aparecen entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores (Fig. 66B).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* también presentan numerosas células microgliales teñidas distribuidas en ambas capas plexiformes (Fig. 66C,E,G). Estas células de microglía conservan la apariencia estrellada, con procesos celulares en disposición radial (Fig. 66C,E,G). Además de las emplazadas en las capas plexiformes, en las retinas de los animales *pcd/pcd* destaca la presencia de células microgliales entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores (Fig. 66D,F,H). Esta subpoblación de células de microglía se tiñe de forma intensa y se caracteriza morfológicamente por un cuerpo celular de gran tamaño, así como por ramificaciones cortas y robustas que se disponen entre los segmentos de los fotorreceptores (Fig. 66D,F,H). La presencia de células microgliales en las capas más externas de la retina se aprecia ya en animales *pcd/pcd* de 45 días, manteniéndose en estos animales a lo largo del intervalo temporal considerado en este trabajo.

### **4.2.2.- Inmunorreactividad a Iba 1**

El marcaje con anticuerpos contra la proteína iba1 muestra un patrón muy similar al que se describe en el apartado anterior. De este modo, en la retina de los animales silvestres aparecen células microgliales inmunorreactivas a iba1 en ambas capas plexiformes (Fig. 67A). Estas células microgliales se caracterizan por su morfología estrellada, con largos procesos en disposición radial (Fig. 67A). No hemos encontrado inmunorreactividad a iba1 entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores en ninguna de las secciones de retinas silvestres estudiadas.

Por su parte, las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd* presentan células microgliales positivas a iba1 en ambas capas plexiformes y entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores (Fig. 67B-F). En las capas plexiformes, las células microgliales marcadas muestran procesos largos en disposición radial; mientras que las ubicadas en las capas más externas de la retina se caracterizan por un cuerpo celular intensamente inmunorreactivo y por ramificaciones cortas y robustas distribuidas entre los segmentos de los fotorreceptores (Fig. 67B-F). La presencia de células de microglía positivas a iba1 en las capas CNE y SF es una constante en los animales *pcd/pcd* desde p45, pudiéndose observar en secciones de retina de todos los grupos de edad considerados en este estudio (Fig. 67B-F).

Aunque no hemos realizado el recuento de células microgliales marcadas con iba1, se puede apreciar un incremento del número de células de microglía inmunorreactivas en las capas plexiformes de las retinas *pcd/pcd* en relación a la de los animales silvestres.

#### **4.2.3.- Inmunorreactividad a CD68. Doble marcaje CD68/iba1**

En las retinas de los animales silvestres no se aprecian células inmunorreactivas a CD68, un marcador proteico usado para localizar células de microglía activada (Fig. 68A-B). Esta ausencia de marcaje en los animales silvestres se confirma en todo el intervalo de edades considerado en este estudio.

Por contra, las retinas de los animales *pcd/pcd* si presentan células positivas a CD68 (Fig. 68C,E,G). Estas células se localizan entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores, sin que hayamos podido demostrar su existencia en otras capas de la retina en ninguno de los estadios de edad considerados (Fig. 68D,F,H).

Las células positivas a CD68 lo son también a iba1, lo que confirma la naturaleza microglial de las mismas (Fig. 68D,F,H). No obstante, la co-localización de los dos marcadores no se demuestra en toda la extensión de estas células.

La presencia de células de microglía positivas a CD68 (activadas) en las capas más externas de la retina es constatable en los animales *pcd/pcd* de 45 días de edad y es una constante en estos animales en el intervalo de p45 a p270 (Fig. 68C-H).

#### **4.2.4.- Inmunorreactividad a NOSi**

Las retinas de los animales silvestres no demuestran inmunorreactividad a la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (Fig. 69A). Esta ausencia de marcaje en los animales silvestres se verifica en todos los grupos de edad considerados.

Al contrario que en los animales silvestres, en las retinas de los animales *pcd/pcd* es posible observar con claridad células positivas a NOSi entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores (Fig. 69B-F). La presencia de células y procesos marcados en las capas externas de la retina es detectable en los animales *pcd/pcd* a lo largo de todo el intervalo p45-270 (Fig. 69B-F). Además, en la CPE llegan a apreciarse algunas células y procesos inmunorreactivos al marcador en los últimos estadios de edad considerados (p180-270)(Fig. 69E-F). Por contra, no hemos encontrado elementos inmunorreactivos a NOSi en las capas más internas de estas mismas retinas en ninguno de los grupos de edad.

#### **4.2.5.- Otros marcadores: inmunorreactividad a H5A5 y MHC\_II**

Además de los marcadores anteriores, se emplearon anticuerpos contra H5A5 y MHC\_II para localizar las células microgliales. El patrón espacial y temporal de marcaje con estos dos tipos de anticuerpos es idéntico al descrito en el caso de la inmunorreactividad a iba1, tanto para los animales silvestres como los *pcd/pcd*.

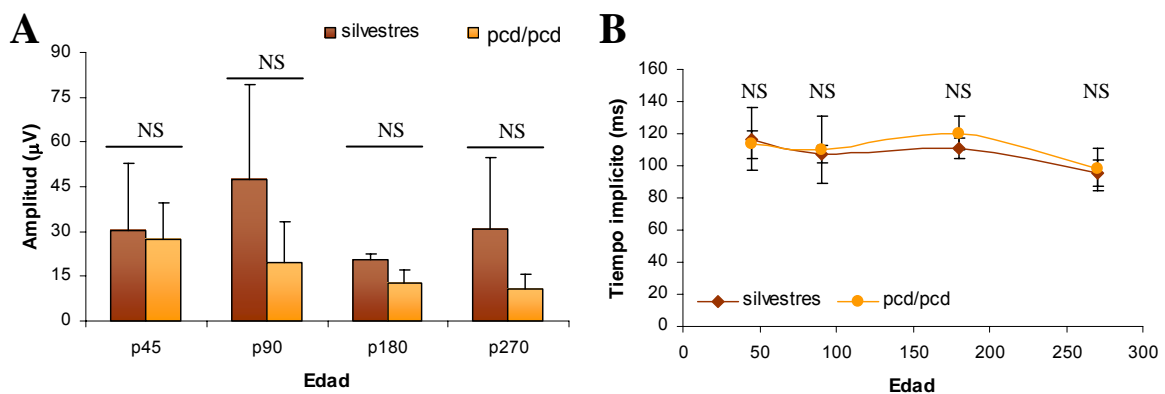
## 5.- ELECTORRETINOGRAMA

### 5.1.- RESPUESTA ESCOTÓPICA UMBRAL (STR)

#### 5.1.1.- STR positivo

En los animales silvestres, la amplitud del STR positivo presenta cierto grado de variabilidad, aunque se puede distinguir un valor máximo a p90 y una moderada disminución con el envejecimiento (Fig. 70A; Gráfica 8). El tiempo implícito permanece constante en torno a los 100-110 ms (Fig. 70A; Gráfica 8).

En los animales mutantes *pcd/pcd*, lo primero a destacar es la presencia de respuesta en todos los estadios de edad considerados, lo que supone que las retinas de los ratones *pcd/pcd* conservan la capacidad de responder a estímulos luminosos de muy baja intensidad, incluso cuando la pérdida de células fotorreceptoras es más que notable (p270) (Fig. 70B; Gráfico 8). La amplitud de la respuesta a p45 en los ratones *pcd/pcd* es prácticamente idéntica a su contrapartida silvestre (Fig. 70B; Gráfico 8). A partir de este estadio, la amplitud del STR en las retinas *pcd/pcd* disminuye progresiva y linealmente, permaneciendo siempre por debajo del valor de las retinas silvestres (Fig. 70B; Gráfico 8). En los ratones *pcd/pcd* no hemos encontrado variaciones significativas en el momento de aparición de la respuesta (tiempo implícito) en comparación con los animales silvestres (Fig. 70B; Gráfico 8).



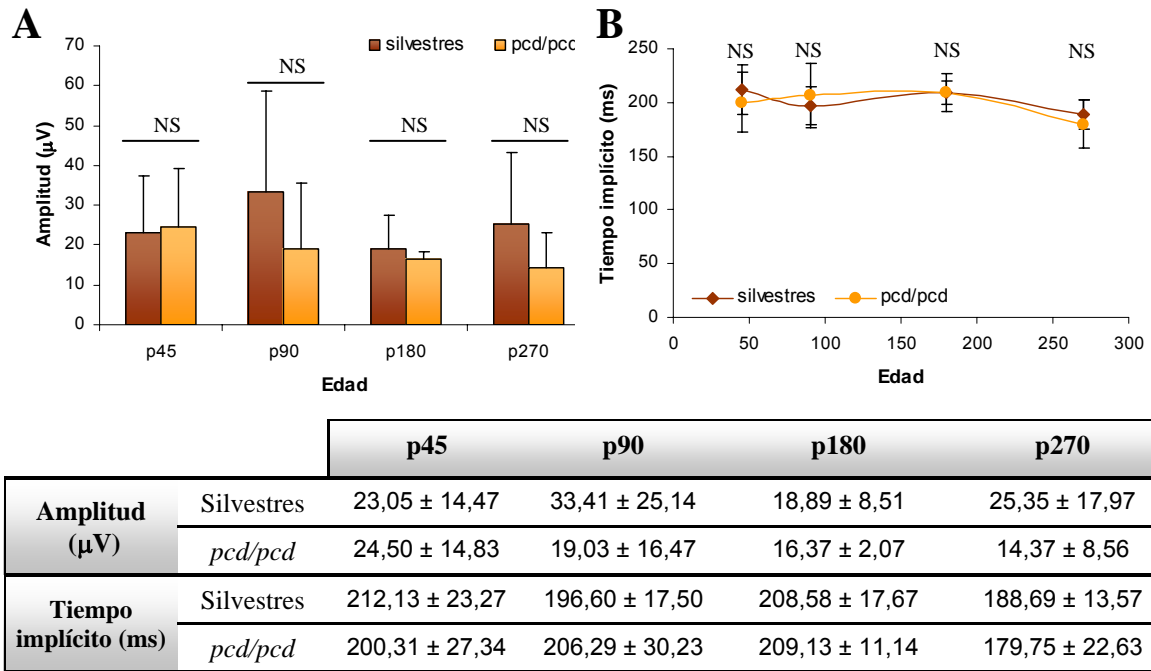
		p45	p90	p180	p270
Amplitud (µV)	Silvestres	30,39 ± 22,27	47,41 ± 32,02	20,77 ± 1,72	31,02 ± 23,60
	<i>pcd/pcd</i>	27,43 ± 12,27	19,65 ± 13,77	12,88 ± 4,40	10,85 ± 4,95
Tiempo implícito (ms)	Silvestres	116,81 ± 19,77	107,15 ± 5,24	111,08 ± 6,54	95,38 ± 8,26
	<i>pcd/pcd</i>	113,31 ± 8,61	110,13 ± 20,97	120,13 ± 10,43	97,75 ± 13,08

Gráfica 8. STR positivo. A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).



### 5.1.2.- STR negativo

El patrón del STR negativo es muy similar al descrito en el STR positivo. Así, los animales silvestres presentan un máximo de amplitud a p90 y una cierta disminución con el envejecimiento (Fig. 70A; Gráfica 9). El tiempo implícito se sitúa en torno a 200 ms, con ligeras variaciones por encima y por debajo de este valor (Fig. 70A; Gráfica 9).



Gráfica 9. STR negativo. A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. Test de la T de Student (NS: no significativo).

Las retinas *pcd/pcd* presentan respuesta STR negativa en todos los estadios de edad considerados (Fig. 70B; Gráfica 9). Al igual que sucedía con el STR positivo, la amplitud de la respuesta a p45 en los ratones *pcd/pcd* es prácticamente idéntica a la de los animales silvestres de la misma edad. A partir de este estadio, la amplitud del STR negativo disminuye progresiva y linealmente con la edad, siendo siempre inferior al valor que muestran los animales silvestres (Fig. 70B; Gráfica 9).

No hemos encontrado diferencias significativas en el tiempo implícito entre animales silvestres y animales mutantes *pcd/pcd* (Fig. 70B; Gráfica 9).

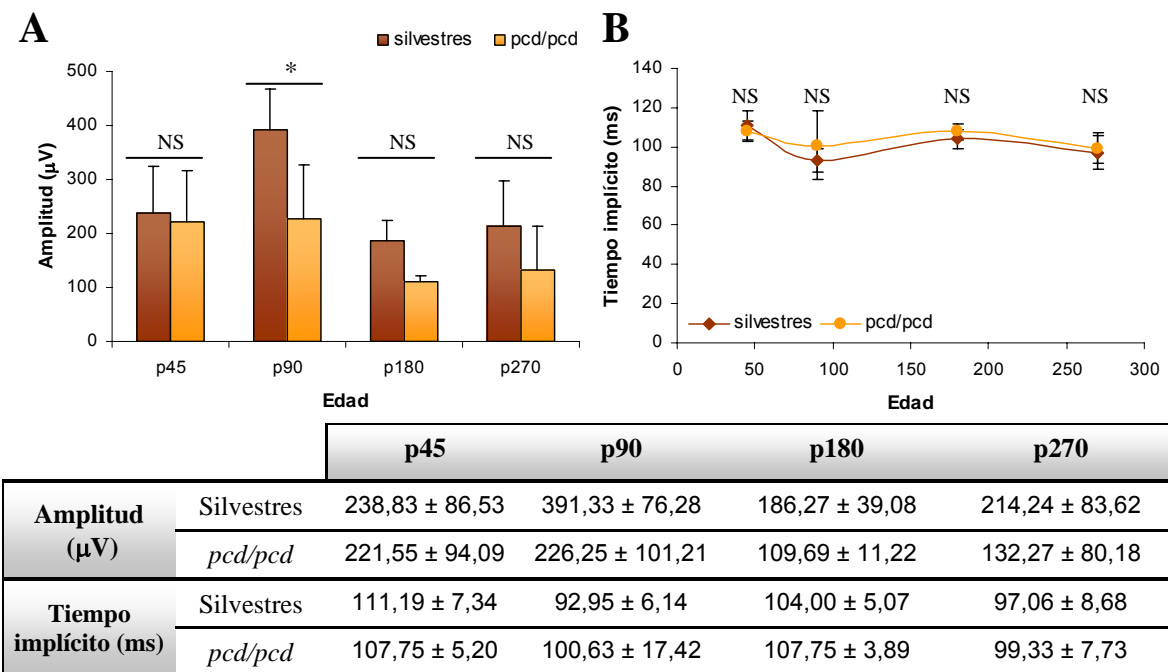
### 5.2.- RESPUESTA DE BASTONES

En los animales silvestres, la amplitud de la respuesta de bastones muestra un patrón similar al descrito para la respuesta STR, con un máximo en p90 y una moderada disminución en estadios de edad más avanzados (Fig. 71A; Gráfica 10). El valor del tiempo implícito se sitúa en torno a los 100 ms, con ligeras variaciones por encima y por debajo de este valor (Fig. 71A; Gráfica 10).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* presentan respuesta en todos los estadios de edad estudiados, incluido p270, edad a la que se ha descrito una pérdida sustancial de bastones (Fig. 71B; Gráfica 10). A p45, la amplitud de la respuesta es prácticamente idéntica en animales silvestres y mutantes. A partir de este estadio, la amplitud de la respuesta de bastones disminuye con la edad en los ratones *pcd/pcd*, hallándose valores inferiores a los que se verifican en las retinas de los animales silvestres; si bien, tan solo en el estadio de p90 la diferencia alcanza la significancia estadística (Fig. 71B; Gráfica 10).

Por otra parte, la disminución de amplitud de la onda b de bastones en los ratones *pcd/pcd* no es tan lineal como la observada en el STR en estos mismos animales.

No se han encontrado modificaciones significativas en el valor del tiempo implícito entre animales silvestres y mutantes *pcd/pcd* (Fig. 71B; Gráfica 10).



**Gráfica 10. Respuesta de bastones. Onda b.** A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$ ).

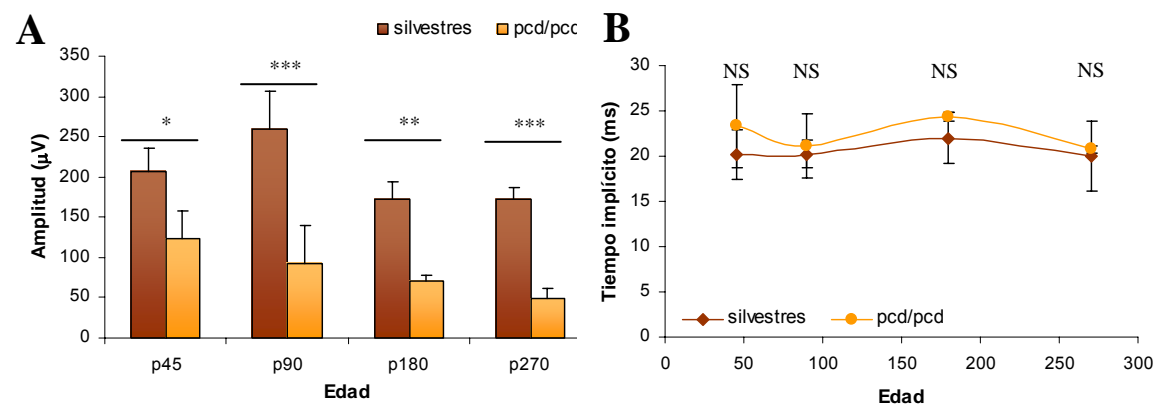
### 5.3.- RESPUESTA ESCOTÓPICA MIXTA

#### 5.3.1.- Onda a

En los animales silvestres, la amplitud de la onda a escotópica sigue el patrón descrito con anterioridad, esto es, un valor máximo a p90 y una ligera disminución en los estadios de edad más avanzados (Fig. 72A; Gráfica 11). El valor del tiempo implícito se sitúa en torno a 20 ms, sin que se demuestren variaciones con el envejecimiento (Fig. 72A; Gráfica 11).

Las retinas de los ratones *pcd/pcd* de todas las edades consideradas fueron capaces de generar ondas a escotópicas medibles (Fig. 72B; Gráfica 11). Sin embargo, contrariamente a los casos anteriores, la amplitud de la onda ya es sensiblemente inferior en el ratón *pcd/pcd* respecto al silvestre en el primer estadio de edad considerado (p45) (Fig. 72B; Gráfica 11). En los animales *pcd/pcd* la amplitud de la onda a escotópica disminuye progresiva y linealmente con la edad, situándose su valor siempre por debajo del valor que muestran los animales silvestres (Fig. 72B; Gráfica 11). Las diferencias en la amplitud de la onda a escotópica mixta entre ambos tipos de animales son significativas estadísticamente en todos los estadios de edad considerados (Gráfica 11).

En cuanto al tiempo implícito de la onda a escotópica, no hay diferencias significativas en su valor entre animales mutantes *pcd/pcd* y su contrapartida silvestre (Fig. 72B; Gráfica 11).



		p45	p90	p180	p270
Amplitud (µV)	Silvestres	206,33 ± 29,96	259,92 ± 46,85	172,70 ± 21,19	172,58 ± 15,04
	<i>pcd/pcd</i>	123,19 ± 35,41	92,40 ± 47,48	71,09 ± 6,68	49,44 ± 12,29
Tiempo implícito (ms)	Silvestres	20,19 ± 2,74	20,20 ± 1,50	22,00 ± 2,84	20,00 ± 3,86
	<i>pcd/pcd</i>	23,31 ± 4,64	21,13 ± 3,50	24,38 ± 0,53	20,75 ± 0,43

Gráfica 11. Respuesta escotópica mixta de conos y bastones. Onda a. A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. Test de la T de Student (NS: no significativo; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

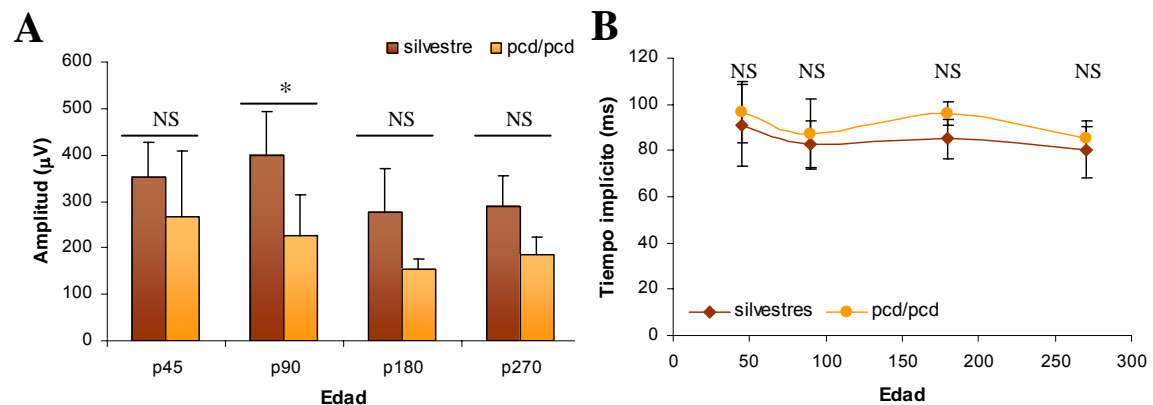
### 5.3.2.- Onda b

De nuevo, en los animales silvestres, el máximo valor de amplitud se registra a p90, midiéndose valores ligeramente inferiores en estadios de edad posteriores (Fig. 72A; Gráfica 12). El tiempo implícito de la onda b escotópica mixta se sitúa en torno a 85 ms, con ligeras variaciones por encima y por debajo de este valor (Fig. 72A; Gráfica 12).

Las retinas de los ratones *pcd/pcd* presentan ondas b escotópicas medibles en todas las edades de estudio (Fig. 72B; Gráfica 12). La amplitud de la onda b escotópica mixta disminuye progresiva y cuasi-linealmente en estos animales a partir de p45 (la linearidad se rompe entre

p180 y p270, ya que en estos dos estadios el valor de la amplitud es muy similar) (Fig. 72B; Gráfica 12).

A lo largo de todo el intervalo p45-270 se observa una reducción del valor de la amplitud de esta onda en las retinas *pcd/pcd*, respecto a su contrapartida silvestre; si bien, solo se alcanza la significancia estadística en el estadio p90. Por contra, no hemos encontrado variaciones significativas en el valor del tiempo implícito entre animales silvestres y *pcd/pcd* (Gráfica 12).



		p45	p90	p180	p270
<b>Amplitud (µV)</b>	Silvestres	352,70 ± 75,67	398,03 ± 95,57	277,60 ± 93,60	289,84 ± 65,41
	<i>pcd/pcd</i>	268,12 ± 139,05	226,38 ± 88,03	153,33 ± 24,15	185,48 ± 38,81
<b>Tiempo implícito (ms)</b>	Silvestres	91,00 ± 17,52	82,80 ± 9,88	85,08 ± 8,39	80,50 ± 12,34
	<i>pcd/pcd</i>	96,69 ± 13,46	87,08 ± 15,16	96,00 ± 4,95	85,42 ± 5,19

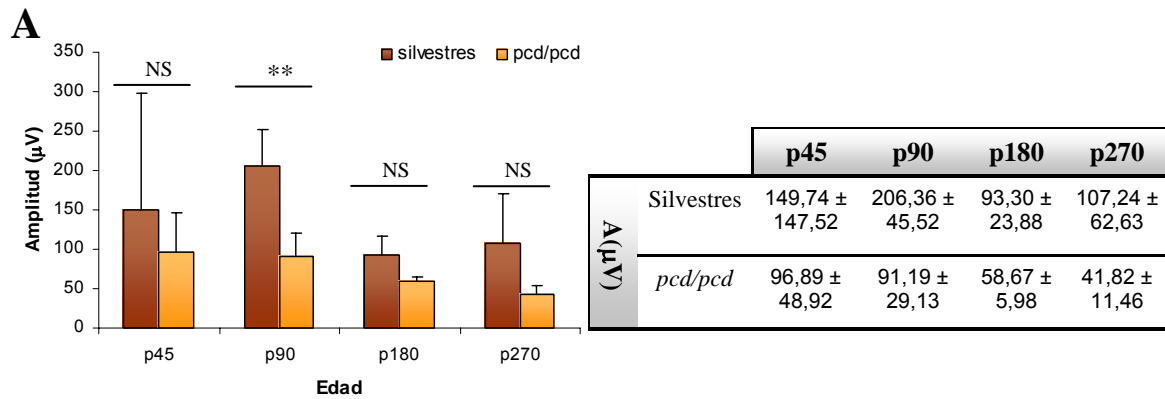
**Gráfica 12. Respuesta escotópica mixta de conos y bastones. Onda b. A.** Amplitud de la respuesta. **B.** Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.- POTENCIALES OSCILATORIOS

En las retinas de los animales silvestres, la máxima amplitud de los potenciales oscilatorios se registra en el estadio de edad p90 (Fig. 73A; Gráfica 13). En estadios posteriores, la amplitud disminuye sensiblemente (Fig. 73A; Gráfica 13).

En los ratones *pcd/pcd* es posible el registro de los potenciales oscilatorios en todas las edades consideradas (Fig. 73B; Gráfica 13), aunque se aprecia que la amplitud de la respuesta disminuye progresiva y linealmente con la edad (Fig. 73B; Gráfica 13).

Por otra parte, el valor de la amplitud máxima de los potenciales oscilatorios es inferior en las retinas *pcd/pcd* respecto a los animales controles en todos los grupos de edad estudiados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a p90 (Gráfica 13).

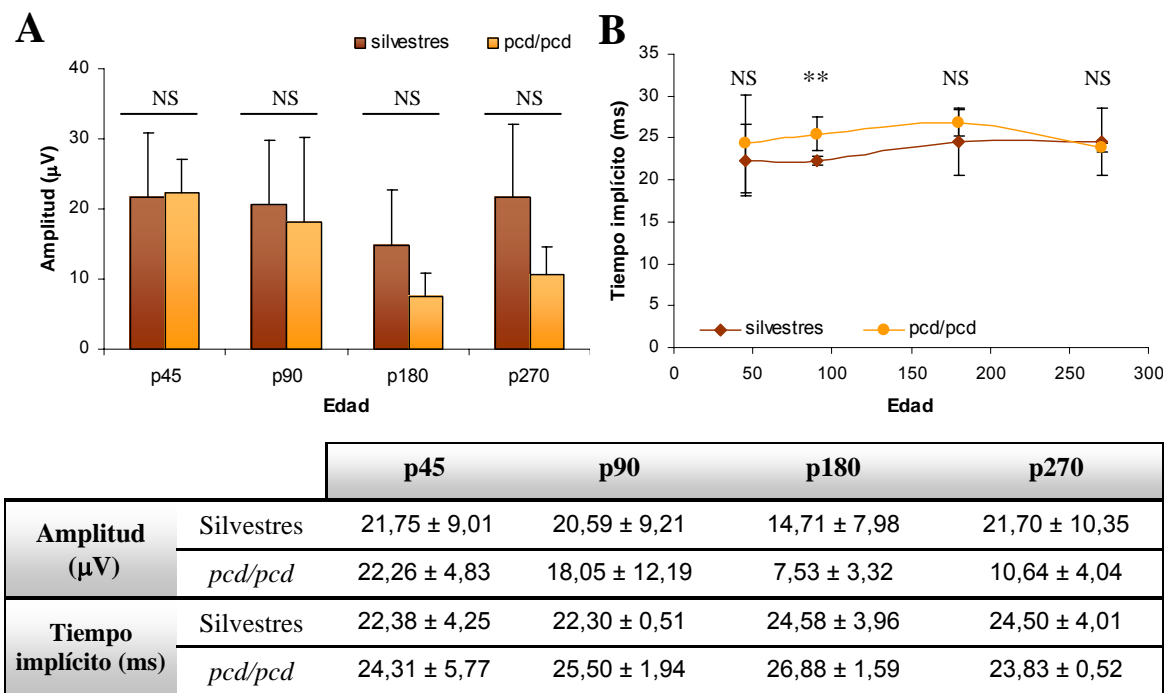


Gráfica 13. Potenciales oscilatorios. A. Amplitud de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo; \*\*:  $p < 0,01$ ).

## 5.5.- RESPUESTAS DE CONOS

### 5.5.1.- Onda a fotópica

En los animales silvestres, el registro de la onda a fotópica rompe el patrón descrito en los trazados electroretinográficos anteriores. Así, el valor de la amplitud no muestra cambios significativos en función de la edad, situándose en torno a los 20-21  $\mu\text{V}$  (Fig. 74A; Gráfica 14). Tampoco hemos encontrado influencia significativa de la edad sobre el tiempo implícito de la onda, cuyo valor está comprendido en todos los casos entre 22-24 ms (Fig. 74A; Gráfica 14).



Gráfica 14. Respuestas de conos. Onda a fotópica. A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo; \*\*:  $p < 0,01$ ).

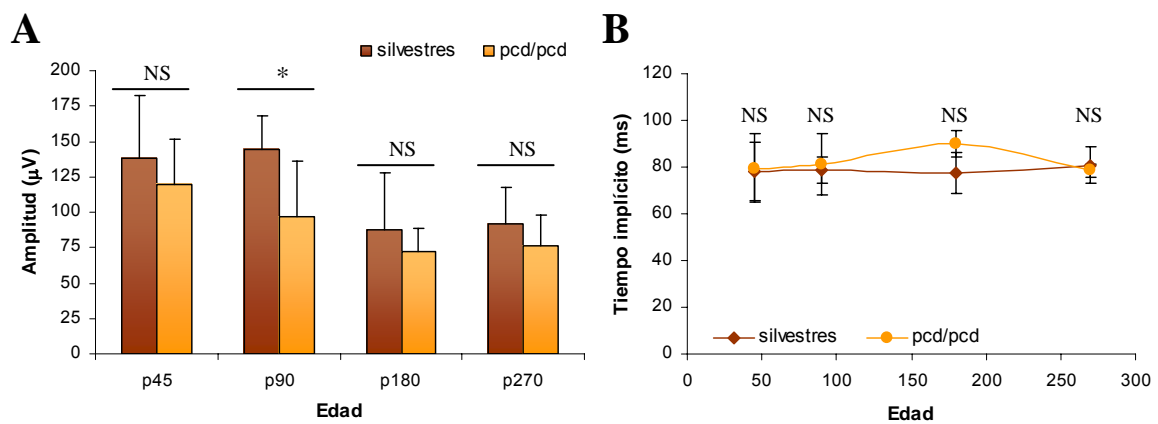
Los ratones *pcd/pcd* presentan ondas a fotópicas medibles en todos los grupos de edad considerados (Fig. 74B; Gráfica 14). Entre p45 y p90, el valor de la amplitud es esencialmente idéntico entre ratones *pcd/pcd* y silvestres. A partir de estos estadios, la amplitud de la onda a fotópica decae sensiblemente en los animales *pcd/pcd*, mostrando valores inferiores respecto a los animales silvestres (Fig. 74B; Gráfica 14).

En cuanto al tiempo implícito de la onda a fotópica, se observa un cierto retraso de la respuesta en los animales *pcd/pcd* de 90 y 180 días de edad (Fig. 74B; Gráfica 14).

### 5.5.2.- Onda b fotópica

En el registro de la onda b fotópica de los ratones silvestres volvemos a encontrar una amplitud máxima a los 90 días de edad del animal y una disminución de dicha amplitud en estadios posteriores (Fig. 74A; Gráfica 15). El tiempo implícito de la respuesta toma valores comprendidos entre 78-80 ms, sin que se hayan verificado variaciones significativas en función de la edad (Fig. 74A; Gráfica 15).

En los ratones *pcd/pcd*, la máxima respuesta se registra a p45 y a partir de esta edad se produce una disminución progresiva, lenta y lineal de la amplitud de la onda b fotópica (Fig. 74B; Gráfica 15). A pesar de que el valor de la amplitud es inferior en los ratones *pcd/pcd* respecto al silvestre en todos los estadios de edad considerados, estas diferencias son poco acusadas (Fig. 74B; Gráfica 15). La mayor distancia entre los dos grupos de animales se observa a p90, edad a la cual la disminución del valor de la amplitud de la onda b fotópica en los ratones *pcd/pcd*



		p45	p90	p180	p270
Amplitud (µV)	Silvestres	137,80 ± 44,65	144,52 ± 24,01	87,34 ± 40,39	91,30 ± 26,18
	<i>pcd/pcd</i>	120,00 ± 31,77	96,84 ± 38,98	71,80 ± 16,85	75,94 ± 21,82
Tiempo implícito (ms)	Silvestres	78,19 ± 12,54	78,75 ± 5,36	77,67 ± 8,80	80,94 ± 7,96
	<i>pcd/pcd</i>	79,63 ± 14,76	81,40 ± 13,11	90,13 ± 5,48	78,67 ± 2,74

Gráfica 15. Respuestas de conos. Onda b fotópica. A. Amplitud de la respuesta. B. Tiempo implícito de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. Test de la T de Student (NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$ ).

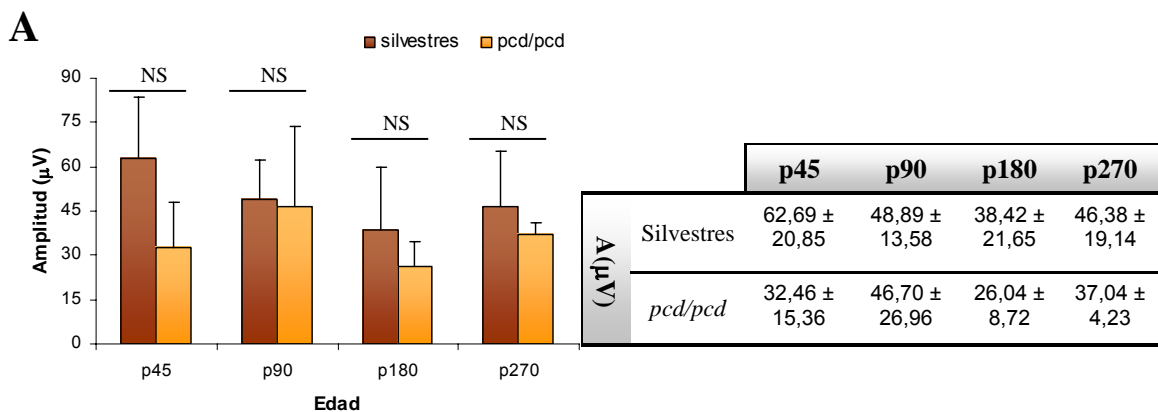
respecto al control es significativa estadísticamente (Gráfica 15).

El tiempo implícito de la respuesta es prácticamente idéntico en los ratones *pcd/pcd* y silvestres en todos los estadios de edad, a excepción de p180 donde se observa un ligero retraso de la onda en los ratones *pcd/pcd*, si bien estas diferencias no son significativas (Fig. 74B; Gráfica 15).

### 5.5.3.- Respuesta flicker (20 Hz)

El patrón de la amplitud de la respuesta flicker en función de la edad es ciertamente irregular, tanto en los animales silvestres como en los mutantes *pcd/pcd*, sin que hayamos podido establecer una tendencia clara en ninguno de los dos grupos de animales (Fig. 75A-B; Gráfica 16).

En cualquier caso, es necesario destacar que los ratones *pcd/pcd* presentan respuesta flicker en todos los estadios de edad estudiados (Fig. 75B; Gráfica 16). Además, el valor de la amplitud se mantiene constante para cada onda en cada registro en las retinas *pcd/pcd*; dicho de otro modo, las ondas no sufren atenuaciones en los últimos flashes (Fig. 75B).



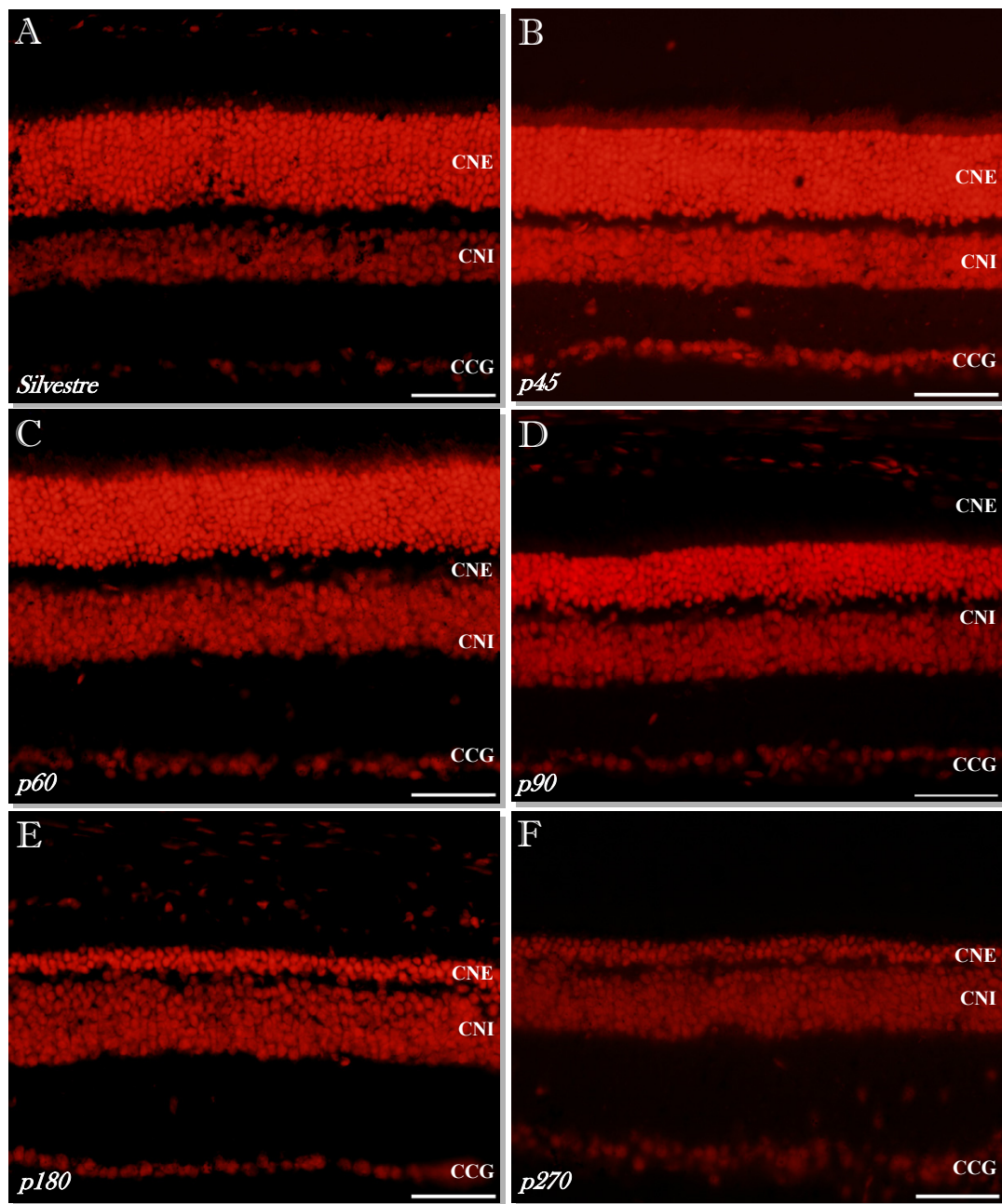
**Gráfica 16. Respuestas de conos. Flicker (20Hz). A.** Amplitud de la respuesta. En la tabla se adjunta el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* (NS: no significativo).



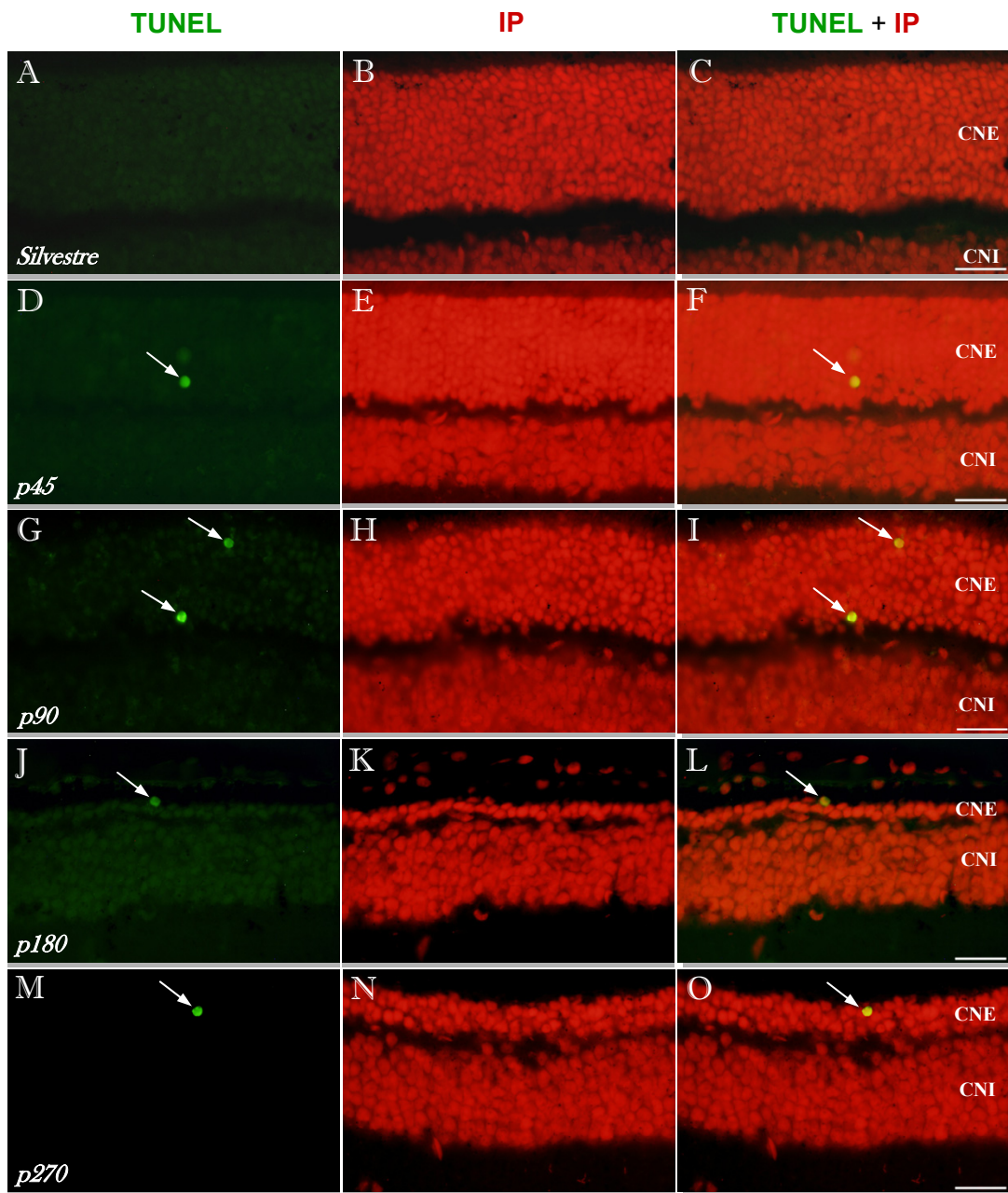
# Iconografía

---



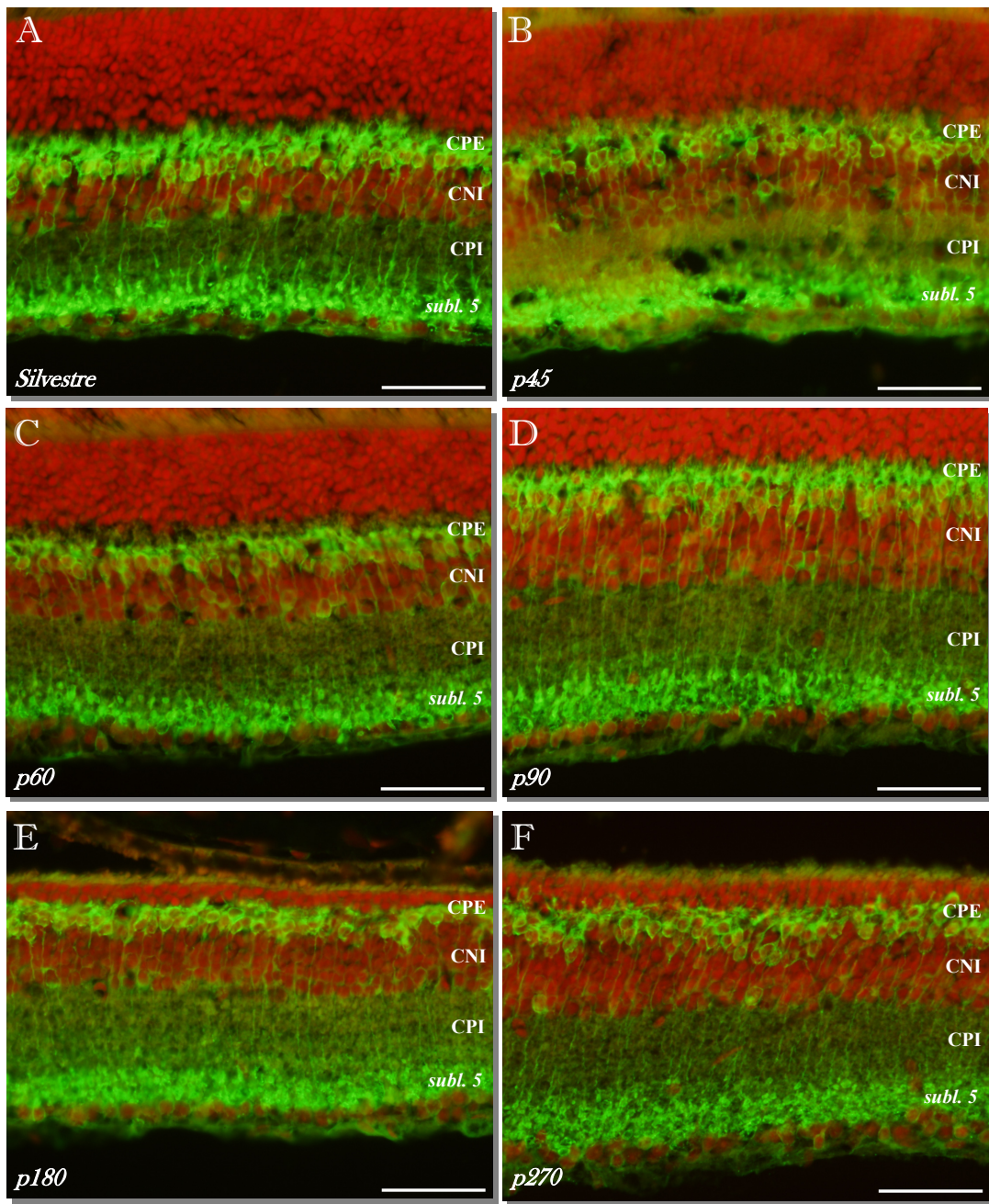


**FIGURA 47. ESTRUCTURA DE LA RETINA: Tinción nuclear con yoduro de propidio.** A. Sección transversal de una retina de un animal silvestre. B-F. Secciones transversales de retinas de animales *pcd/pcd* de edades comprendidas entre 45 y 270 días post-natales. En las retinas *pcd/pcd* la CNE sufre una progresiva pérdida de células fotorreceptoras. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

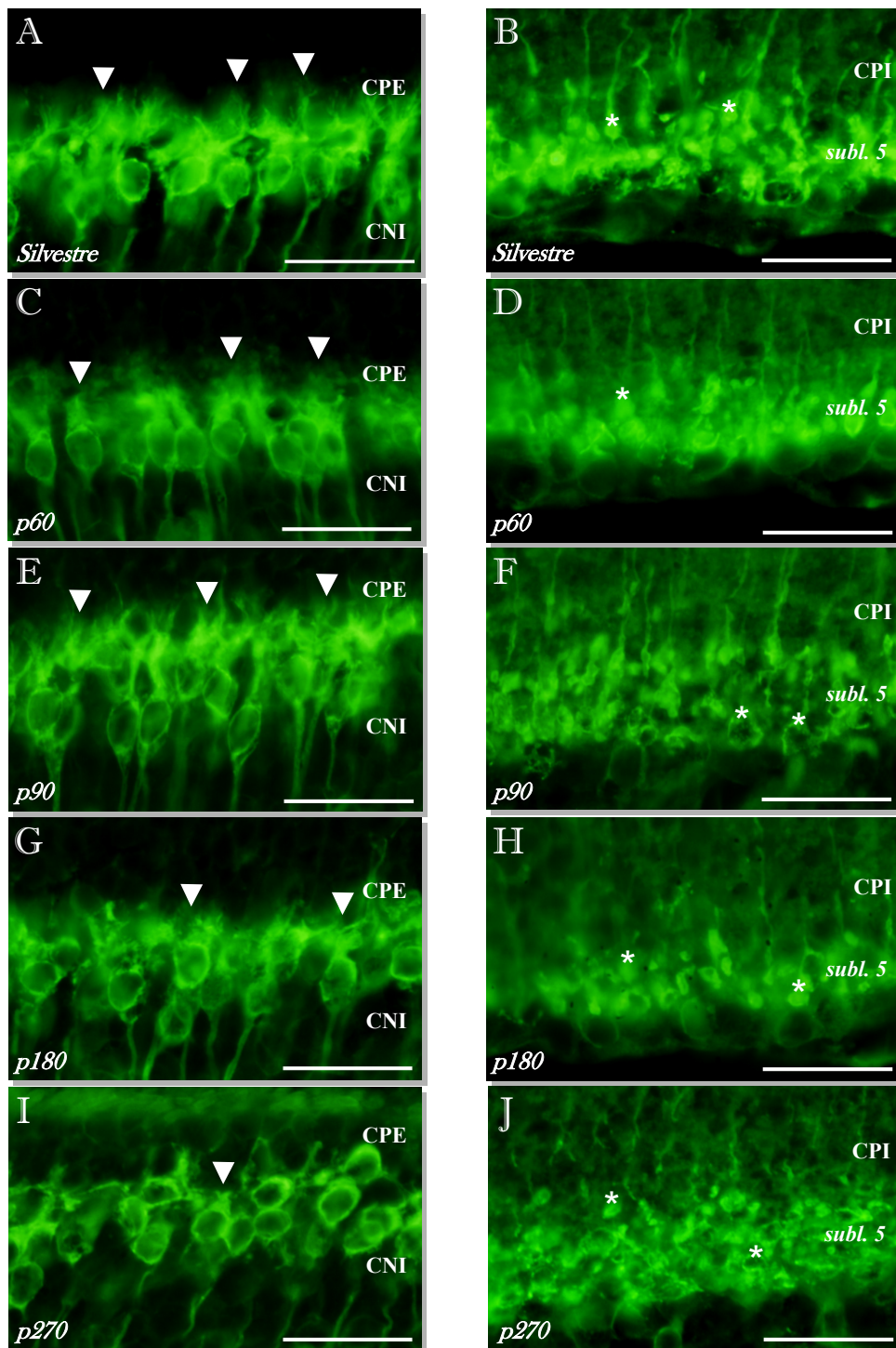


**FIGURA 48. CÉLULAS APOPTÓTICAS: Técnica de TÚNEL.** A-C. Sección transversal de una retina de animal silvestre. En las retinas de los animales silvestres no se han encontrado células positivas a TÚNEL. D-O. Secciones transversales de retinas de animales *pcd/pcd* de diferentes edades. En las retinas *pcd/pcd* es posible identificar células positivas a TÚNEL en todos los estadios de edad estudiados. Las células apoptóticas se localizan en la CNE (flechas). Barra de escala 25  $\mu$ m.



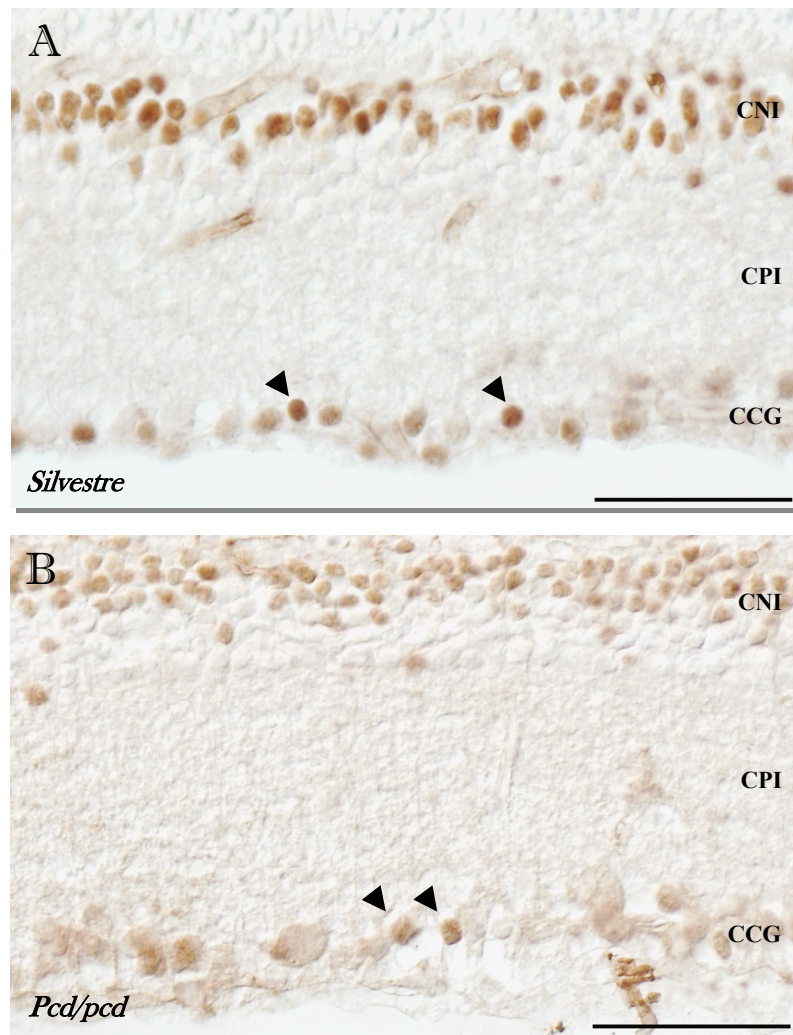
**PKC $\alpha$  + IP**


**FIGURA 49. CÉLULAS BIPOLARES (I): Inmunorreactividad a PKC $\alpha$ .** A. Sección transversal de retina de un animal silvestre. Las células bipolares de bastón muestran una intensa inmunorreactividad a PKC $\alpha$ . B-F. Secciones transversales de retina de animales *pcd/pcd* de 45 a 270 días. Al igual que en las retinas silvestres, las células bipolares de bastón se marcan intensamente en las retinas *pcd/pcd* en todos los estadios de edad considerados. Barra de escala 50  $\mu$ m.

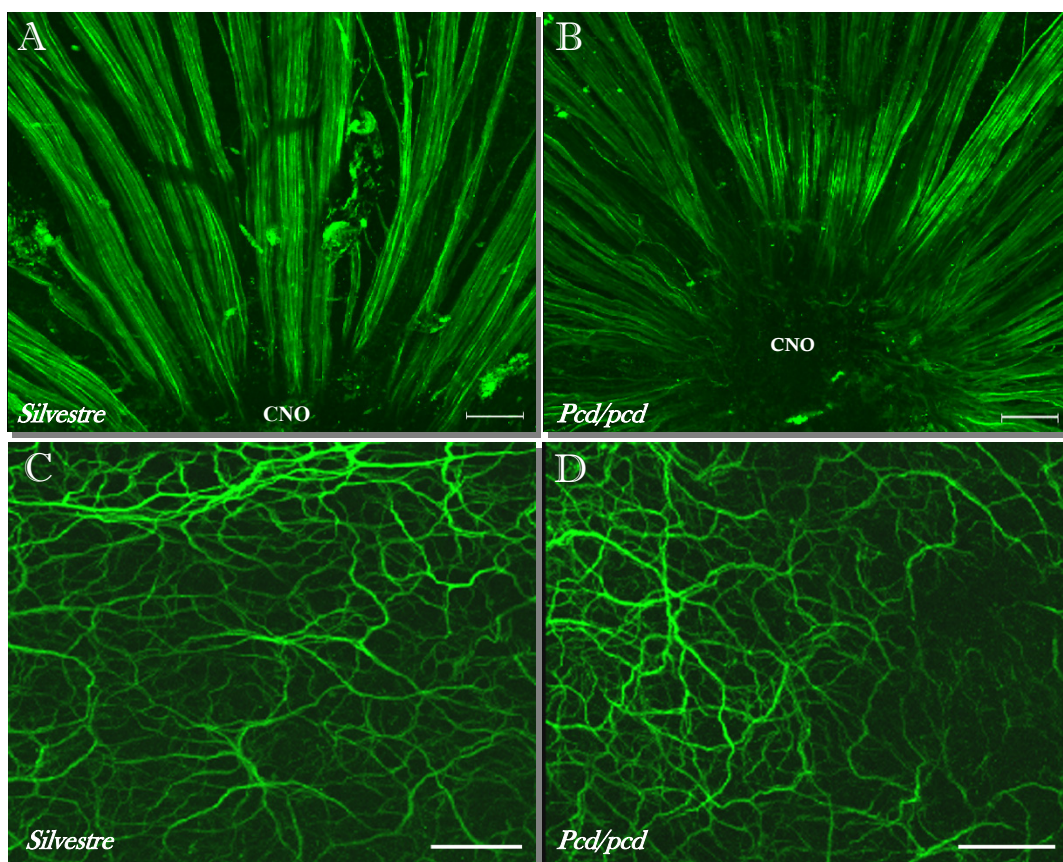


**FIGURA 50. CÉLULAS BIPOLARES (II). Inmunorreactividad a PKC $\alpha$ .** Sección transversal de retina de animal silvestre (A-B) y mutantes de diferentes edades (C-J). Detalle del límite de la CPE/CNI (A,C,E,G,I) y CPI (B,D,F,H,J). En los animales *pcd/pcd*, las células bipolares de bastón pierden progresivamente sus penachos dendríticos (cabezas de flecha). Las varicosidades axónicas (asteriscos) son paulatinamente de menor tamaño en estos animales. Barra de escala 25  $\mu$ m.



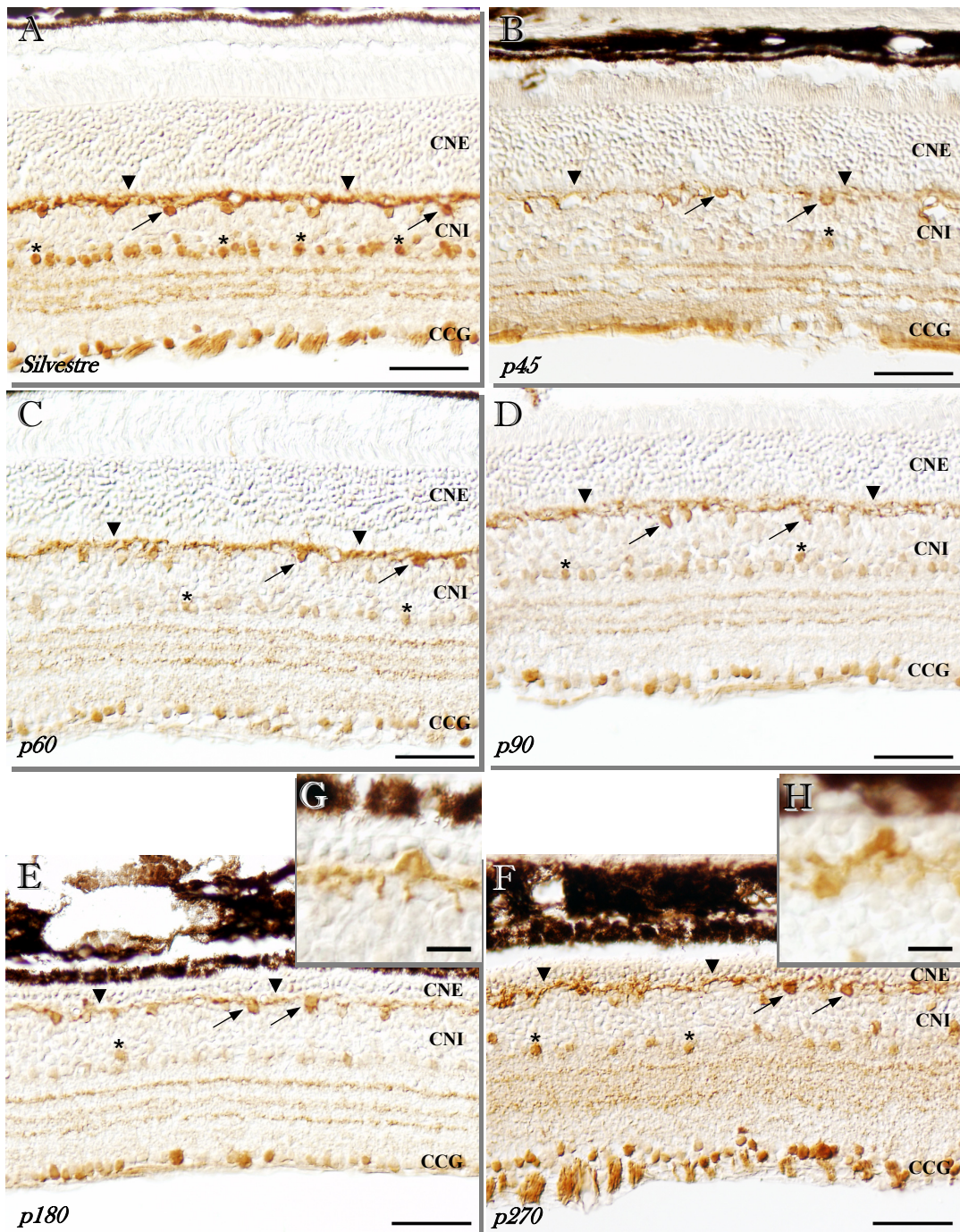


**FIGURA 51. CÉLULAS GANGLIONARES: Inmunorreactividad a Islet1.** A. Sección transversal de retina de animal silvestre. Se observan células ganglionares positivas a islet1 (cabezas de flecha). Ligeras diferencias en la intensidad de la tinción entre las diferentes células ganglionares marcadas. B. Sección de retina de animal *pcd/pcd*. Las células ganglionares (cabezas de flecha) muestran un patrón de inmunorreactividad a islet1 similar al de los animales silvestres. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .



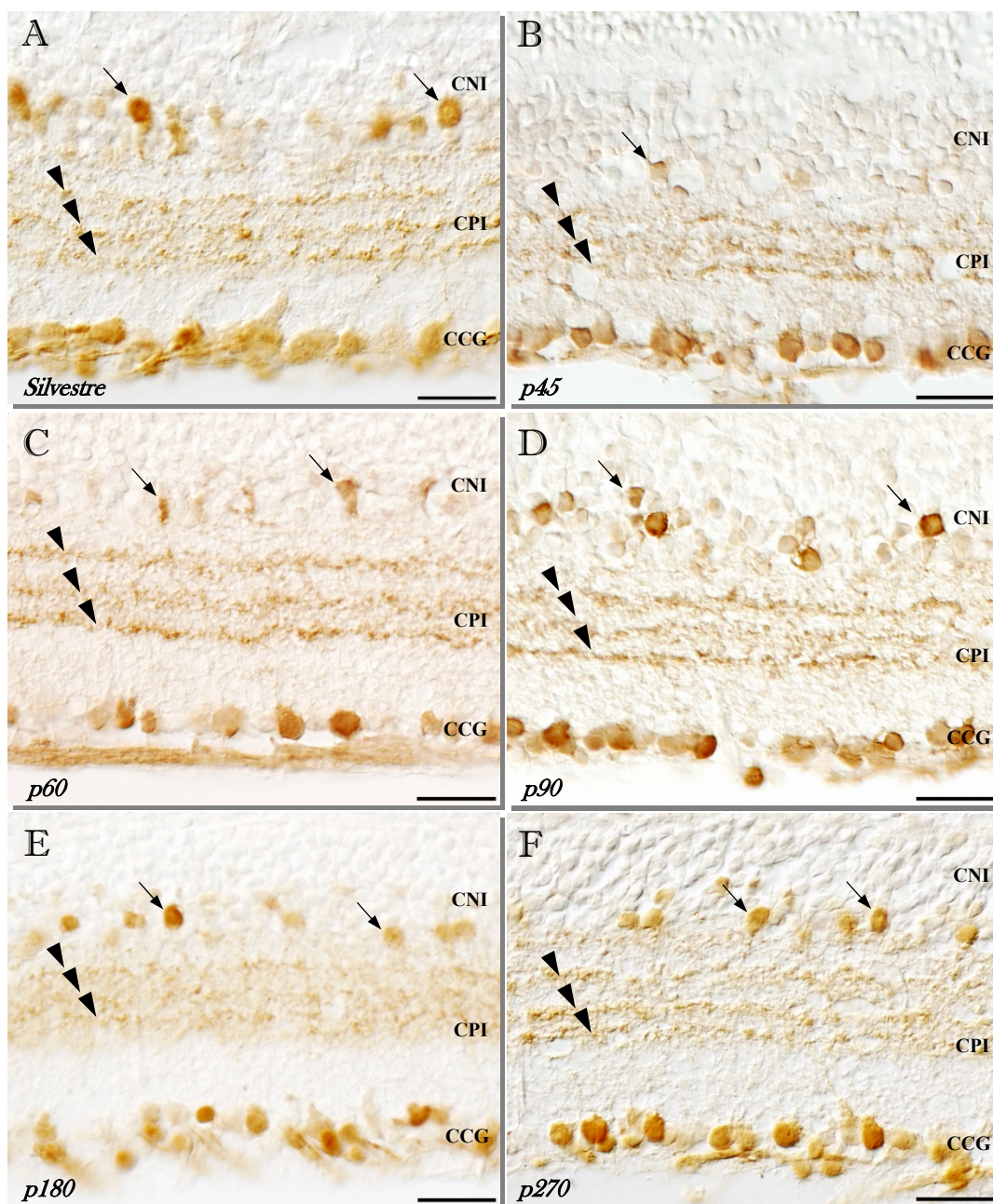
**FIGURA 52. INMUNORREACTIVIDAD A RT97. Retinas “in toto”.** Fibras del nervio óptico cerca de la CNO en la retina de un animal silvestre (A) y mutante (B). No se aprecian diferencias sensibles en la inmunorreactividad a Rt97 en las fibras del nervio óptico entre las retinas de los animales *pcd/pcd* y sus respectivos controles. C. Procesos de células horizontales en la CPE en la retina de un animal silvestre y *pcd/pcd* (D). No se observan variaciones en el patrón de marcaje de los procesos de las células horizontales en las retinas *pcd/pcd* en relación a su contrapartida silvestre. Barras de escala: 40  $\mu$ m.





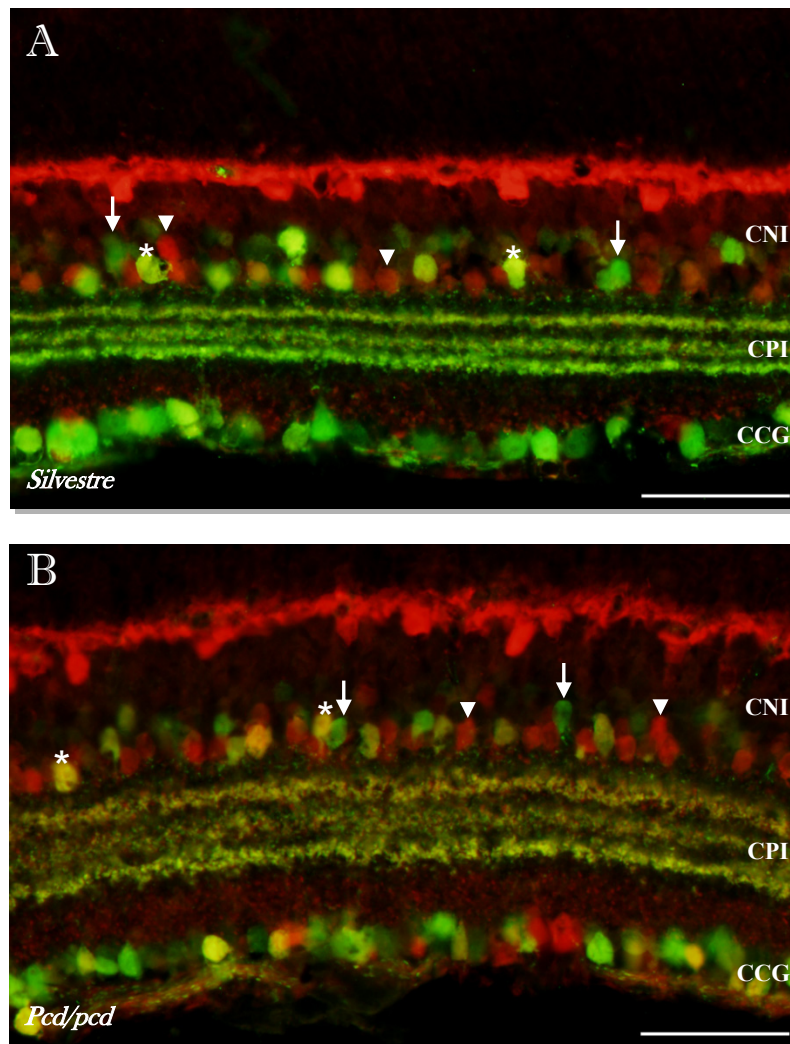
**FIGURA 53. CÉLULAS HORIZONTALES Y AMACRINAS. Inmunorreactividad a calbindina.**  
 A. Sección transversal de retina de un animal silvestre. Células horizontales intensamente teñidas, tanto en el soma (flechas) como en sus procesos (cabezas de flecha). Células amacrinadas marcadas en la CPI (\*).  
 B-F. Secciones transversales de retinas de animales *pcd/pcd* de p45 a p270. Las células horizontales conservan la intensa tinción del soma (flechas); sin embargo, se aprecia una ligera disminución en la inmunorreactividad en sus procesos (cabezas de flecha). Somas de células horizontales en posiciones anormalmente esclerales (detalles G y H) en los animales *pcd/pcd* de mayor edad. Pérdida de tinción en las células amacrinadas (\*) en todas las edades. Barra de escala: A-F 50  $\mu\text{m}$ , G-H 10  $\mu\text{m}$ .



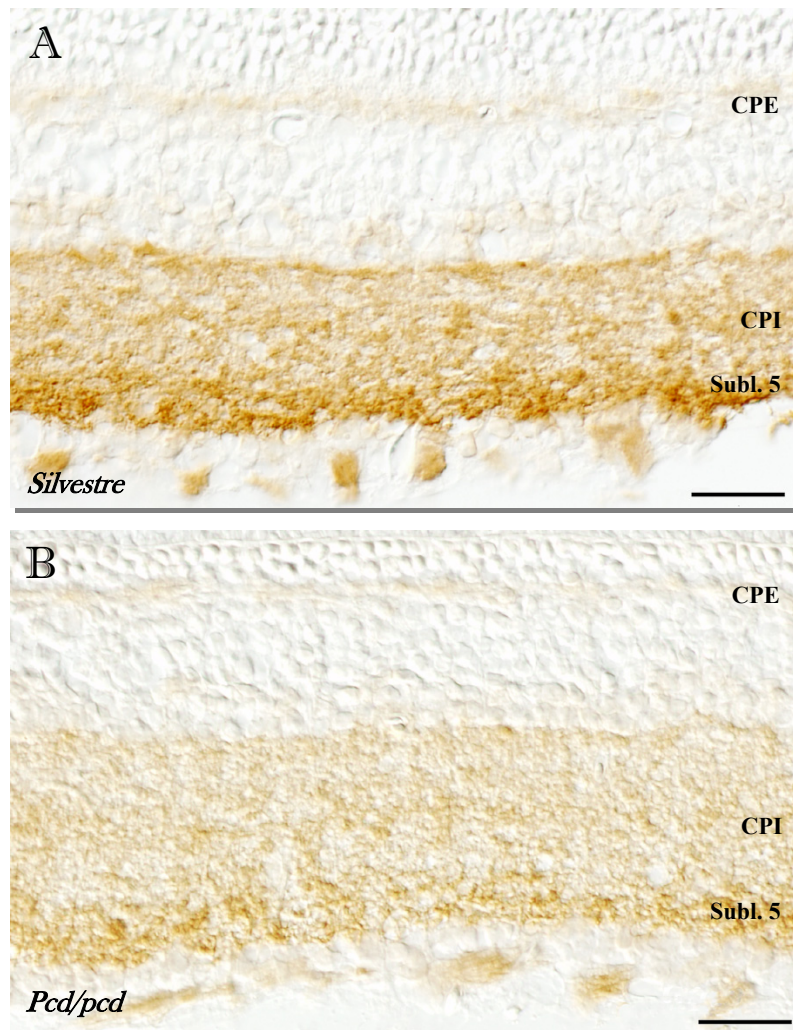


**FIGURA 54. CÉLULAS AMACRINAS (I). Inmunorreactividad a calretinina.** A. Sección transversal de retina de un animal silvestre. En la CNI aparecen numerosos somas de células amacrinas marcados (flechas). En la CPI se pueden observar tres bandas longitudinales positivas (cabezas de flecha). B-F. Secciones transversales de retina de animales *pcd/pcd*. Las células amacrinas conservan el patrón de inmunorreactividad a calretinina, tanto en el soma (flechas) como en la CPI (cabezas de flecha) en todo el intervalo de edades. Barra de escala 25  $\mu$ m.

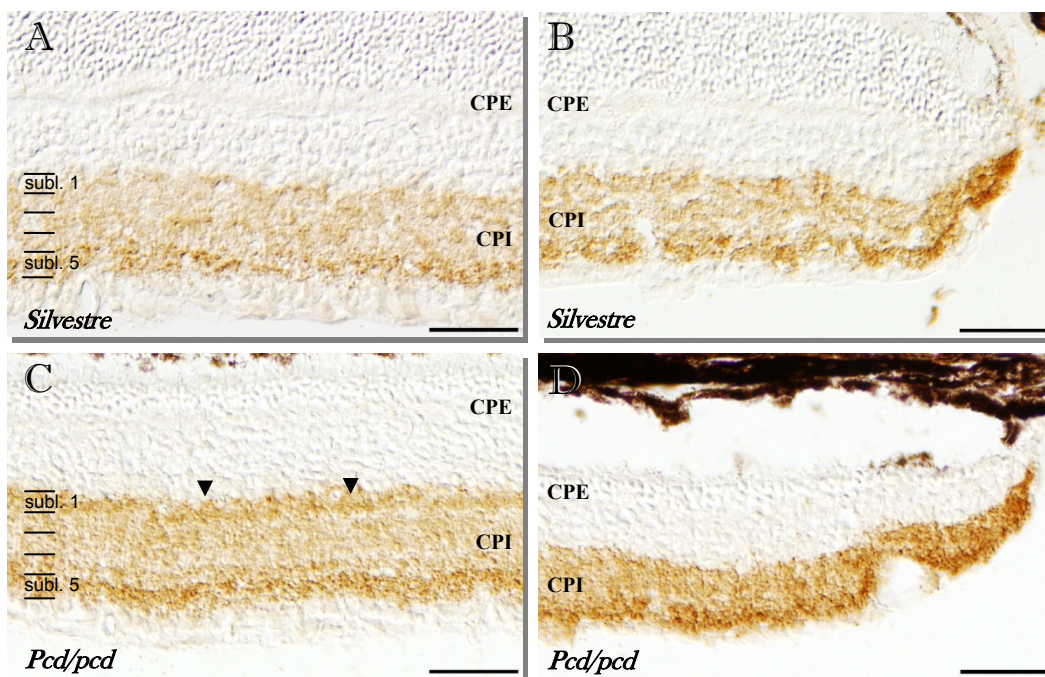


**Calbindina + Calretinina**


**FIGURA 55. CÉLULAS AMACRINAS (II). Doble marcaje calbindina/calretinina. A:** Retina de un animal control. **B:** Retina de un ratón *pcd/pcd*. Se pueden distinguir tres tipos de células amacrinas:  $CB^+/CR^-$  (cabezas de flecha),  $CB^-/CR^+$  (flechas) y  $CB^+/CR^+$  (asteriscos). Barra de escala:  $50 \mu m$ .

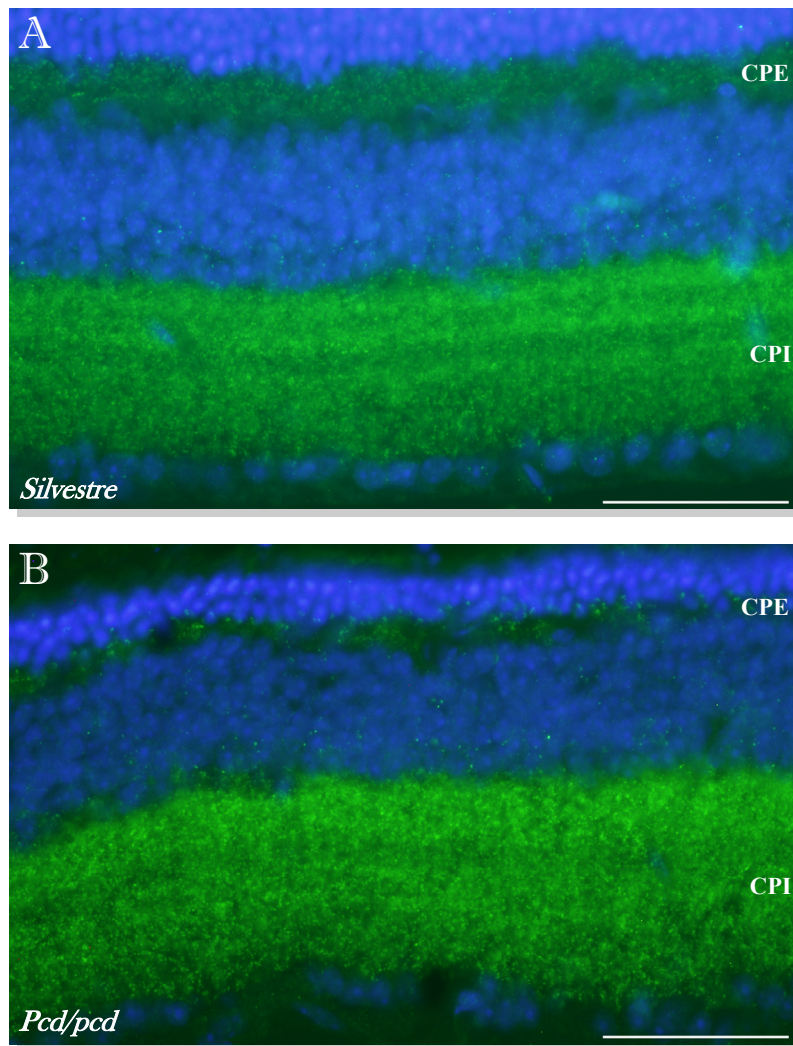


**FIGURA 56. MARCADORES DE SINAPSIS (I).** Inmunorreactividad a *syntaxina*. **A.** Sección transversal de una retina de animal silvestre. Inmunorreactividad a *syntaxina* en ambas capas plexiformes, especialmente intensa en la CPI. Dentro de ésta, destaca la sublámina 5. **B.** Sección transversal de una retina de un animal *pcd/pcd* de 270 días. Evidente disminución en la intensidad del marcaje en ambas capas plexiformes. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ .

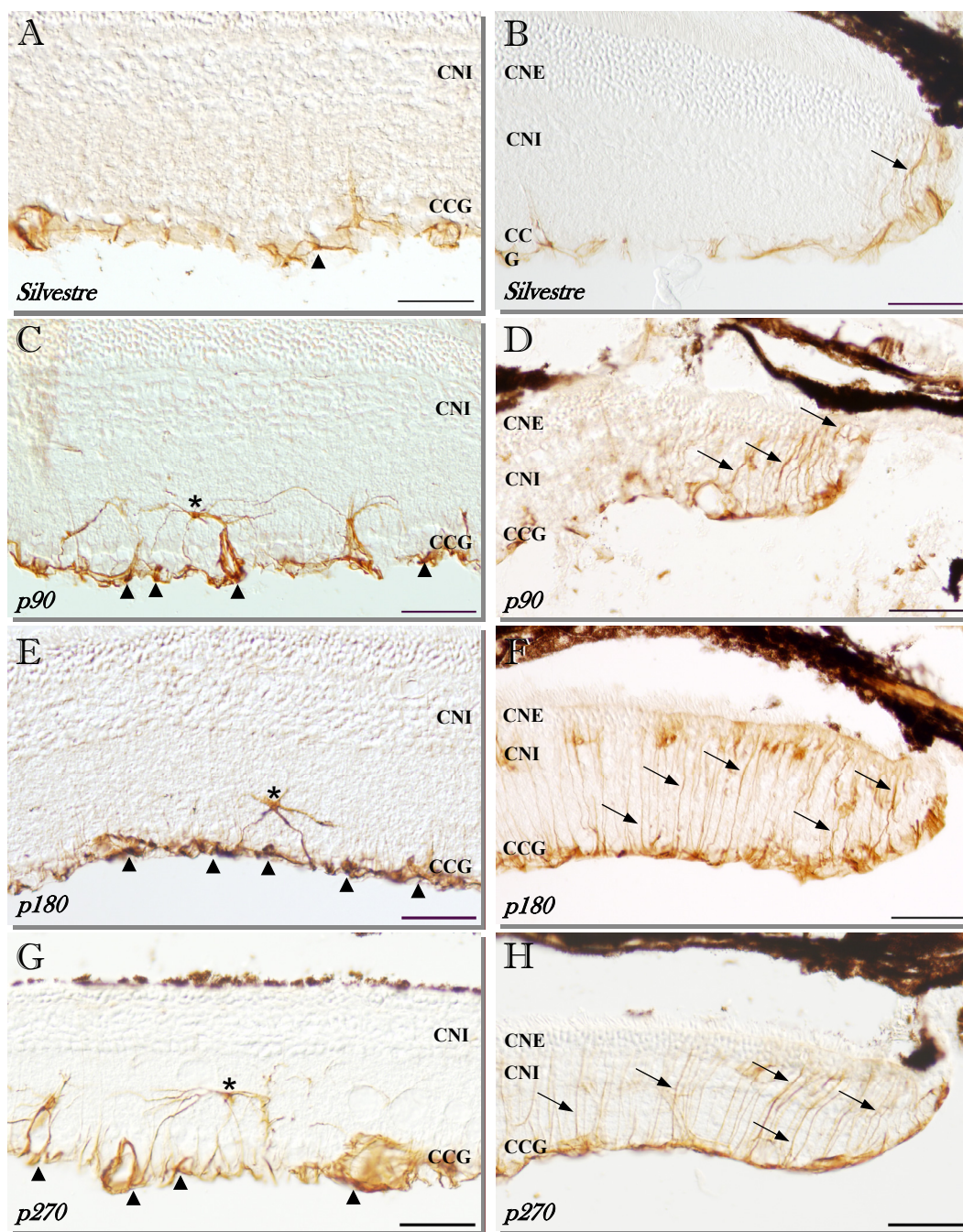


**FIGURA 57. MARCADORES DE SINAPSIS (II). Inmunorreactividad a sinapsina. A-B.** Secciones de la zona central (A) y periferia (B) de la retina de un animal silvestre de 270 días. Inmunorreactividad a sinapsina en la CPI, especialmente intensa en la sublámina 5. **C-D.** Secciones de la zona central (C) y periferia (D) de la retina de un animal *pcd/pcd* de 270 días. Ligeramente incremento del marcaje con sinapsina en la sublámina 1 de la CPI respecto a los animales silvestres de la misma edad (cabezas de flecha) en la zona central de la retina. Sin embargo en la periferia el patrón de tinción es muy similar entre retinas *pcd/pcd* y silvestres. Barra de escala 25 μm.



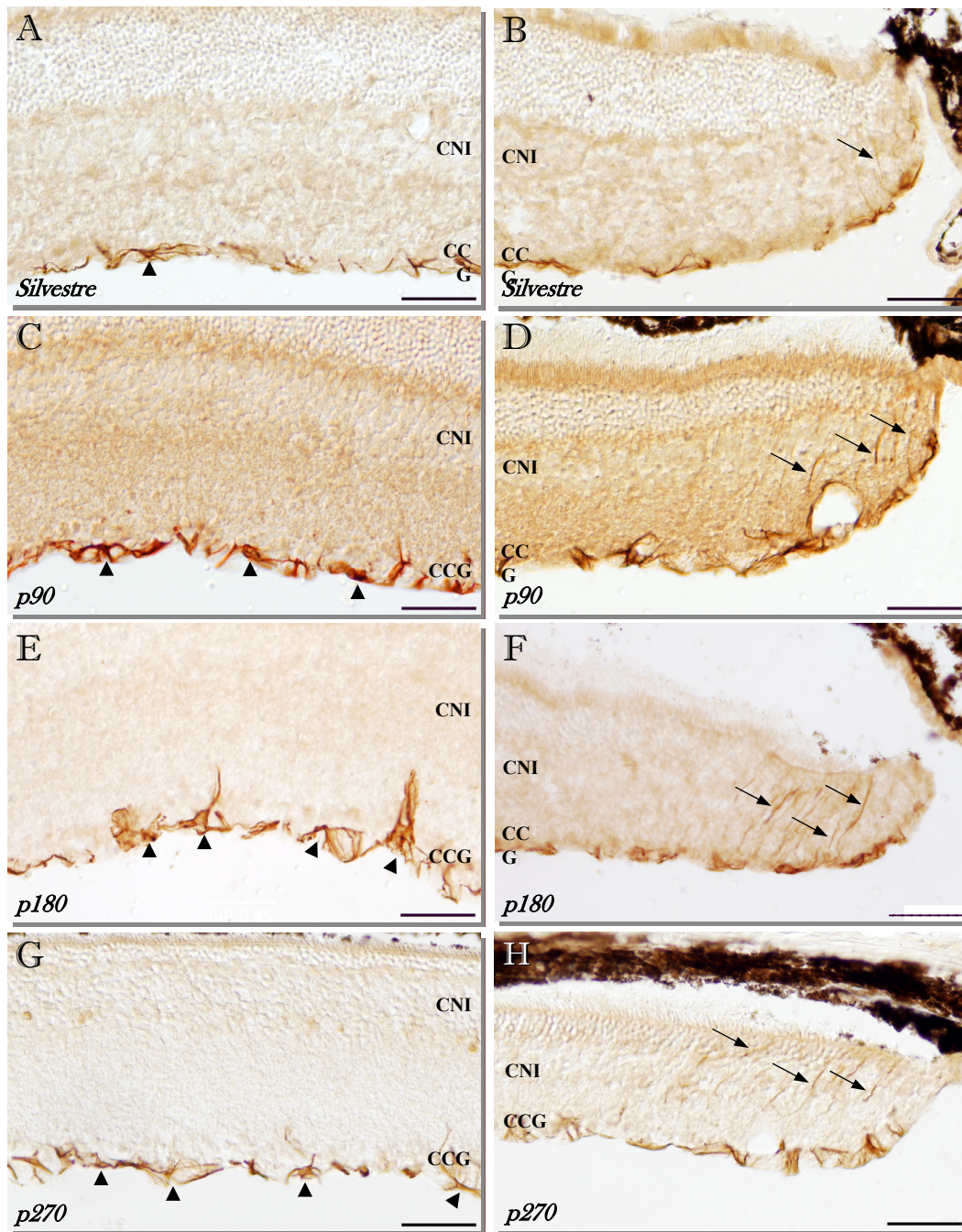
**Bassoon + DAPI****FIGURA 58. MARCADORES DE SINAPSIS (III).**

**Inmunorreactividad a bassoon.** **A.** Sección transversal de retina de un animal silvestre. En estas retinas, ambas capas plexiformes presentan inmunorreactividad a bassoon. **B.** Sección de retina de un animal *pcd/pcd* de 270 días. En los animales *pcd/pcd* de 270 días, el marcaje disminuye visiblemente en la CPE. Por contra, el patrón de inmunorreactividad a bassoon en la CPI no varía en las retinas *pcd/pcd* en relación a lo observado en las retinas de animales silvestres. *Barra de escala 50  $\mu$ m.*

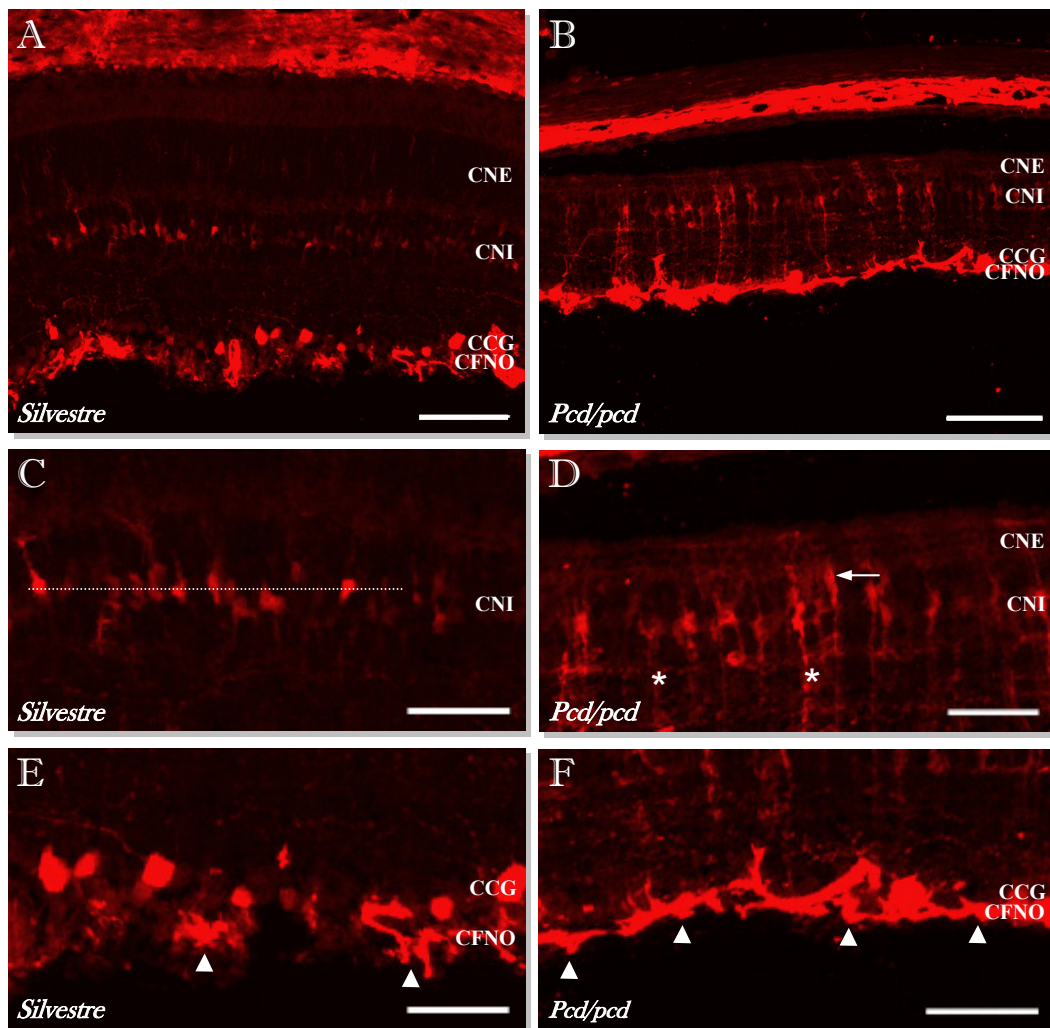


**FIGURA 59. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (I). Inmunorreactividad a GFAP.** A-B. Secciones transversales de la zona central (A) y periferia (B) de la retina de un animal silvestre. Inmunomarcaje a GFAP localizada en los astrocitos de la CFNO (cabeza de flecha) y en un número muy reducido de procesos transversales en la periferia (flecha). C-H. Secciones transversales de la zona central (C,E,G) y periferia (D,F,H) de animales *pcd/pcd* de entre 90 y 270 días. Mayor inmunorreactividad en la CFNO (cabezas de flecha) y un incremento sustancial del número de procesos transversales marcados en la periferia (flechas). En el interior de la CPI aparecen grandes astrocitos intensamente teñidos (\*). Barra de escala 50  $\mu$ m.



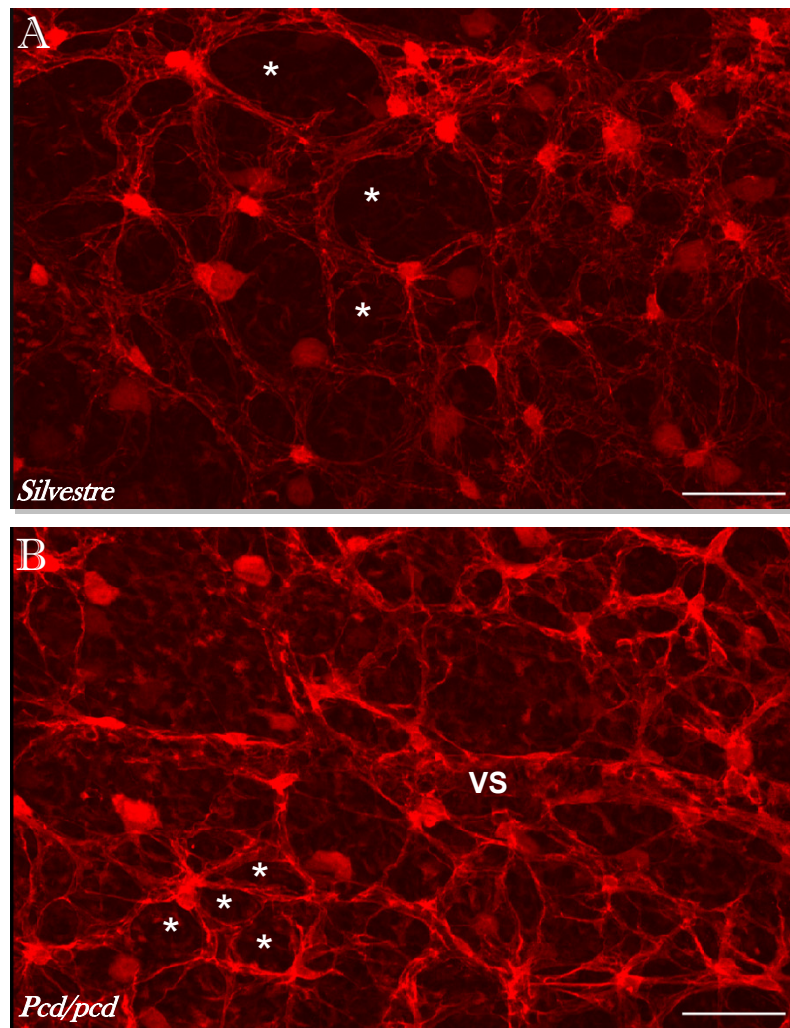


**FIGURA 60. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (II). Inmunorreactividad a EAAT-4.** A-B. Secciones transversales de la zona central (A) y periferia (B) de la retina de un animal silvestre. Astrocitos positivos a EAAT4 localizados en la CFNO (cabeza de flecha) y en un número muy reducido de procesos transversales en la periferia (flecha). C-H. Secciones transversales de la zona central (C,E,G) y periferia (D,F,H) de animales *pcd/pcd* de entre 90 y 270 días. Incremento de inmunorreactividad a EAAT4 en la CFNO (cabezas de flecha) y del número de procesos transversales marcados en la periferia (flechas). Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .



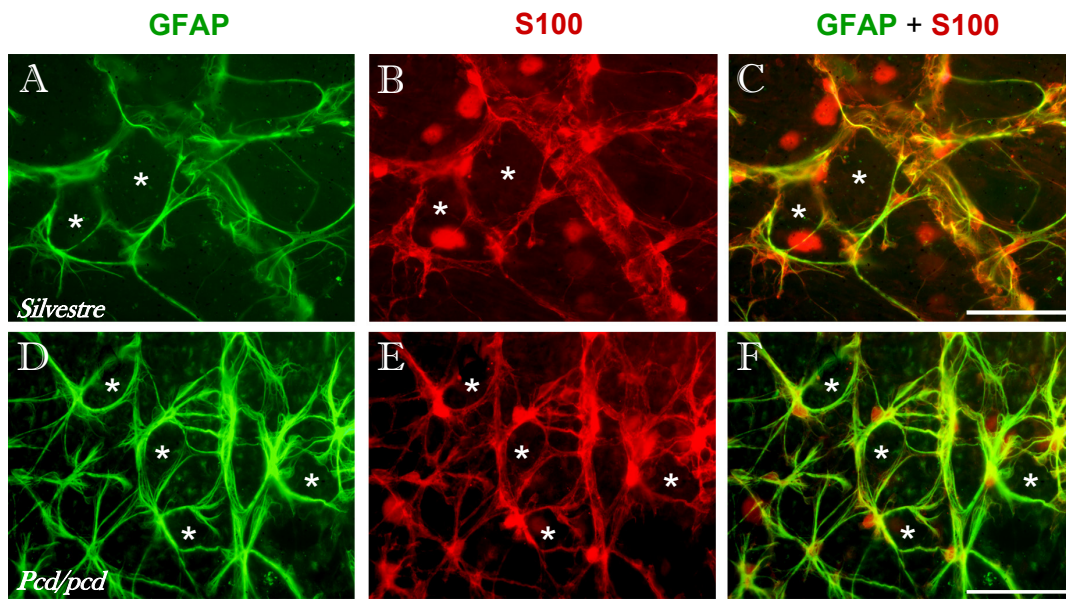
**FIGURA 61. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (III).** Inmunorreactividad a S100. **A-B:** Secciones de retina de un animal silvestre (A) y *pcd/pcd* (B). **C-D:** Detalle de la CNI en una retina control (C) y mutante (D). Disposición en hilera de los somas de las células de Müller positivas en los animales silvestres (línea de puntos). Traslocación del núcleo de las células de Müller (flecha) y procesos de estas células inmunorreactivos (asteriscos) en las retinas *pcd/pcd*. **E-F:** Detalle de las capas CCG/CFNO en la retina de animales silvestre (E) y mutante *pcd/pcd* (F). Inmunotinción en la CFNO (cabezas de flecha). Barra de escala: 50  $\mu$ m.



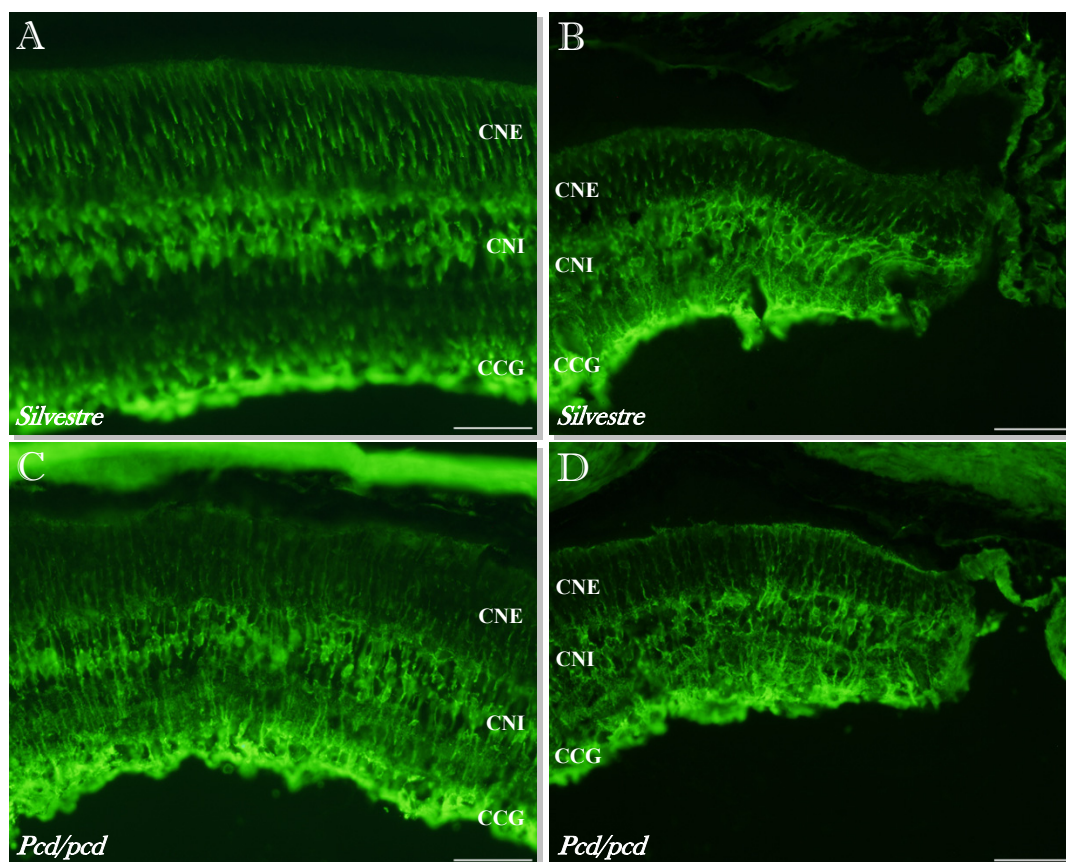


**FIGURA 62. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (IV).** Inmunorreactividad a S100 en retinas “in toto”. A-B: inmunotinción de la población astrocitaria de la CFNO en retinas control (A) y *pcd/pcd* (B). Aumento de las “celdillas” (asteriscos) formadas por los procesos de los astrocitos en las retinas de los ratones mutantes respecto al control. VS: vaso sanguíneo. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



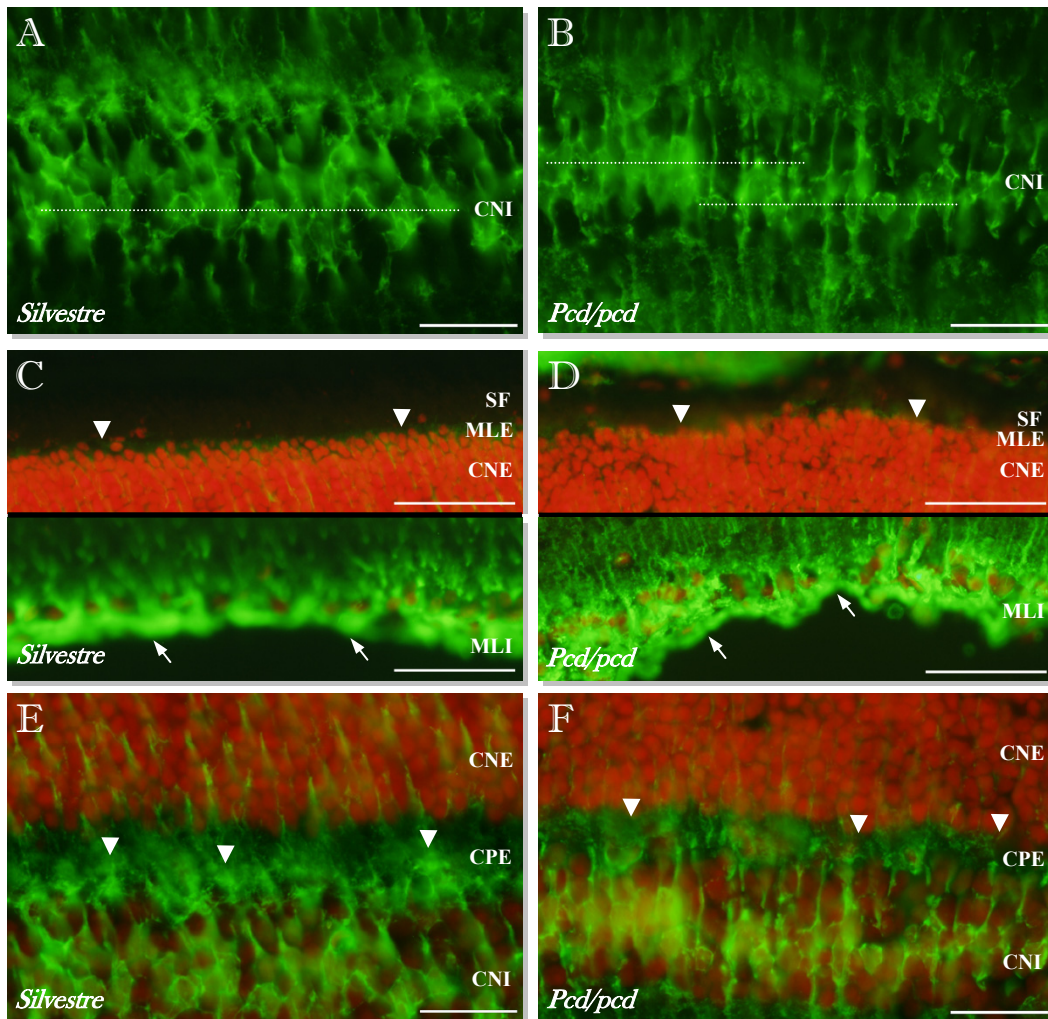


**FIGURA 63. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (V).** Doble marcaje GFAP/S100 en retinas “in toto”. **A-C:** inmunotinción de la población astrocitaria de la CFNO en retinas control. **D-F:** inmunotinción de los astrocitos de la CFNO en una retina *pcd/pcd*. Aumento del número de “celdillas” (asteriscos) formadas por los procesos astrocitarios en los ratones mutantes respecto al silvestre; observable con ambos marcadores. *Barra de escala: 20 μm.*



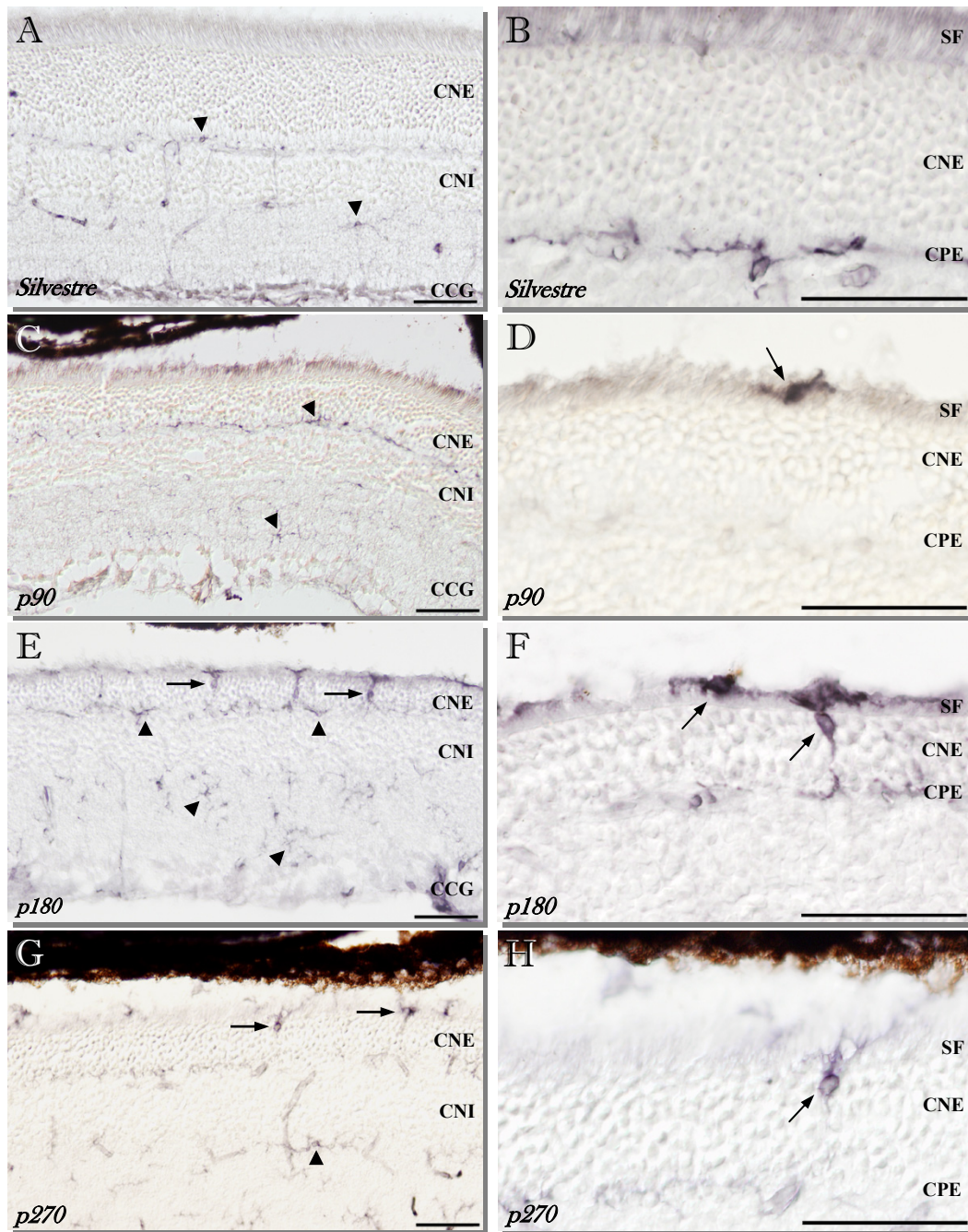
**FIGURA 64. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (VI). Inmunorreactividad a GS. A-B.** Sección transversal de la zona central (A) y periferia (B) de una retina de un animal silvestre. Las células de Müller muestran una intensa inmunorreactividad a GS. **C-D.** Secciones transversales de la zona central (C) y periferia (D) de una retina de animal *pcd/pcd*. Al igual que en las retinas silvestres, las células de Müller se marcan intensamente a lo largo de toda la extensión de las retinas *pcd/pcd* en todos los estadios de edad considerados. Barra de escala 25  $\mu$ m.

## GS + IP

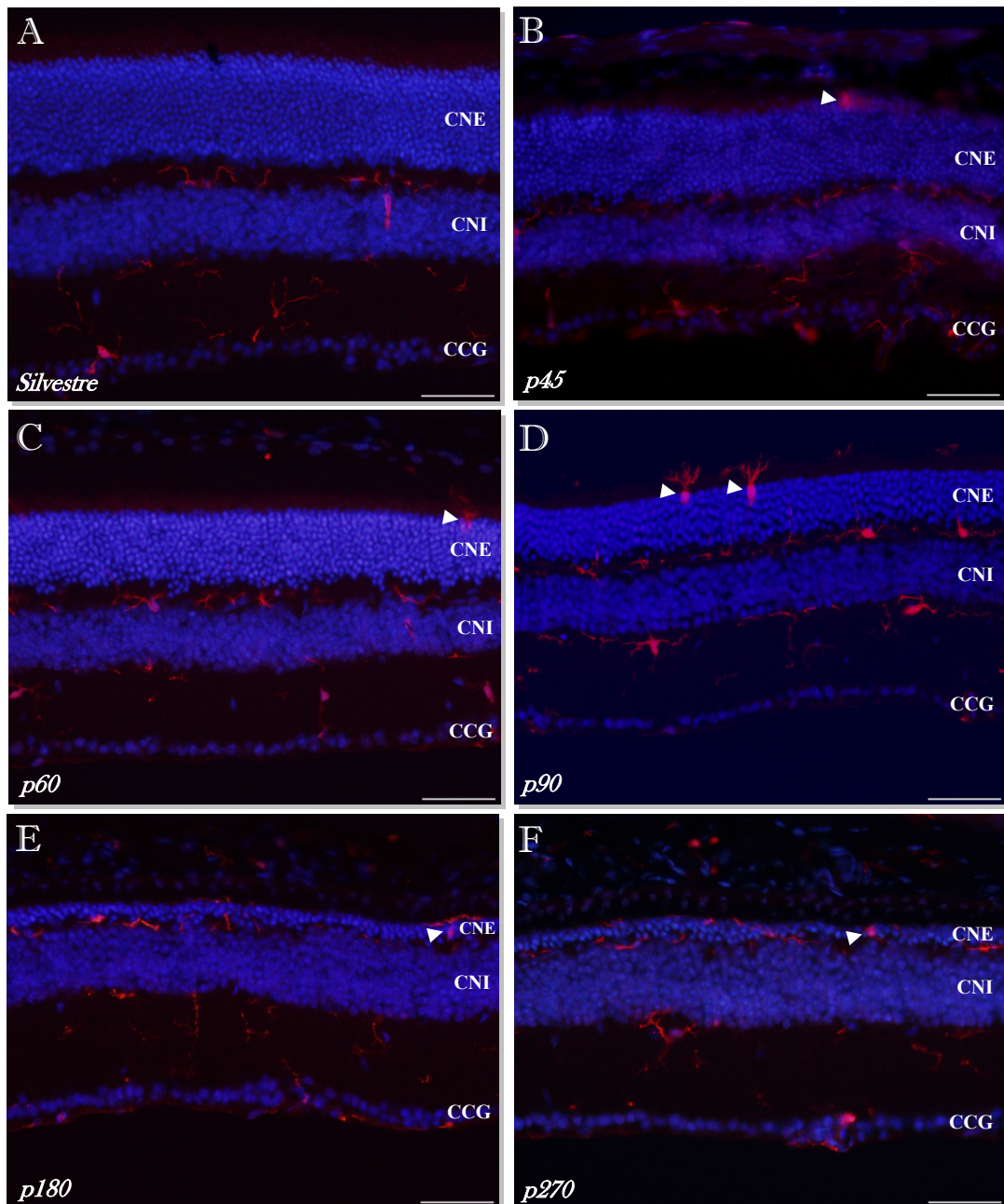


**FIGURA 65. ASTROCITOS Y CÉLULAS DE MÜLLER (VII). Inmunorreactividad a GS.** A-B: Detalle de la CNI en las retinas control (A) y *pcd/pcd* (B). En las retinas *pcd/pcd* es posible observar más de una hilera de somas de células de Müller (líneas de puntos). C-D: Detalle de la MLE y MLI en la retina de un animal control (C) y mutante (D). Intensa tinción en la MLI (flechas) y menos notoria en la MLE (cabezas de flecha). E-F: Detalle de la CPE en la retina de animales silvestres (E) y mutantes *pcd/pcd* (F). Disminución de la inmunotinción en la CPE (cabezas de flecha) en los ratones mutantes respecto a su contrapartida silvestre. Barra de escala: 25 μm.





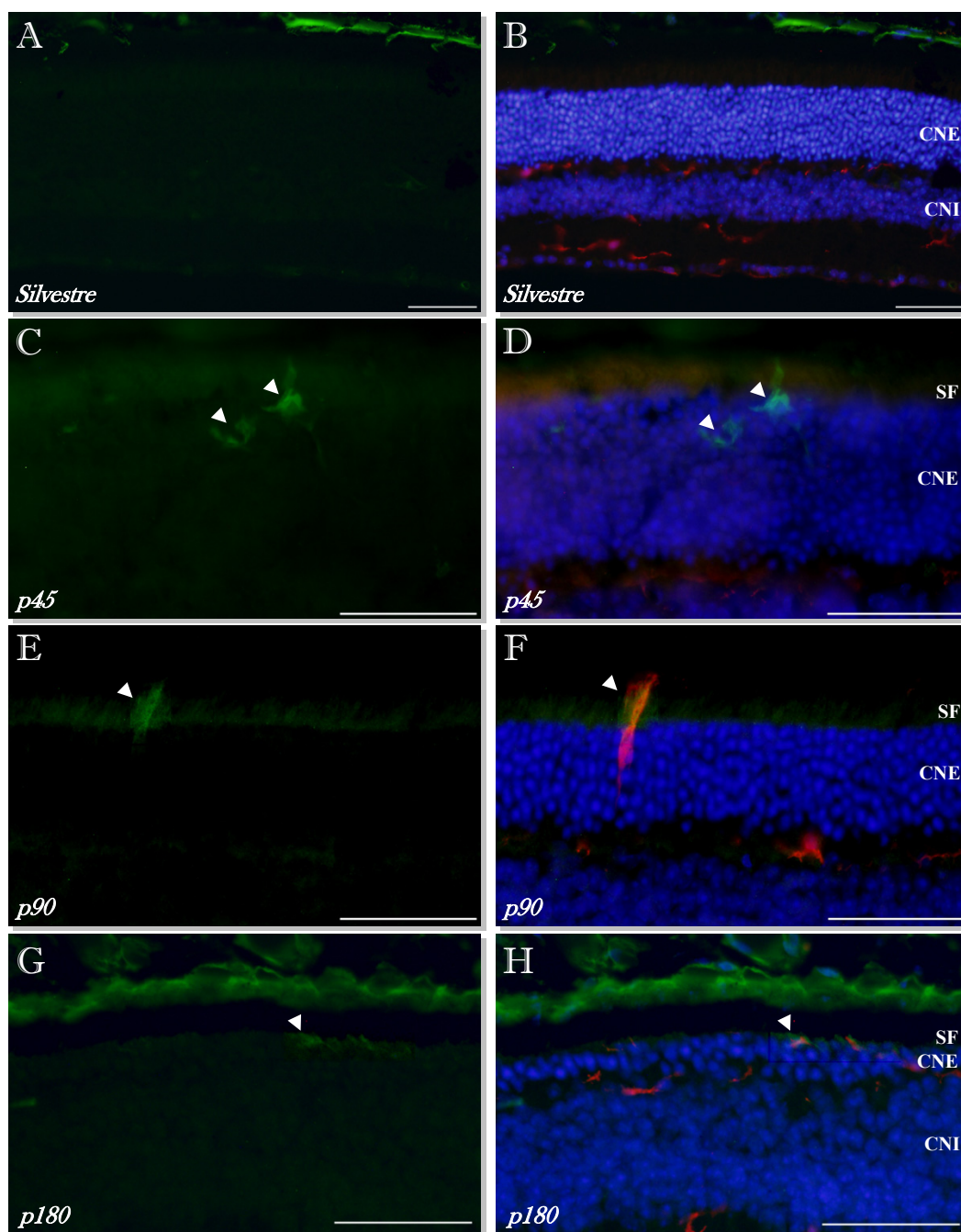
**FIGURA 66. CÉLULAS DE MICROGLÍA (I).** Marcaje con Tx100+IgG anti-ratón. A,C,E,G: Secciones de retina de animales silvestres (A) y *pcd/pcd* (C,E,G). B,D,F,H: Detalle de las capas externas de la retina en animales control (B) y mutantes *pcd/pcd* (D,F,H). Células de microglía de aspecto estrellado en las capas plexiformes (cabezas de flecha). Células microgliales entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores en las retinas *pcd/pcd* (flechas). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Iba1 + DAPI**


**FIGURA 67. CÉLULAS DE MICROGLÍA (II).** Inmunorreactividad a Iba1. A. Sección transversal de retina de un animal silvestre. Células microgliales positivas a Iba1 en ambas capas plexiformes. B-F. Secciones transversales de retinas de animales *pcd/pcd* entre p45 y p270. Además de las ubicadas en ambas capas plexiformes, destaca la presencia de células microgliales positivas a Iba1 en las capas más externas de la retina (cabezas de flecha). Barras de escala 50 μm.

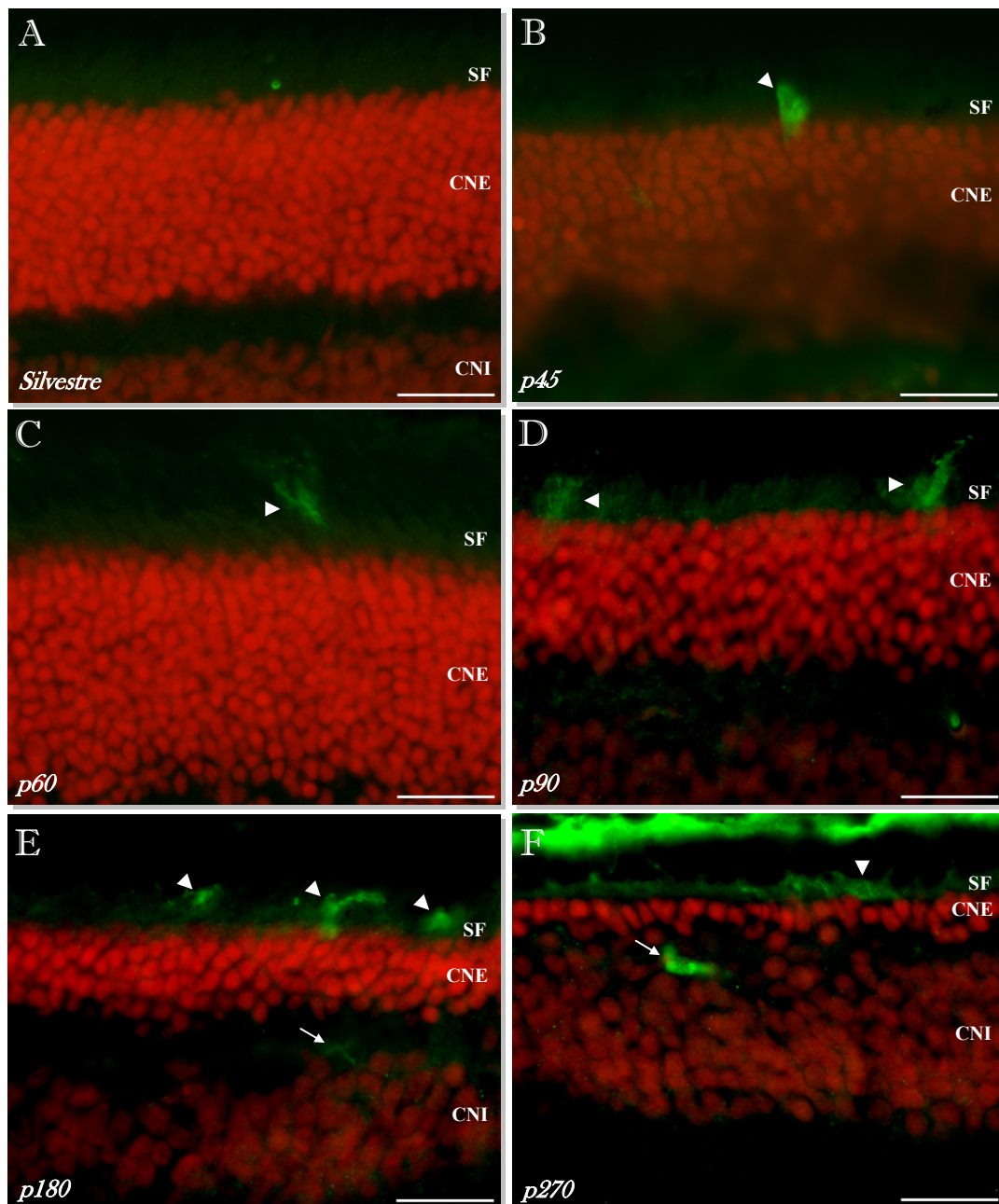


## CD68 / Iba1 / DAPI

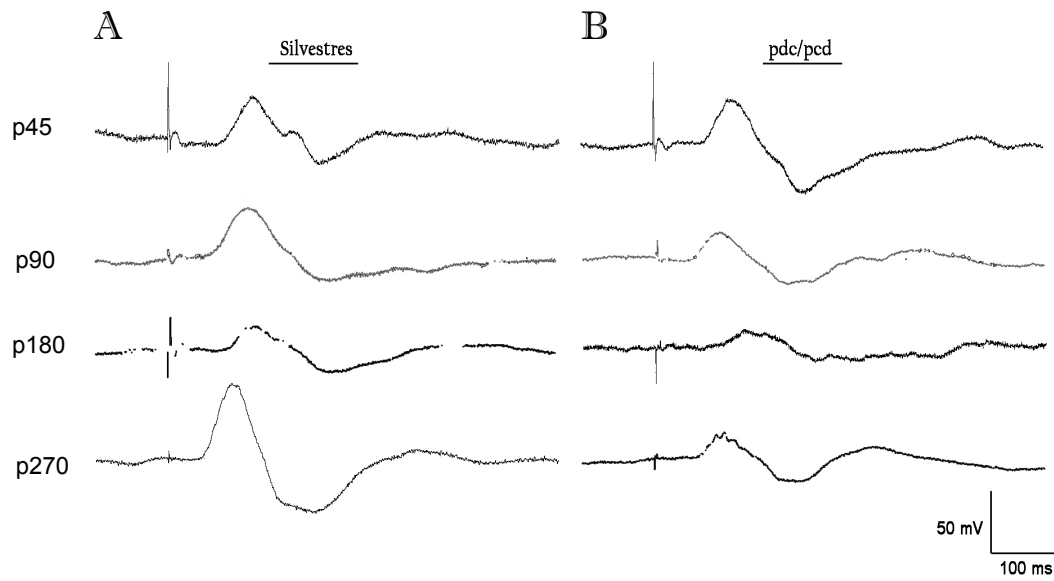


**FIGURA 68. CÉLULAS DE MICROGLÍA (III).** Doble marcaje CD68/Iba1. A-B. Sección transversal de una retina de animal silvestre. En estas retinas no se ha podido constatar la presencia de células positivas a CD68 en ninguna de las secciones estudiadas. C-H. Secciones de retinas *pcd/pcd* entre p45 y p180. Células positivas a CD68 entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores (cabezas de flecha). El doble marcaje con iba1 confirma la naturaleza microglial de estas células. Barra de escala 50  $\mu$ m.

## NOSi + IP

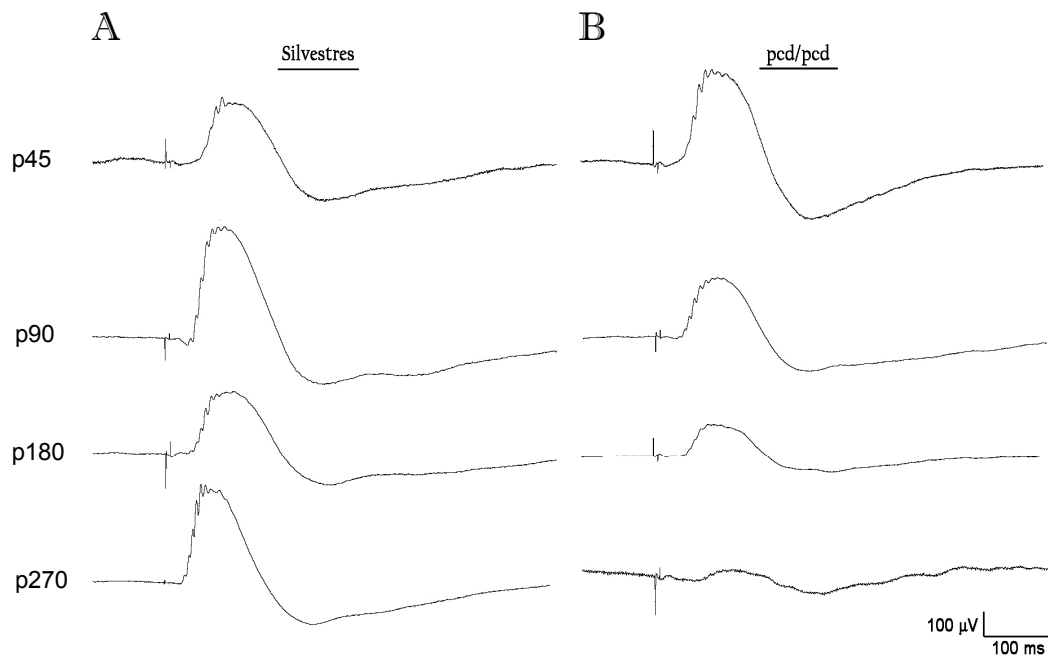


**FIGURA 69. CÉLULAS DE MICROGLÍA (IV).** Inmunorreactividad a NOSi. **A.** Sección transversal de una retina de animal silvestre. En los animales silvestres no se aprecian células positivas a NOSi en ninguno de los grupos de edad considerados. **B-F:** Secciones transversales de retinas de animales *pcd/pcd*. En estas retinas aparecen células positivas a NOSi entre los segmentos de los fotorreceptores (cabezas de flecha) en todos los grupos de edad. En los animales de mayor edad se observan células y procesos inmunorreactivos (flechas) en la CPE. Barra de escala 25  $\mu$ m.

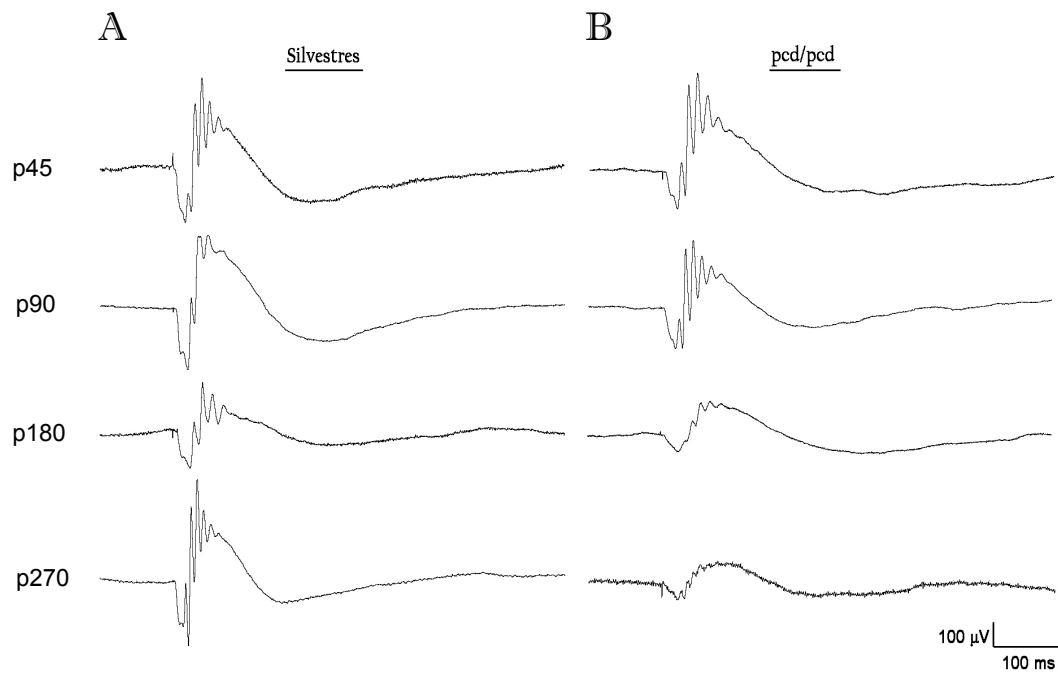


**FIGURA 70. RESPUESTA STR.** **A:** Animales silvestres. **B:** Animales *pcd/pcd*. La STR es registrable en los animales *pcd/pcd* a lo largo de todo el intervalo de edades; si bien la amplitud, tanto del componente positivo como del negativo, disminuye paulatinamente a medida que avanza la degeneración de los fotorreceptores.

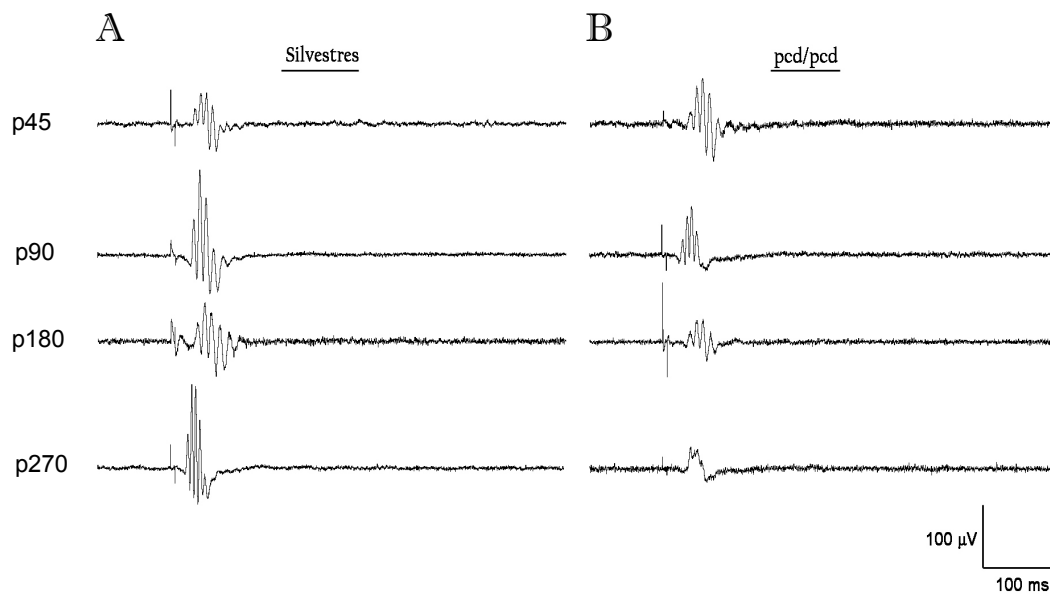




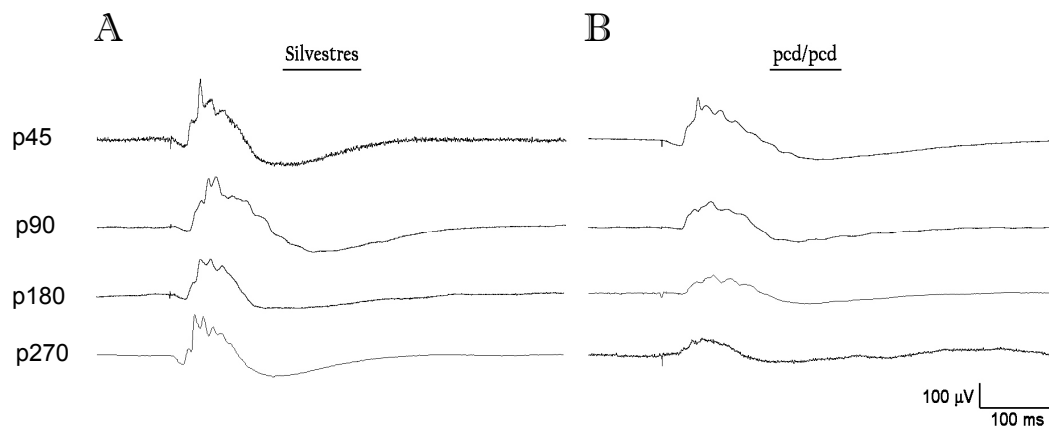
**FIGURA 71. RESPUESTA DE BASTONES.** A: Ratones controles. B: Ratones *pcd/pcd*. La onda b de bastones nunca llega a extinguirse en las retinas de los ratones *pcd/pcd*.



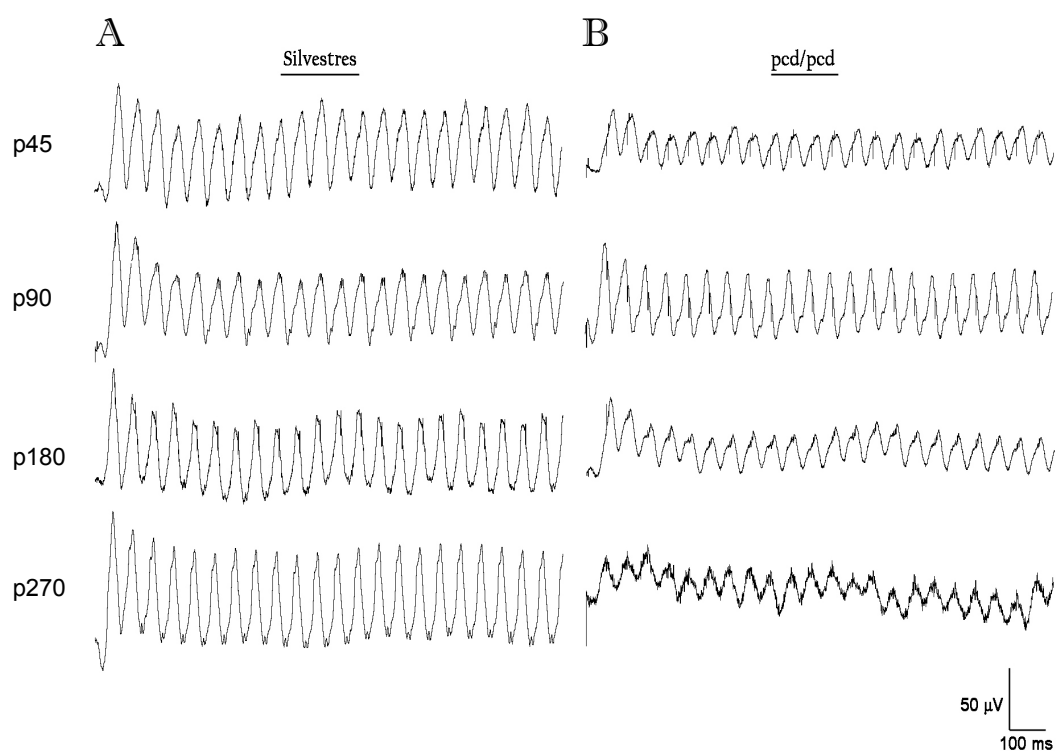
**FIGURA 72. RESPUESTA ESCOTÓPICA MIXTA.** Registro en los animales controles (A) y *pcd/pcd* (B) en el período p45-270. Las retinas de los animales *pcd/pcd* muestran ondas a y b medibles en todas las edades consideradas. No obstante, la amplitud de estas respuestas disminuye progresivamente a medida que avanza la degeneración de los fotorreceptores; en especial, la onda a.



**FIGURA 73. POTENCIALES OSCILATORIOS.** Registro de la señal en los ratones silvestres (A) y *pcd/pcd* (B). La amplitud máxima de los potenciales oscilatorios disminuye a medida que los ratones *pcd/pcd* envejecen. Sin embargo, la respuesta nunca llega a desaparecer en las retinas de estos animales.



**FIGURA 74. RESPUESTA FOTÓPICA DE CONOS (I). Flash simple. A:** Animales controles. **B:** Animales mutantes. Las retinas *pcd/pcd* presentan ondas a y b fotópicas medibles en todos los grupos de edad considerados en este estudio. A medida que progresa la degeneración de las células fotorreceptoras, el valor de amplitud de estas ondas disminuye (aunque nunca llega a ser 0).



**FIGURA 75. RESPUESTA FOTÓPICA DE CONOS (II). Flicker (20Hz).** Trazados electroretinográficos correspondientes a la respuesta flicker de 20Hz en ratones silvestres (A) y *pcd/pcd* (B). Conservación de la capacidad de respuesta a estímulos luminosos muy próximos temporalmente en las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd* en todos los grupos de edad considerados.



# Discusión

---



## **1.- DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES**

### **1.1.- HISTOLOGÍA**

En la retina de los animales mutantes *pcd/pcd*, la pérdida de las células fotorreceptoras transcurre lentamente a lo largo de la ontogenia del animal. El proceso degenerativo, descrito inicialmente por LaVail y cols. (1982), cursa de modo distinto para los dos tipos de fotorreceptores, comprobándose que los bastones degeneran considerablemente más rápido que los conos. Un patrón temporal semejante se ha descrito en pacientes afectados con retinosis pigmentaria (Milam *et al.*, 1998).

La pérdida de los fotorreceptores en los ratones mutantes *pcd/pcd* transcurre de manera intermedia entre la rápida degeneración de las células de Purkinje del cerebelo y las células CA3 del hipocampo, donde no se han descrito déficits, a pesar de que estas células expresan *nna1* en los ratones silvestres (Wang y Morgan, 2007). No se sabe el por qué de estas diferencias en la tasa de degeneración entre los distintos tipos celulares que expresan *nna1*. En las poblaciones que presentan mejor conservación cabe pensar en una menor dependencia de *Nna1*, en la existencia de posibles mecanismos compensatorios o en una influencia beneficiosa del conjunto de células gliales.

En cuanto al patrón espacial, se ha comprobado que la degeneración de las células fotorreceptoras en las retinas *pcd/pcd* sigue un gradiente centro-periferia y ventro-dorsal (LaVail *et al.*, 1982). Un claro gradiente centro-periferia se observa también en la degeneración de los fotorreceptores en los animales *rd1* (Strettoi *et al.*, 2003); y en los *rd10*, donde se ha descrito un retraso evidente en la desaparición de hileras en la CNE en la periferia respecto a la zona central de la retina (Gargini *et al.*, 2007). Asimismo, la retinosis pigmentaria humana comienza normalmente en la retina medio-periférica y progresa hasta afectar a la mácula (Milam *et al.*, 1998). Las causas de estas diferencias regionales son desconocidas, aunque se especula con los diferentes niveles de intensidad lumínica que reciben las distintas partes del ojo (Heckenlively *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1994; Milam *et al.*, 1998).

Por otra parte, en ninguna de las retinas *pcd/pcd* estudiadas en este trabajo se habían perdido completamente los fotorreceptores. Así, en el estadio de mayor edad considerado (p270) hemos detectado la presencia de entre 2 y 4 estratos en la CNE. Esto parece ser una diferencia importante entre el ratón *pcd/pcd* y otros modelos de degeneración de fotorreceptores. En este sentido, en los ratones *rd1* se verifica la pérdida total de las células fotorreceptoras de la retina en tan sólo 3 semanas (Farber y Lollery, 1974; Bowes *et al.*, 1990; Strettoi y Pignatelli, 2000; Chang *et al.*, 2002; Strettoi *et al.*, 2002, 2003; Otani *et al.*, 2004); mientras que en los ratones *rd10* solo se observa una capa de fotorreceptores a p45, constituida principalmente por conos aberrantes (Gargini *et al.*, 2007). Así también, en las ratas *p23H* la CNE se reduce a 3-4 estratos en sólo 40 días, mientras que a p270 sólo es posible reconocer algún fotorreceptor esporádico (Cuenca *et al.*, 2004).

## 1.2.- MUERTE POR APOPTOSIS

Mediante la técnica de TUNEL hemos detectado la existencia de fenómenos apoptóticos en las retinas de animales *pcd/pcd*. Las células positivas a TUNEL se localizaron solo en la CNE, lo que, en principio, lleva a pensar que en estas retinas sólo se pierden células fotorreceptoras.

En los ratones mutantes *rd10* se ha demostrado que los fotorreceptores en degeneración son positivos a marcadores de apoptosis (FluoroJade y TUNEL), observándose una tinción máxima entre p20 y p25 y la existencia de un gradiente centro-periferia (Gargini *et al.*, 2007).

Asimismo, la apoptosis se ha postulado como el mecanismo de muerte de los fotorreceptores en las retinas de pacientes afectados de retinosis pigmentaria (Li y Milam, 1995; Milam *et al.*, 1998).

## 2.- VÍA CENTRÍPETA

### 2.1.- CÉLULAS BIPOLARES

El empleo de anticuerpos contra PKC $\alpha$  ha puesto de manifiesto cambios morfológicos en las células bipolares de bastón en nuestro modelo experimental, de forma similar a lo descrito en los ratones *rd1* (Strettoi y Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003), *rd10* (Gargini *et al.*, 2007), *crx*<sup>-/-</sup> (Pignatelli *et al.*, 2004) y la rata *P23H* (Cuenca *et al.*, 2004). Dichos cambios siguen, con algunas excepciones, un patrón común en todos estos modelos, consistente en una pérdida de los penachos dendríticos y en una reducción más o menos acusada de las arborizaciones y terminales axónicas.

La atrofia progresiva de los penachos dendríticos de las células bipolares de bastón es muy similar en todos los modelos; si bien la rapidez con la que estas células pierden completamente sus dendritas es proporcional a la velocidad a la que degeneran las células fotorreceptoras en los modelos animales citados. Se ha propuesto que la pérdida de la señal procedente de las células fotorreceptoras es la causa de la degeneración del árbol dendrítico de las células bipolares de bastón (Strettoi *et al.*, 2003).

Las modificaciones en las arborizaciones axónicas y la pérdida de las varicosidades terminales en las células bipolares de bastón son bastante semejantes en los ratones *rd1* (Strettoi *et al.*, 2002, 2003) y las ratas *P23H* (Cuenca *et al.*, 2004). En ambos modelos, las arborizaciones axónicas que presentan estas células en la CPE son cada vez más simples y las varicosidades terminales más pequeñas (llegando incluso a desaparecer) respecto a los animales silvestres. Por contra, en los ratones *rd10* no se han observado cambios evidentes en la morfología, tamaño y complejidad de los árboles axónicos de estas células (Gargini *et al.*, 2007).

En las retinas *pcd/pcd* también se aprecia una inmunorreactividad ligeramente inferior en las arborizaciones axónicas y una disminución del número de varicosidades terminales en las células bipolares respecto a las retinas controles; sin embargo, esta degeneración es más suave que la descrita en los ratones *rd1* y las ratas *p23H*. La explicación a estas diferencias podría residir en la mayor velocidad de degeneración de la CNE que presentan los animales *rd1* y *P23H* respecto a nuestro modelo experimental y en la permanencia de numerosos conos y un cierto





número de bastones incluso en los estadios de degeneración más avanzados (de los considerados en este estudio) en las retinas *pcd/pcd*. A este respecto, se ha observado que los terminales axónicos de las células bipolares de bastón de las retinas *rd1* presentan características ultraestructurales típicas de terminales inmaduros, tales como la presencia de perfiles tubulares y cintas sinápticas anormalmente pequeñas (Strettoi *et al.*, 2003). Este fenotipo puede ser debido a que la rápida degeneración de los fotorreceptores en estos ratones impide el normal desarrollo y maduración de las células bipolares. Por contra, las retinas de los animales *pcd/pcd* llegan a alcanzar la madurez estructural y funcional. Así, el recuento de núcleos positivos a yoduro de propidio en la CNE y los valores de los diferentes parámetros electroretinográficos en los animales *pcd/pcd* de 45 días son prácticamente idénticos a los obtenidos en los animales silvestres de la misma edad. Esto no contradice el que, a medida que progresa la degeneración de los fotorreceptores en los ratones *pcd/pcd*, la pérdida de la señal procedente de estas células provoque la atrofia paulatina de los penachos dendríticos en las células bipolares.

Por otra parte, no hemos encontrado una disminución en el número de células bipolares de bastón en las retinas *pcd/pcd* respecto al silvestre en ninguno de los grupos de edad considerados. Este dato contrasta con la notoria pérdida de estas células que se ha observado en las retinas de los ratones *rd1* y *rd10*. Así, en los ratones *rd1* se contabiliza una reducción de hasta el 30% en el número de células bipolares de bastón en los primeros 90 días de vida (Strettoi y Pignatelli, 2000); mientras que la disminución alcanza el 20% en los animales *rd10* durante el mismo período (Gargini *et al.*, 2007). Asimismo, en las ratas *p23H* se ha descrito una reducción del número de células bipolares positivas a PKC $\alpha$  entre p150 y p270, si bien no se ha cuantificado la magnitud de esta pérdida (Cuenca *et al.*, 2004).

## 2.2.- CÉLULAS GANGLIONARES

El marcaje con anticuerpos Rt97 y anti-islet1 pone de manifiesto que las retinas de los animales *pcd/pcd* conservan íntegramente la población de células ganglionares en todos los grupos de edad considerados, sin que se observen variaciones numéricas significativas respecto a los animales silvestres. Tampoco hay modificaciones morfológicas aparentes en los axones de estas células en los animales mutantes respecto a los silvestres.

Además de con islet-1 y Rt97, las células ganglionares también se marcan con otros anticuerpos empleados en este trabajo, tales como las proteínas ligantes de calcio calbindina, calretinina y S100. Sin embargo, estos anticuerpos también pueden teñir algunas células amacrinas desplazadas presentes en la CCG, por lo que no se han considerado marcadores diferenciales de células ganglionares. En cualquier caso, el patrón de expresión de estas proteínas no presenta cambios aparentes en las retinas *pcd/pcd* respecto a las retinas silvestres.



En las retinas de los ratones mutantes *rd*, la población de células ganglionares tampoco presenta variaciones significativas en comparación con los respectivos controles (Radner *et al.*, 2002); mientras que en las ratas transgénicas *P23H*, las células ganglionares todavía no han sido estudiadas en detalle.

Por otra parte, en las ratas *RCS* (Villegas-Pérez *et al.*, 1998) y en algunos pacientes afectados de retinosis pigmentaria, especialmente en la forma ligada al cromosoma X (que es la forma menos frecuente, pero a su vez, la que presenta peor pronóstico) (Stone *et al.*, 1992) si se aprecia una significativa reducción del número de células ganglionares. En las ratas *RCS*, esta disminución es consecuencia de la compresión que sufren los axones de las células ganglionares por parte de algunos vasos sanguíneos, lo que acaba provocando la muerte de la célula como resultado de la interrupción del transporte axonal (Villegas-Pérez *et al.*, 1998). Para explicar la pérdida de células ganglionares en las retinas de pacientes con retinosis pigmentaria, se ha sugerido que la muerte de estas células es el resultado de una degeneración transneuronal como consecuencia de la pérdida de los fotorreceptores (Milam *et al.*, 1998). No obstante, otros autores han propuesto la migración de células del epitelio pigmentario a espacios perivasculares en la retina interna, lo que provoca alteraciones en el aporte sanguíneo a las neuronas, como posible causa de muerte de las células ganglionares en estas retinas (Li *et al.*, 1995).

### 3.- VÍAS TRANSVERSALES

#### 3.1.- CÉLULAS HORIZONTALES

En las retinas de los animales mutantes *pcd/pcd* no se advierten variaciones en el número de células horizontales marcadas con anticuerpos contra calbindina respecto a los animales silvestres. Sin embargo, en las retinas *pcd/pcd* si es posible apreciar una ligera disminución de la inmunorreactividad a este marcador en los procesos de estas células presentes en la CPE. No obstante, esta variación parece menos acusada que la que presentan los penachos de las células bipolares de bastón. Además, en los grupos de edad más avanzados (p180 y p270), es posible observar en secciones de retinas *pcd/pcd* somas de células horizontales ubicados en posiciones más esclerales de lo habitual.

En las ratas *P23H*, el estado de las células horizontales es similar al que acabamos de describir para nuestro modelo animal. Así, en los mutantes *P23H* no se han encontrado modificaciones ni en el número ni en el tamaño de los somas de las células horizontales marcadas con anticuerpos contra calbindina, aunque si se ha observado una ubicación ligeramente más escleral de los mismos y una pérdida de procesos marcados en el transcurso de la degeneración (Cuenca *et al.*, 2004). Se desconoce el motivo por el cual el soma de las células horizontales se desplaza a posiciones más esclerales en nuestro modelo, el ratón *pcd/pcd*, y en las ratas *P23H*.

Al contrario que en los mutantes *pcd/pcd* y *P23H*, la población de células horizontales sufre acusadas modificaciones en las retinas de los ratones mutantes *rd*. Así, se ha verificado la



pérdida del 18% de estas células en los 3 primeros meses de vida en los animales *rd1* (Strettoi y Pignatelli, 2000) y del 19% en los ratones *rd10* durante el mismo intervalo (Gargini *et al.*, 2007). Además de estas variaciones numéricas, se ha observado que las células horizontales muestran ramificaciones orientadas radialmente que penetran de forma anómala en la CNI de las retinas *rd1* (Strettoi *et al.*, 2003), fenómeno que no se produce en las retinas de los animales *rd10* (Gargini *et al.*, 2007). Tanto en los ratones *rd1* como *rd10* se ha comprobado que los complejos axónicos crecen paulatinamente para ser cada vez más gruesos (a la vez que van perdiendo los procesos más delgados), que los somas de estas células se hipertrofian y se sitúan irregularmente a través de la retina y que se van perdiendo las dendritas más delgadas (Strettoi y Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003; Gargini *et al.*, 2007).

En nuestro modelo no hemos observado procesos de células horizontales fuera de la CPE; por lo que no hemos encontrado procesos orientados radialmente penetrando en la CNI o en la CNE, a pesar de que algunos somas de estas células ocupen una posición más escleral de lo habitual.

Por su parte, en la retina de pacientes afectados de retinosis pigmentaria si se han llegado a identificar procesos anormales, que surgen del soma de las células horizontales y se extienden apicalmente para alcanzar posiciones próximas a la MLE (Fariss *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce si en estas retinas se verifica una pérdida en el número de células horizontales.

### 3.2.- CÉLULAS AMACRINAS

En el caso de las células amacrinas, observamos diferencias notables en los resultados de los marcadores empleados en este estudio: calretinina y calbindina. Usando anticuerpos contra calretinina no hemos encontrado variaciones significativas, ni en el número de células amacrinas marcadas ni en el patrón espacial de expresión, entre las retinas de los animales *pcd/pcd* y los silvestres. Por contra, es evidente la disminución en el número de células amacrinas positivas a calbindina, así como en la intensidad de la tinción, en las retinas *pcd/pcd* respecto a las retinas de animales silvestres. El doble inmunomarcaje con anticuerpos contra calbindina y calretinina pone de manifiesto la existencia de tres subtipos de células amacrinas en relación a estos marcadores:  $CB^+/CR^-$ ,  $CB^-/CR^+$  y  $CB^+/CR^+$ , por lo que no existe contradicción entre la conservación del número de células amacrinas positivas a calretinina y la pérdida de amacrinas positivas a calbindina. En cualquier caso, la disminución del número de células amacrinas en los ratones *pcd/pcd* resulta llamativa, máxime cuando el recuento de células bipolares de bastón no ha mostrado diferencias significativas entre animales silvestres y mutantes, y podría reflejar diferentes sensibilidades ante la pérdida de las señales pre-sinápticas en ambos tipos celulares. A este respecto, se han descrito hasta 40 tipos diferentes de células amacrinas (Mariani, 1990; Kolb *et al.*, 1992), por lo que es probable que tengamos que recurrir a marcadores con mayor poder de discriminación entre unos tipos y otros para poder establecer en nuestro modelo animal posibles diferencias en subtipos concretos de células amacrinas.



En el resto de modelos animales de degeneración de fotorreceptores, hay diferencias en el grado de conservación de la población de células amacrinas. Así, no se han descrito variaciones significativas en los ratones *rd* (Strettoi *et al.*, 2003; Gargini *et al.*, 2007), el ratón *crx<sup>-/-</sup>* (Pignatelli *et al.*, 2004) y el cerdo mutante P347L (Peng *et al.*, 2000). Por contra, en las ratas mutantes *P23H* se ha comprobado que el número de células amacrinas AII disminuye a medida que avanza la degeneración, a la vez que sus apéndices lobulares desaparecen progresivamente (Cuenca *et al.*, 2004). Además, los procesos dendríticos de las células AII se vuelven más delgados y más numerosos, perdiendo su patrón normal de estratificación en la CPI (Cuenca *et al.*, 2004). La explicación a estas modificaciones en las poblaciones de células amacrinas podría estar en relación con las reorganizaciones sinápticas en las vías visuales de conos y bastones observadas en este modelo, o bien podrían ser el resultado directo de la pérdida de la señal procedente de los bastones vía células bipolares de cono (Cuenca *et al.*, 2004).

En retinas humanas con retinosis pigmentaria se ha observado el desarrollo anormal de procesos en células amacrinas gabaérgicas y glicinérgicas (Fariss *et al.*, 2000). Además, se han encontrado procesos pertenecientes a células amacrinas entre las células ganglionares y las fibras del nervio óptico, y otros que se extienden a través de la CPE y la CNE, llegando incluso a alcanzar la MLE (Fariss *et al.*, 2000). Se desconoce la razón de estas modificaciones, así como si las alteraciones morfológicas van acompañadas de una disminución del número de células.

#### **4.- MARCADORES RELACIONADOS CON LA SINAPSIS**

En las retinas *pcd/pcd* se observa una sensible disminución de la inmunorreactividad a syntaxina en relación con los animales silvestres. Por contra, la inmunorreactividad a sinapsina no sólo no disminuye en las retinas *pcd/pcd* respecto a las retinas de animales silvestres, sino que aumenta ligeramente en la sublámina 1 de la CPI.

El signo contrario encontrado en las variaciones en los patrones de expresión de estos dos marcadores relacionados con la sinapsis pudiera ser debido a reajustes sinápticos en las retinas de los ratones *pcd/pcd* durante el transcurso de la degeneración de las células fotorreceptoras.

La idea de reorganizaciones sinápticas en las vías visuales también se ha propuesto en la rata *P23H* para explicar algunas modificaciones encontradas en la población de células amacrinas (Cuenca *et al.*, 2004). En la sublámina 1 de la CPI (donde hemos encontrado un aumento en la inmunorreactividad a sinapsina en las retinas *pcd/pcd*) extienden sus ramificaciones algunos tipos de células amacrinas, incluyendo a las células amacrinas positivas a tiroxina hidroxilasa (Dacey, 1990).

En cuanto a la inmunorreactividad a bassoon, hemos apreciado una disminución de marcaje en la CPE en las retinas *pcd/pcd* respecto a las retinas controles en los dos últimos estadios de edad considerados (p180 y p270). Esta reducción de inmunotinción es consecuente con la pérdida de células fotorreceptoras que sufren los animales *pcd/pcd*, ya que la proteína bassoon se localiza en las sinapsis “en cinta” establecidas por conos y bastones (Brandstätter *et al.*,



1999). Por contra, el patrón de inmunomarcaje en la CPI es muy similar en las retinas silvestres y *pcd/pcd* a lo largo de todo el intervalo p45-270.

En las ratas *p23H* se ha observado una disminución en la inmunorreactividad a bassoon asociada a bastones desde p21. Esta reducción progresa hasta que a p270 solo se observan en la CPE grupos desorganizados de puntos inmunomarcados. Además, la inmunorreactividad a bassoon también disminuye paulatinamente en la CPI de la retina de estos animales (Cuenca *et al.*, 2004).

También se han encontrado modificaciones en otras proteínas relacionadas con la sinapsis. Así, se ha descrito una disminución en la inmunorreactividad para el receptor de glutamato mGluR6 en los ratones *rd1* (Strettoi *et al.*, 2003) y *rd10* (Gargini *et al.*, 2007) y en la rata transgénica *P23H* (Cuenca *et al.*, 2004). Esta pérdida de inmunotinción está acompañada por cambios en la distribución de la proteína, apareciendo marcaje positivo en la membrana del soma y del axón de las células bipolares de bastón (Strettoi *et al.*, 2003; Cuenca *et al.*, 2004; Gargini *et al.*, 2007). Por otra parte, en retinas humanas afectadas de retinosis pigmentaria se ha observado una menor inmunorreactividad a sinaptofisina (una glicoproteína que se une al calcio que forma parte de la membrana de las vesículas sinápticas) en la CPE (Fariss *et al.*, 2000).

En resumen, parece que ante situaciones de pérdida de fotorreceptores se producen reajustes sinápticos en las vías visuales. Sin embargo, se conoce muy poco de esas posibles reorganizaciones ni del objetivo de las mismas.

## **5.- CÉLULAS GLIALES**

### **5.1.- CÉLULAS DE MÜLLER**

#### **5.1.1.- Expresión de GFAP**

En las retinas de los animales silvestres, las células de Müller son poco inmunorreactivas para GFAP. Sólo en la periferia, algunos procesos de estas células son positivos a este marcador.

Por contra, en las retinas de los animales *pcd/pcd*, el número de procesos de células de Müller positivos a GFAP aumenta notablemente a medida que envejece el animal y progresa la degeneración de las células fotorreceptoras. Se observa un claro gradiente periferia → centro en este incremento en la inmunorreactividad a GFAP por parte de las células de Müller; un resultado especialmente llamativo si se tiene en cuenta que la degeneración de las células fotorreceptoras sigue un gradiente centro → periferia (LaVail *et al.*, 1982).

Esta reacción de las células de Müller es una característica habitual en otros modelos de retinopatías. Así, también se ha descrito un incremento de expresión de GFAP por parte de las células de Müller en los ratones *rd* (Strettoi *et al.*, 2002; 2003; Gargini *et al.*, 2007), en la rata *RCS* (Villegas-Pérez *et al.*, 1998) y en numerosos ejemplos más de distrofias retinianas (Sheedlo *et al.*, 1992; de Raad *et al.*, 1996; Rungger-Brandle *et al.*, 2000). Además, en la retina de los pacientes afectados de retinosis pigmentaria también se observa un fuerte incremento en la expresión de GFAP a lo largo del citoplasma de estas células (Milam *et al.*, 1998).



Teniendo en cuenta que la GFAP tiene funciones estructurales, se puede pensar que las células de Müller aumentan la expresión de esta proteína con el fin de asegurar la arquitectura de la retina (Fariss *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2000). Así, el soporte estructural que confieren a la retina los procesos radiales de las células de Müller podría verse reforzado gracias a un citoesqueleto más robusto.

### 5.1.2.- Expresión de EAAT-4

La inmunorreactividad a EAAT-4 que presentan las células de Müller muestra un patrón espacial muy parecido al descrito para la GFAP, tanto en las retinas de animales silvestres como en las de animales *pcd/pcd*. Así, en los ratones silvestres, las células de Müller tan solo presentan unos pocos procesos radiales positivos a EAAT-4 en la periferia de la retina. Por contra, en las retinas de ratones *pcd/pcd*, el número de procesos de células de Müller positivos a EAAT-4 aumenta de manera acusada a medida que progresa la degeneración de los fotorreceptores. Al igual que en el caso de la GFAP, este incremento de inmunorreactividad demuestra un gradiente periferia -> centro, si bien la extensión de retina donde aparecen procesos radiales marcados es menor en el caso del marcaje con EAAT-4 respecto al marcaje con GFAP.

La función principal de la familia de transportadores a la que pertenece la proteína EAAT-4 es reducir las concentraciones potencialmente tóxicas de glutamato mediante la captura de este neurotransmisor en los terminales nerviosos y las células gliales (Dunlop *et al.*, 1999; Levenson *et al.*, 2002; Rodríguez-Kern *et al.*, 2003; Petralia *et al.*, 2004; Pignataro *et al.*, 2005). Por tanto, el aumento de expresión de EAAT-4 en las poblaciones gliales de los ratones *pcd/pcd* puede mejorar la capacidad de estas células para evitar acúmulos peligrosos de glutamato en las retinas de estos animales. Por otro lado, el transportador EAAT-4 se caracteriza por su elevada permeabilidad al cloro (Ward *et al.*, 2004); por lo que su expresión en las células de Müller podría contribuir en el papel que juegan estas células en el mantenimiento de la homeostasis iónica del medio extracelular. En este sentido, se ha llegado a especular con la posibilidad de que, en las células de Purkinje, la proteína EAAT-4 pueda actuar más como un canal de iones cloro que como un transportador de glutamato (Ward *et al.*, 2004).

La existencia de transportadores de glutamato en la retina es un hecho conocido desde hace tiempo (Rauen *et al.*, 1996, 1998; Eliasof *et al.*, 1998). Sin embargo, la presencia de la proteína EAAT-4 en la retina fue demostrada por primera vez en el año 2004, localizándose en la población astrocitaria de la CFNO de la rata (Ward *et al.*, 2004). A partir de entonces, se ha observado expresión de este transportador en los astrocitos y el epitelio pigmentario de la retina de gato (Fyk-Kolodziej *et al.*, 2004) y en los segmentos externos de conos y bastones de retinas humanas y en los segmentos externos e internos en retinas de ratón y ardilla (Pignataro *et al.*, 2005), si bien es importante indicar que en este estudio se señala la falta de expresión de EAAT-4 en cualquier otra capa de estas retinas). Además, se ha comprobado la presencia de ARNm de la



proteína EAAT-4 en células bipolares de bastón en retinas de macaco (Hanna y Calkins, 2007). Por otra parte, en modelos de daño en la retina, solo se tienen datos sobre la expresión del transportador EAAT-4 en ratas *SD* con diabetes inducida (Ward *et al.*, 2005). En la retina de estas ratas se ha observado un ligero incremento en la expresión de esta proteína respecto a los valores controles, aunque estas diferencias no alcanzan la significancia estadística (Ward *et al.*, 2005).

En este trabajo hemos demostrado, por primera vez, la presencia de EAAT-4 en la población de astrocitos de la CFNO en retinas de ratones silvestres. Además, hemos comprobado el incremento de expresión de este transportador de glutamato en los astrocitos, así como la aparición de inmunorreactividad en las células de Müller, en respuesta al proceso de degeneración de las células fotorreceptoras que sufren las retinas de los ratones *pcd/pcd*.

### 5.1.3.- Expresión de GS

Las células de Müller muestran una inmunorreactividad a GS muy similar en las retinas de animales silvestres y en aquellas de animales *pcd/pcd*. No obstante, si es posible apreciar algunas diferencias entre ambas.

En las retinas de los animales silvestres, los cuerpos de las células de Müller positivas a GS se sitúan a la misma altura dentro de la CNI, conformando una hilera simple en las secciones transversales de retina. Esta ordenada disposición se pierde en las retinas de los ratones *pcd/pcd*, donde es posible observar cuerpos de células de Müller marcados con GS situados a diferentes niveles dentro de la CNI, algunos muy próximos a la CPE.

En las retinas humanas afectadas de retinosis pigmentaria también se ha descrito la migración del núcleo de las células de Müller desde la CNI a zonas más externas (Milam *et al.*, 1998). No se conoce cual es el motivo del movimiento del núcleo de las células de Müller hacia zonas más externas, pero podría estar relacionado con la capacidad de estas células para fagocitar desechos neurales (Milam *et al.*, 1998).

Otra diferencia apreciable entre las retinas *pcd/pcd* y silvestres en cuanto a la tinción con GS la encontramos en la CPE. En la retina de los ratones *pcd/pcd* se ha observado una sensible disminución de la inmunorreactividad a GS en la CPE respecto a los animales silvestres. Es lógico pensar que la pérdida de células fotorreceptoras en las retinas *pcd/pcd* tenga como consecuencia inmediata la menor liberación de glutamato a los espacios sinápticos en la CPE (un hecho que podría considerarse en línea con la disminución en la inmunorreactividad a sintaxina que se observa también en esta capa en las retinas *pcd/pcd*). La menor cantidad de glutamato en la CPE y, por ende, la menor necesidad de transformación enzimática del mismo por parte de las células de Müller, podría justificar la menor presencia de GS en esta zona. Por otra parte, podría tratarse de un mero reajuste estructural en las prolongaciones de las células de Müller paralelo a la paulatina reducción del grosor de la CPE en las retinas *pcd/pcd*.





No se han documentado variaciones significativas en el patrón de inmunorreactividad a GS en otros modelos animales de degeneración de fotorreceptores, como son el ratón *rd1* (Strettoi *et al.*, 2003) y el ratón *rd10* (Gargini *et al.*, 2007).

#### 5.1.4.- Expresión de S100

El marcaje con anticuerpos contra la proteína S100 confirma el desplazamiento del núcleo de las células de Müller a posiciones más esclerales en los ratones *pcd/pcd*. Además, se aprecia un incremento de inmunorreactividad a S100 en las prolongaciones de estas células dirigidas a la MLI en los animales *pcd/pcd* respecto a los silvestres.

Las proteínas S100 cumplen numerosas funciones, tanto intracelulares como extracelulares. Entre las funciones intracelulares se incluye la regulación de diferentes procesos como la fosforilación de proteínas, la actividad de algunos enzimas, la homeostasis del calcio y la dinámica de los componentes del citoesqueleto (Donato, 1999; Salama *et al.*, 2007). A nivel extracelular, algunos miembros de la familia S100 actúan como quimioatrayentes de leucocitos, activadores de macrófagos y moduladores de la proliferación celular (Devery *et al.*, 1994; Lau *et al.*, 1995; Cornish *et al.*, 1996; Yen *et al.*, 1997; Hiratsuka *et al.*, 2006; Salama *et al.*, 2007).

En vista del incremento de inmunomarcaje para esta proteína en las células de Müller y en los astrocitos de los ratones *pcd/pcd*, puede pensarse que esas funciones están potenciadas en estos animales. En concreto, un mejor control sobre los iones de calcio (S100) y cloro (EAAT-4) pueden potenciar la capacidad de las células de Müller para asegurar el mantenimiento de la homeostasis iónica en las retinas *pcd/pcd*.

#### 5.2.- ASTROCITOS

En los animales mutantes *pcd/pcd*, los astrocitos reaccionan de manera sensible ante la degeneración que sufren las células fotorreceptoras en la retina.

Un primer signo de esta reacción es el aumento evidente en la inmunorreactividad a GFAP en la población astrocitaria de las retinas *pcd/pcd* respecto a las silvestres. Así, es posible observar un incremento del número de “celdillas” que forman los procesos astrocitarios positivos a este marcador en la CFNO en la retina de nuestro modelo; dicho de otro modo, la malla que conforman las prolongaciones de los astrocitos es más densa en los ratones *pcd/pcd* que en los controles. El inmunomarcaje con anticuerpos contra la proteína S100 muestra un patrón idéntico al observado en el caso de la GFAP, confirmando el incremento de la complejidad del entramado astrocitario en la CFNO de los animales *pcd/pcd*.

Además, en los animales mutantes *pcd/pcd* aparecen grandes astrocitos positivos a GFAP en la CPI (una ubicación anómala para este tipo glial, que no hemos observado en ningún caso en animales silvestres). No podemos precisar el papel que tienen los astrocitos en esta inusual posición, pero podría estar relacionado, entre otras funciones, con la homeostasis iónica,





la regulación del metabolismo de neurotransmisores o el metabolismo energético (a este respecto, conviene recordar que los astrocitos constituyen un reservorio de glucosa en forma de glucógeno (Höllander *et al.*, 1991; Kolb *et al.*, 2000)).

En otros modelos de pérdida de fotorreceptores, tales como los ratones *rd1* y *rd10* y las ratas *RCS* y *P23H*, no se conocen las posibles modificaciones que experimenta la población de astrocitos en respuesta a la degeneración de la retina.

En casos de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), los astrocitos también presentan una elevada inmunorreactividad a GFAP y se comprueba que procesos astrocitarios penetran al humor vítreo desde la CFNO (Ramírez *et al.*, 2001). En estas retinas afectadas de DMAE es posible encontrar no solo procesos sino astrocitos enteros dentro del humor vítreo, fuera de la retina (Ramírez *et al.*, 2001). La misión de estos astrocitos podría ser el intercambio de nutrientes y desechos entre el humor vítreo y la retina (Ramírez *et al.*, 2001). Por último, en estadios avanzados de DMAE se ha comprobado que los astrocitos muestran una actividad fagocítica muy intensa (Ramírez *et al.*, 2001).

En la retina de pacientes afectados de retinosis pigmentaria se ha comprobado la proliferación y migración de astrocitos. Así, se ha observado la proliferación de astrocitos fibrosos en la superficie de la CNO, que después migran a través de roturas en la MLI para formar membranas epirretinianas que se extienden sobre la región peripapilar y la mácula, llegando con el tiempo a alcanzar zonas más periféricas de la retina (Milam *et al.*, 1998). Estas membranas suelen estar formadas por varias capas de células aplastadas y, a menudo, contienen pies de células de Müller (Milam *et al.*, 1998). También se sabe que en estadios avanzados de la enfermedad, cuando se ha producido una pérdida acusada de células ganglionares, hay una notoria presencia de astrocitos en la retina interna, aunque tampoco se ha descrito la función exacta de estas células en esa ubicación (Milam *et al.*, 1998).

En las retinas *pcd/pcd*, también se aprecia un incremento en la inmunorreactividad de los astrocitos para la proteína EAAT-4, si bien este aumento no es tan acusado como el que se acaba de describir para el caso de la GFAP. Además de lo expuesto en apartados anteriores al tratar las funciones de este transportador, se ha propuesto que la captura del glutamato por los astrocitos de la retina podría ser importante para la regulación de la comunicación dentro de la CFNO y la protección de los axones de las células ganglionares de la excitotoxicidad inducida por glutamato (Ward *et al.*, 2004). Estas funciones podrían estar potenciadas en las retinas *pcd/pcd* al comprobarse que la población astrocitaria presenta mayor cantidad de transportadores de glutamato como el EAAT-4.

### 5.3.- CÉLULAS DE MICROGLÍA

En las retinas de los ratones silvestres encontramos células microgliales con morfología típica de microglía en estado residente, esto es, células de morfología estrellada en estrecha relación con los vasos sanguíneos de las capas internas de la retina (Provis *et al.*, 1995; Gupta *et al.*,

2003). En ningún caso se han encontrado células microgliales entre las células fotorreceptoras en las retinas de animales silvestres.

Por contra, en las retinas de los ratones *pcd/pcd* aparecen numerosas células microgliales entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores. Estas células presentan un cuerpo celular notablemente más grande que el habitual y procesos muy densos e inmunorreactivos. La presencia de células microgliales en las capas CNE y SF en las retinas *pcd/pcd* se detecta ya en el primer estadio de edad considerado (p45) y es una constante a lo largo del envejecimiento de estos animales.

La localización de células microgliales en las capas más externas de la retina es común en otros modelos de degeneración de fotorreceptores, como las ratas *RCS* (Thanos y Ritcher, 1993; Thanos *et al.*, 1995; Roque *et al.*, 1996), los ratones *rd* (Zeiss y Johnson, 2004) y en casos de daño retiniano inducido por exceso de luz (Harada *et al.*, 2002). En el propio ratón *pcd/pcd*, LaVail y colaboradores (1982) ya apuntaron la presencia de células con aspecto macrofágico en las capas CNE y SF de la retina. Asimismo, en las retinas de pacientes afectados de retinosis pigmentaria se ha observado la presencia de microglía activa en la CNI, CNE y en el espacio subretinal (Gupta *et al.*, 2003).

La proliferación y migración de las células microgliales a las capas más externas de la retina parece estar desencadenada por la apoptosis de las células fotorreceptoras (Zeiss y Johnson, 2004). En este sentido, se ha apuntado que el estímulo más efectivo para la activación de la microglía es la muerte celular (Aloisi, 2001). En el presente trabajo, gracias a la técnica de TUNEL, hemos observado la existencia de apoptosis en la CNE de las retinas de animales *pcd/pcd*.

La función característica de las células microgliales activadas es la de fagocitar los desechos celulares generados durante la muerte de las células fotorreceptoras (Kolb *et al.*, 2000; Ng y Strelein, 2001, Gupta *et al.*, 2003). Además de esta función, se ha comprobado que las células de microglía activada secretan moléculas que afectan a las células adyacentes. Hay estudios que apuntan a que esta intervención de la microglía tiene efectos perjudiciales sobre las neuronas normales que rodean a las que están degenerando, ocasionando un efecto “penumbra” (Streit, 2001; Williams y Hickey, 2002). Entre las moléculas secretadas por la microglía con efectos adversos para la supervivencia neuronal se incluyen el óxido nítrico, algunas especies reactivas de oxígeno, citoquinas pro-inflamatorias, aminoácidos excitatorios, proteasas y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Lee *et al.*, 2002). En las ratas *RCS* se ha comprobado que si se bloquea la migración de las células de microglía a la retina externa, la supervivencia de los fotorreceptores mejora (Thanos *et al.*, 1995). Por último, se ha descrito que el medio condicionado por microglía activada provoca la muerte de los fotorreceptores *in vitro* (Roque *et al.*, 1999).

En este sentido, en nuestro estudio hemos observado la presencia en las capas más externas de las retinas *pcd/pcd* de células microgliales que se marcan con anticuerpos contra CD68 (marcador de microglía activada) y contra la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico. Sin embargo, la lentitud con la que degeneran las células fotorreceptoras, así como el grado de conservación del resto de poblaciones neuronales y de la funcionalidad de la retina en



los animales *pcd/pcd* a lo largo del intervalo estudiado, nos lleva a pensar que la actividad de estas células microgliales no resulta tan nociva para la supervivencia neuronal como la descrita en otros casos de daño en la retina (Thanos *et al.*, 1995; Roque *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002).

Asimismo, a pesar de todas las evidencias que apuntan a que la microglía activada tiene un efecto nocivo para las poblaciones neuronales, se ha puesto de manifiesto que las células microgliales también pueden ejercer el efecto opuesto; esto es, pueden favorecer la supervivencia de las células fotorreceptoras (Harada *et al.*, 2002). Así, las células de microglía pueden liberar factores neurotróficos como el GDNF y el CNTF; estas moléculas actúan sobre las células de Müller que reaccionan incrementando su producción de bFGF, un factor que favorece la supervivencia de los fotorreceptores (Harada *et al.*, 2002).

## **6.- RESPUESTA ELECTORRETINOGRÁFICA**

En los animales *pcd/pcd*, las respuestas electrorretinográficas de la retina sufren una paulatina atenuación a medida que avanza la pérdida de células fotorreceptoras. No obstante, en ningún caso llegan a extinguirse totalmente a lo largo del intervalo p45-270.

En otros modelos animales de degeneración de fotorreceptores, la pérdida de funcionalidad de la retina es mucho más rápida. Así, en los ratones *rd1*, el ERG mediado por bastones no llega a ser normal a ninguna edad (Strettoi *et al.*, 2003); mientras que en los ratones *rd10*, las respuestas electrorretinográficas pueden ser registradas entre p14 y p28, para, a partir de esta edad, atenuarse hasta ser indetectables (Gargini *et al.*, 2007).

### **6.1.- RESPUESTA ESCOTÓPICA UMBRAL (STR)**

El trazado electrorretinográfico correspondiente a la respuesta STR obtenido en la retina de los animales silvestres consta de un primer componente positivo (pSTR) seguido de un componente de polaridad negativa (nSTR), presentando una forma muy similar a la descrita en el primer trabajo que demuestra la existencia de STR en las retinas murinas (Saszik *et al.*, 2002). Asimismo, los valores de tiempo implícito de los componentes pSTR y nSTR medidos en nuestras retinas silvestres son prácticamente iguales a los obtenidos por Saszik y cols. (110 ms y 200 ms respectivamente) (Saszik *et al.*, 2002).

La respuesta STR se genera en las capas internas de la retina y se piensa que es consecuencia de la actividad de las células amacrinas y ganglionares (Sieving *et al.*, 1986; Frishman y Steinberg, 1989a,b; Naarendorp y Sieving, 1991; Saszik *et al.*, 2002).

En los animales *pcd/pcd* destaca la presencia de respuesta STR en todos los estadios de edad considerados, lo que supone que las retinas de los ratones *pcd/pcd* conservan la capacidad de respuesta a estímulos luminosos de muy baja intensidad, incluso cuando la pérdida de fotorreceptores es acusada (p180-270). No obstante, la amplitud, tanto del componente positivo como del componente negativo, sufre una progresiva atenuación a medida que la pérdida de



células fotorreceptoras avanza en estas retinas. Esta disminución de amplitud no va acompañada de retrasos en la aparición de la respuesta, obteniéndose valores de tiempo implícito muy similares en todos los estadios de edad a los medidos en las retinas de los correspondientes animales silvestres.

En otros modelos animales de degeneración de fotorreceptores, como los ratones *rd1* y *rd10* y las ratas *p23H* y *RCS*, no se tienen datos acerca del STR, quizás porque esta respuesta eléctrica de la retina no está incluida dentro de los cinco trazados estándar del ERG de campo lleno (Marmor *et al.*, 2004; Lam, 2005).

## 6.2.- RESPUESTA DE BASTONES

La respuesta escotópica de bastones en el ERG de mamíferos presenta una onda b prominente, pero no onda a (Lam, 2005). Esto se debe a que la respuesta eléctrica de los bastones frente al débil estímulo empleado es demasiado pequeña para ser detectada; sin embargo, esta señal de los bastones es amplificada de forma notable por las células bipolares ON (despolarizantes) específicas de bastones (Falk, 1988; Lam, 2005).

Las retinas de los animales *pcd/pcd* muestran respuesta de bastones en todo el intervalo de edad considerado; incluido p270, edad en la que se ha descrito una pérdida de hasta el 85% de estas células (LaVail *et al.*, 1982). Como cabría esperar, la amplitud de la respuesta disminuye progresivamente en las retinas *pcd/pcd* en el intervalo p45-270, si bien, como se ha dicho anteriormente, nunca llega a extinguirse. Asimismo, no hemos encontrado diferencias en el valor del tiempo implícito entre las retinas *pcd/pcd* y sus correspondientes controles en el intervalo de edades considerado. Estos datos sugieren que, en las retinas de los animales *pcd/pcd*, el conjunto del sistema de bastones (incluidos los propios bastones remanentes) funciona con normalidad. Un menor número de bastones lleva aparejado una menor despolarización de células bipolares de bastón, lo que se traduce en una onda b de menor amplitud.

En este sentido, el ratón *pcd/pcd* contrasta de manera notable con los ratones *rd1*, un modelo donde no puede registrarse el ERG mediado por bastones a ninguna edad (Strettoi *et al.*, 2003). En los ratones *rd10*, la retina presenta respuestas electroretinográficas entre p14 y p28, observándose una reducción de la amplitud de la onda b respecto al silvestre para cualquier intensidad del estímulo luminoso (Gargini *et al.*, 2007). Por su parte, en las ratas *p23H* se ha puesto de manifiesto una importante reducción de la onda b de bastones en estadios tan tempranos como p23, siendo esta respuesta indetectable a partir de p150 (Cuenca *et al.*, 2004).

## 6.3.- RESPUESTAS ESCOTÓPICAS MIXTAS

### 6.3.1.- Onda a

Las retinas de los ratones *pcd/pcd* generan ondas a escotópicas medibles en todo el intervalo p45-270. No obstante, la amplitud de esta onda a es significativamente menor en las retinas *pcd/pcd* respecto al control en todos los grupos de edad, incluido el primero (p45).



El perfil de la onda a está directamente relacionado con la actividad eléctrica generada por la cascada de fototransducción (Penn y Hagins, 1969; Pugh y Lamb, 1993; Lam, 2005). Así, se considera que los 14-20 ms iniciales de la respuesta se deben exclusivamente a la actividad de los fotorreceptores, sin que haya una contribución significativa desde la retina interna (Jamison *et al.*, 2001; Lam, 2005).

Se ha descrito que, en las retinas *pcd/pcd*, la pérdida de células fotorreceptoras es patente desde p25 (Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982). Asimismo, en este trabajo de Tesis se ha puesto de manifiesto la presencia de células apoptóticas en la CNE de las retinas *pcd/pcd* en todo el intervalo p45-270.

Por tanto, la reducción de la amplitud de la onda a escotópica en los animales *pcd/pcd* es un reflejo directo del menor número de células fotorreceptoras presentes en las retinas de estos animales. En estadios tempranos, la pérdida de amplitud de la onda a se deberá fundamentalmente a la pérdida de bastones; mientras que, a medida que el animal *pcd/pcd* envejece, la disminución de amplitud de la onda a escotópica se deberá a la pérdida tanto de bastones como de conos.

La onda a escotópica mixta presenta menor amplitud en los ratones *rd10* que en los correspondientes silvestres en estadios muy tempranos (las diferencias ya son acusadas a p18 y aumentan rápidamente a partir de esta edad). Además de esta reducción de amplitud, también se aprecia que la onda a escotópica es más lenta y muestra un mayor tiempo implícito en los ratones *rd10* respecto al control (Gargini *et al.*, 2007).

Los datos de nuestro modelo también contrastan notablemente con los obtenidos en las ratas *p23H*. En estos animales, la onda a escotópica mixta se extingue totalmente a p38 (Cuenca *et al.*, 2004).

### 6.3.2.- Onda b

La onda b escotópica mixta es registrable en los ratones *pcd/pcd* en todo el intervalo p45-270, aunque la respuesta es menor a medida que la edad del animal aumenta. La amplitud de esta onda b muestra valores inferiores en las retinas *pcd/pcd* respecto a los correspondientes ratones silvestres en todos los estadios de edad; si bien las diferencias entre los dos grupos de animales no son tan acusadas como las observadas en el caso de la onda a escotópica mixta.

La onda b es generada primariamente por la actividad de las células bipolares ON (despolarizantes) (Müller y Dowling, 1970; Newman y Odette, 1984; Stockon y Slaughter, 1989; Guervich y Slaughter, 1993; Lam, 2005).

En los ratones *pcd/pcd* de menor edad, la disminución de amplitud de la onda b podría deberse principalmente al menor número de células bipolares de bastón activadas (todas las cuales pertenecen a la categoría ON), reflejo del menor número de bastones presentes.

A medida que los ratones *pcd/pcd* envejecen, a la pérdida de bastones se suma la de conos, con lo que la disminución de amplitud de la onda b será reflejo del menor número de



células bipolares de bastón y bipolares ON de cono activadas. No obstante, la consecuencia indirecta de la pérdida de conos en la disminución de amplitud está matizado por el hecho de que los conos no sólo hacen sinapsis con células bipolares de tipo ON, sino también con células bipolares de tipo OFF (hiperpolarizantes) (Boycott y Wässle, 1991); dicho de otro modo, la pérdida de conos que sinaptan con células bipolares OFF contribuirá de manera escasa o nula a la disminución de la onda b escotópica mixta.

Esta respuesta está profundamente alterada en otros modelos de degeneración de fotorreceptores. Así, la amplitud de la onda b escotópica mixta disminuye considerable y rápidamente en los ratones *rd10* en relación a los silvestres en el corto intervalo p18-26. Asimismo, además de la pérdida de amplitud, se observa un claro aumento del tiempo implícito de la onda; si bien, esta anomalía es menos evidente si se emplean estímulos de elevada intensidad (Gargini *et al.*, 2007). Por otra parte, en las ratas *p23H* de 23 días de edad, la amplitud de la onda b escotópica mixta muestra una reducción de  $\approx 79\%$  respecto al valor obtenido en los animales controles (Cuenca *et al.*, 2004). A partir de esta edad, la amplitud sigue disminuyendo hasta p150, donde se obtiene un valor que permanece estable hasta p250 y al que solo contribuyen los conos. Paralelo a la pérdida de amplitud, en las retinas *p23H* se observa un paulatino incremento del tiempo implícito de la respuesta (Cuenca *et al.*, 2004).

#### **6.4.- POTENCIALES OSCILATORIOS**

En los animales *pcd/pcd* es posible el registro de los potenciales oscilatorios en todas las edades consideradas; si bien el valor de la amplitud máxima disminuye progresiva y linealmente a medida que estos animales envejecen. Por otra parte, la amplitud de esta respuesta siempre es sensiblemente inferior en los animales *pcd/pcd* respecto a su contrapartida silvestre.

El origen celular de los potenciales oscilatorios se ha establecido en las células amacrinas y, con menor certeza, en las células ganglionares (Wachmeister, 1998; de la Villa y Blanco, 2004; Lam, 2005). A este respecto, algunos autores afirman que el ERG de campo lleno no recibe contribuciones desde las células ganglionares puesto que estas células siguen el modelo “todo o nada” de génesis de potenciales de acción y su actividad se evalúa con otro tipo de pruebas electrofisiológicas, como el ERG patrón (*pattern ERG*) (Lam, 2005).

En cualquier caso, la disminución de amplitud de los potenciales oscilatorios observada en los ratones *pcd/pcd* puede deberse a una menor actividad inducida en los circuitos que establecen las células amacrinas en la CPI de la retina de estos animales.

Un modelo de degeneración de fotorreceptores donde los potenciales oscilatorios se ven muy afectados lo constituye la rata *p23H*. En este modelo, los potenciales oscilatorios no han podido ser registrados en animales mayores de 23 días, y ya a esta edad presentan una pérdida de amplitud de más del 85% respecto al valor obtenido en las ratas silvestres (Cuenca *et al.*, 2004). Es más que probable que el deterioro y degeneración de las células amacrinas, en particular las del tipo AII, que sufren las ratas *p23H* estén en la base de las profundas alteraciones que presenta dicha respuesta (Cuenca *et al.*, 2004).





Del mismo modo, las alteraciones en las poblaciones de células amacrinas que hemos observado en los ratones *pcd/pcd* (particularmente la disminución del número de estas células positivas a calbindina) podrían justificar, en parte, la disminución de amplitud de los potenciales oscilatorios en su retina.

## 6.5.- RESPUESTAS DE CONOS

### 6.5.1.- Onda a fotópica

Los ratones *pcd/pcd* presentan ondas a fotópicas medibles en todos los grupos de edad considerados. A p45, la amplitud de la onda a fotópica es prácticamente idéntica entre animales *pcd/pcd* y silvestres. A partir de esta edad, la amplitud de la onda a disminuye en los ratones *pcd/pcd*, mostrando valores inferiores respecto a los ratones controles.

La fase descendente inicial de la onda a fotópica se debe a la actividad eléctrica generada por la fototransducción en los conos (Whitten y Brown, 1973; Brown *et al.*, 1990; Hood y Birch, 1993, 1995; Lam, 2005).

En el primer estadio de edad considerado (p45) no existen diferencias significativas en el número de conos entre animales silvestres y *pcd/pcd* (LaVail *et al.*, 1982). Es por ello que el valor de amplitud de la onda a fotópica es prácticamente idéntico en los animales *pcd/pcd* y silvestres a esta edad. A partir de p45, las retinas de los ratones *pcd/pcd* pierden conos de manera progresiva; si bien, a un ritmo más lento que el observado en el caso de los bastones (LaVail *et al.*, 1982). Esta pérdida de conos tiene su reflejo directo en la disminución de amplitud de la onda a fotópica que se observa en los animales *pcd/pcd*; la cual se magnifica a medida que estos animales envejecen.

En los ratones *rd1* solo se obtienen respuestas fotópicas medibles en el breve intervalo p13-16. A pesar de ello, las retinas de los animales *rd1* de 14 días muestran valores de amplitud de la onda a fotópica muy parecidos a los registrados en los animales silvestres de la misma edad (Strettoi *et al.*, 2003).

### 6.5.2.- Onda b fotópica

La onda b fotópica no se debe solo a la actividad de las células bipolares ON despolarizantes, sino que también está modelada por la actividad de las células bipolares OFF hiperpolarizantes y las células horizontales (Sieving *et al.*, 1994; Lam, 2005). De este modo, la onda b fotópica puede ser explicada por un modelo de “tirar-empujar”, con las células bipolares ON despolarizantes “tirando hacia arriba” de la fase ascendente de la onda b y con las células bipolares OFF hiperpolarizantes limitando la amplitud de la onda (Sieving *et al.*, 1994; Lam, 2005).

En los ratones *pcd/pcd*, la máxima respuesta se registra a p45 y, a partir de esta edad, se produce una disminución progresiva, lenta y lineal de la amplitud de la onda b fotópica. A pesar de que el valor de la amplitud es inferior en los ratones *pcd/pcd* respecto al silvestre, las



diferencias son poco acusadas. Asimismo, el tiempo implícito de la respuesta es prácticamente idéntico en los animales *pcd/pcd* y su contrapartida silvestre en todos los estadios de edad.

Este elevado grado de conservación de la amplitud de la onda b fotópica en los ratones *pcd/pcd* podría justificarse por la relativamente alta tasa de supervivencia de los conos en la retina de estos animales en el intervalo de edad estudiado (LaVail *et al.*, 1982). Asimismo, conviene recordar que los conos hacen sinapsis tanto con células bipolares ON como con células bipolares OFF (Boycott y Wässle, 1991). De este modo, en los ratones *pcd/pcd*, la amplitud final de la onda b fotópica estará condicionada tanto por la pérdida de elementos que “tiran hacia arriba” de la fase ascendente de esta onda (cuando se pierdan conos que sinaptan con células bipolares ON despolarizantes), como por la pérdida de elementos que limitan dicha amplitud (caso de la degeneración de conos que sinaptan con células bipolares OFF hiperpolarizantes).

La amplitud de la onda b fotópica es considerablemente menor en los ratones *rd1* de 14 días en comparación con los silvestres de la misma edad. Además, la atenuación de la respuesta está acompañada por el aumento del tiempo implícito de la misma (Strettoi *et al.*, 2003). Por su parte, las ratas *p23H* muestran una fuerte atenuación de la onda b fotópica en relación a los animales silvestres desde p23. Esta diferencia entre ratas mutantes y controles se magnifica paulatinamente a lo largo del intervalo p23-250, a la vez que se verifica un progresivo retraso en la aparición de la respuesta en las retinas distróficas (especialmente acusado entre p150 y p250) (Cuenca *et al.*, 2004).

### **6.5.3.- Respuesta flicker (20z)**

La respuesta flicker (20Hz) de conos consiste en ondas b generadas por la retina interna en respuesta a la actividad de los conos, si bien la contribución directa de estas células es muy pequeña (Kondo y Sieving, 2001, 2002; Lam, 2005). Estas ondas b están compuestas por componentes tanto de tipo ON como de tipo OFF en diferente fase, de tal manera que se cancelan parcialmente unos a otros (Kondo y Sieving, 2001, 2002; Lam, 2005).

El patrón de la amplitud de esta respuesta en función de la edad es ciertamente irregular, tanto en los ratones silvestres como en los *pcd/pcd*, sin que hayamos podido establecer una tendencia clara en ninguno de estos grupos de animales. En cualquier caso, los ratones *pcd/pcd* presentan respuesta flicker (20Hz) en todos los estadios de edad considerados en este estudio, lo que significa que el sistema de conos de la retina de estos animales conserva la capacidad de responder a estímulos luminosos de alta frecuencia. Por otra parte, el valor de la amplitud de las diferentes ondas se mantiene constante en cada registro en las retinas *pcd/pcd*; dicho de otro modo, las ondas b constituyentes de la respuesta flicker no sufren atenuaciones en los últimos flashes del estímulo luminoso.

La conservación de la respuesta flicker (20Hz) en los ratones *pcd/pcd* a lo largo de todo el intervalo p45-270 contrasta con los datos obtenidos en otros modelos de degeneración de fotorreceptores. Así, esta respuesta se extingue casi totalmente a los 14 días en los ratones *rd1*



(Strettoi *et al.*, 2003), a p26 en los animales *rd10* (Gargini *et al.*, 2007) y en torno a los 23 días de edad en las ratas *p23H* (Cuenca *et al.*, 2004).

#### 6.6.- CONSIDERACIONES FINALES

En resumen, puede afirmarse que los ratones *pcd/pcd* muestran un grado de conservación de la funcionalidad de la retina, valorada ésta en base a los distintos parámetros electroretinográficos, mucho mayor y durante más tiempo que los modelos *rd1*, *rd10* y *p23H*.

Por su parte, las respuestas del ERG sufren una progresiva atenuación en pacientes humanos con RP (Berson *et al.*, 1969; Berson y Kanfers, 1970; Massof *et al.*, 1986; Berson, 1993; Hood y Birch, 1996; Gränse *et al.*, 2004; Robson *et al.*, 2006; Gerth *et al.*, 2007). Las modificaciones que presentan las respuestas electroretinográficas en la mayoría de estos pacientes siguen un curso temporal muy similar al que hemos descrito en la retina de nuestro modelo.

Otro dato que debe resaltarse es la práctica ausencia de retraso en las respuestas eléctricas en las retinas *pcd/pcd*; lo que contrasta con el aumento del tiempo implícito, a veces de forma notable, de las diferentes ondas a y b en los modelos animales anteriormente citados. Esta diferencia cobra especial importancia si se tiene en cuenta que el tiempo implícito de la onda b puede proporcionar una medida de la sensibilidad de los fotorreceptores (Lam, 2005). Dicho de otro modo, la disminución de amplitud observada en las respuestas eléctricas de las retinas *pcd/pcd* puede ser consecuencia directa e indirecta de la pérdida de células fotorreceptoras, sin que, a priori, deba sospecharse de la integridad de los fotorreceptores remanentes. En cambio, en aquellos modelos donde la atenuación de la respuesta va acompañada por un aumento del tiempo implícito, puede pensarse que las variaciones en el ERG se deban, además de a la pérdida efectiva de fotorreceptores, a que la viabilidad de cada célula visual individual está comprometida (Strettoi *et al.*, 2003; Cuenca *et al.*, 2004; Gargini *et al.*, 2007). Así, se ha sugerido que las anomalías en el ERG de conos en pacientes afectados de RP se deben en parte a la disminución de la capacidad de absorción cuántica por parte de los segmentos externos de los CONOS (Sandberg *et al.*, 1981; Gouras y Mackay, 1989; Berson, 1993; Hood y Birch, 1996).

Por otro lado, en los ratones silvestres empleados en este estudio se ha observado una moderada atenuación de muchas de las respuestas electroretinográficas en los estadios de edad más avanzados (p180-p270). Este fenómeno también se ha observado en la rata SD silvestre, donde se ha verificado una reducción de la amplitud, tanto de la onda a como de la onda b, a medida que el animal envejece (Machida *et al.*, 2000; Cuenca *et al.*, 2004). La pérdida de bastones relacionada con la edad y el paulatino acúmulo de pequeños daños en la retina provocados por la luz se han propuesto como posibles causas del efecto del envejecimiento sobre los trazados electroretinográficos (Sullivan *et al.*, 2003; Cuenca *et al.*, 2004).

## 7.- EL RATÓN *PCD/PCD* COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES

La degeneración en las retinas *pcd/pcd* se caracteriza por:

- a.- Un período inicial donde los parámetros estructurales y funcionales son esencialmente idénticos a los observados en los animales silvestres.
- b.- Una pérdida de células fotorreceptoras lenta y progresiva. Además, se verifica que la degeneración en los bastones empieza antes y progresa más rápidamente que en los conos.
- c.- Un elevado grado de conservación del resto de poblaciones neuronales.
- d.- Una reacción glial moderada, que no parece ejercer un efecto especialmente nocivo sobre las poblaciones neuronales, y que intenta mantener la homeostasis de la retina.
- e.- Una disminución progresiva de la amplitud de las ondas a y b en el ERG, si bien ninguna respuesta electroretinográfica llega a extinguirse totalmente en el intervalo p45-270. Por otra parte, no se aprecian modificaciones significativas en el tiempo implícito de dichas respuestas.

En base a estas características consideramos que las retinas de los ratones *pcd/pcd* constituyen un buen modelo para el estudio de las enfermedades que cursan con degeneración de fotorreceptores, con especial interés en la retinosis pigmentaria humana.

Por extensión, nuestro modelo es útil para evaluar posibles terapias encaminadas a combatir dichas enfermedades. A este respecto, creemos que p90 es un buen punto temporal, puesto que a esta edad ya se aprecian cambios significativos en el número de fotorreceptores y en algunos parámetros electroretinográficos.



# Conclusiones

---



1. En los animales *pcd/pcd* la muerte por apoptosis ocurre en la CNE a nivel de los fotorreceptores a lo largo del intervalo p45-270. Sin embargo, el estudio mediante la técnica de tunel demuestra que en este modelo de retinosis no se produce apenas muerte celular en las regiones internas de la retina.

2. En líneas generales, las retinas de los animales *pcd/pcd* presentan un elevado grado de conservación de sus poblaciones de interneuronas y neuronas de proyección en todos los estadios de edad considerados en este trabajo de Tesis con pequeñas medicaciones.

3. La progresiva disminución de la inmunorreactividad a syntaxina y basoon, así como las reducción de las dendritas de las bipolares de bastón indican variaciones en los procesos sinápticos en la CPE de los ratones *pcd/pcd* a medida que progresa la degeneración de las células fotorreceptoras. Por otro lado, en la CPI de estas retinas parece ocurrir una reorganización sináptica en base a las variaciones de inmunorreactividad de los marcadores sinápticos considerados en este estudio.

4. Las retinas de los ratones *pcd/pcd* sufren gliosis reactiva. El aumento de expresión de marcadores como GFAP, EAAT4 y S100 es evidente desde los primeros estadios de edad y se magnifica a medida que envejece el animal. También son patentes variaciones en la localización de los astrocitos o la translocación del núcleo de las células de Müller a posiciones más esclerales de lo normal por lo que pudiera influir en los procesos degenerativos de la retina.

5. La apoptosis de los fotorreceptores parece atraer a la microglía hacia las capas más externas de la retina. El tiempo de máxima actuación comienza a los 45 días postnatales y se mantiene a lo largo de todo el intervalo temporal estudiado. Estas células presentan características de microglía activada.

6. Los ratones *pcd/pcd* conservan el STR y todas las respuestas eléctricas del electroretinograma de campo lleno estándar, tanto en condiciones escotópicas como fotópicas, en todo el intervalo p45-270. No obstante, se verifica una progresiva pérdida de amplitud en las respuestas a medida que progresa la pérdida de fotorreceptores en las retinas de estos animales.

7. Por todo lo anterior, consideramos que las retinas de los animales *pcd/pcd* constituyen un buen soporte para el ensayo de terapias encaminadas al tratamiento de la retinosis pigmentaria debido a su semejanza con la enfermedad en humanos. A este respecto, creemos que los datos aportados en este trabajo pueden ser útiles para evaluar la eficacia de dichos ensayos.





# Bibliografía

---



- Ahnelt, P. y Kolb H. (1994) Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopy study of spectral connectivity. *J. Comp. Neurol.* **343**: 406-427.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. (1996) *Biología molecular de la célula*. Omega, Barcelona.
- Alcalde I. (2003) Estudio neuroquímico del encéfalo del ratón mutante *pcd* y control. *Trabajo de Grado*. Universidad de Salamanca.
- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* **36**: 165-179.
- Anderton B.H., Breinburg D., Downes M.J., Green P.J., Tomlinson B.E., Ulrich J., Wood J.M. y Kahn J. (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* **298**: 84-86.
- Anderton B.H., Coakham H.B., Garson J.A., Harper A.A., Harper E.I. y Lawson S.N. (1983) A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels the large light cell population in rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* **334**: 97-98.
- Andressen C., Blüncke I. y Celio M.R. (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* **271**: 181-208.
- Arenzana F.J. (2006) Caracterización neuroquímica de las áreas visuales primarias del pez cebra en condiciones normales y en ciclopi inducida por etanol. *Tesis doctoral*. Universidad de Salamanca.
- Austin C.P., Feldman D.E., Ida J.A. y Cepko C.L. (1995) Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**: 3637-3650.
- Baker H. y Greer C.A. (1990) Region-specific consequences of *pcd* gene expression in the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* **293**: 125-133.
- Bartolomei J.C. y Greer C.A. (1998) The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in *pcd* mice. *Exp. Neurol.* **154**: 537-550.
- Bauer J., Sminia T., Wouterlood F.G. y Dijkstra C.D. (1994) Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **38**: 365-375.
- Bear M.F., Connors B.W. y Paradiso M.A. (1998) El ojo. *Neurociencia. Explorando el cerebro*. 223-229. Masson, Barcelona.
- Bennett M.K., García-Arrarás J.E., Elferink L.A., Peterson K., Fleming A.M., Hazuka C.D. y Scheller R.H. (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* **74**: 863-873.
- Berson E.L. (1993) Retinitis pigmentosa. The Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**: 1659-1676.
- Berson E.L., Gouras P., Gunkel R.D. y Myrianthopoulos N.C. (1969) Rod and cone responses in sex-linked retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* **81**: 215-225.
- Berson E.L. y Kanters L. (1970) Cone and rod responses in a family with recessively inherited retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* **84**: 288-297.
- Blanks J.C., Mullen R.J. y LaVail M.M. (1982) Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse II. Electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* **212**: 231-246.
- Bourne M.C., Campbell D.A. y Tansley K. (1938) Hereditary degeneration of the rat retina. *Br. J. Ophthalmol.* **22**: 613-623.
- Bowes C., Li T., Dancinger M., Baxter L.C., Applebury M.L. y Farber D.B. (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* **347**: 677-680.



- Boycott B.B. y Wässle H. (1991) Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *Eur. J. Neurosci.* **3**:1069-1088.
- Brandstätter J.H., Fletcher E.L., Garner C.C., Gundelfinger E.D. y Wässle H. (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 3683-3693.
- Brown G.C., Eagle R.C., Shakin E.P., Gruber M. y Arbizio V.V. (1990) Retinal toxicity of intravitreal gentamicin. *Arch. Ophthalmol.* **108**: 1740-1744.
- Buraczynska M., Mears A. J., Zareparsi S., Farjo R., Filippova E., Yuan Y., MacNee S.P., Hughes B. y Swaroop A. (2002) Gene expression profile of native human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**: 603-607.
- Bush R. y Remé C.E. (1992) Chronic lithium treatment induces reversible and irreversible changes in the rat ERG *in vivo*. *Clinical Vision Sci.* **5**: 393-401.
- Bush R.A. y Sieving P.A. (1994) A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**: 635-645.
- Campbell D.B. y Hess E.J. (1996) Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (*tg*), Purkinje cell degeneration (*pcd*), and nervous (*nr*). *Mol. Brain Res.* **37**: 79-84.
- Cardone B. y Roots B.I. (1990) Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* **3**: 180-192.
- Carter-Dawson L.D., LaVail M.M. y Sidman R.L. (1978) Differential effect of the *rd* mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **17**: 489-498.
- Chang B., Hawes N.L., Hurd R.E., Davisson M.T., Nusinowitz S. y Heckenlively J.R. (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vis. Res.* **42**: 517-525.
- Chakrabarti L., Neal J.T., Miles M., Martinez R.A., Smith A.C., Sopher B.L. y La Spada A.R. (2006) The Purkinje cell degeneration 5J mutation is a single amino acid insertion that destabilizes Nna1 protein. *Mamm. Genome* **17**: 103-110.
- Coleman M.P. y Anderton B.H. (1990) Phosphate-dependent monoclonal antibodies to neurofilaments and Alzheimer neurofibrillary tangles recognize a synthetic phosphopeptide. *J. Neurochem.* **54**: 1548-1555.
- Cornish C.J., Devery J.M., Poronnik P., Lackmann M., Cook D.I. y Geczy C.L. (1996) S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation. *J. Cell Physiol.* **166**: 427-437.
- Cuenca N., Pinilla I., Sauvé Y., Lu B., Wang S. y Lund R.D. (2004) Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of p23H transgenic rat retina. *Neuroscience.* **127**: 301-317.
- Dacey D.M. (1990) The dopaminergic amacrine cell. *J. Comp. Neurol.* **301**: 461-489.
- Dacey D.M. y Petersen M.R. (1992) Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9666-9670.
- Danciger M., Blaney J., Gao Y.Q., Zhao D.Y., Heckenlively J.R., Jacobson S.G. y Farber D.B. (1995) Mutations in the PDE6B gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Genomics* **30**: 1-7.
- Dahl D. y Bignami A. (1973) Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.* **61**: 279-293.
- Damoiseaux J.G., Dopp E.A., Calame W., Chao D., MacPherson G.G. y Dijkstra C.D. (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* **83**: 140-147.
- Danbolt N.C., Chaudhry F.A., Dehnes Y., Lehre K.P., Levy L.M., Ullensvang K. y Storm-Mathisen J. (1998) Properties and localization of glutamate transporters. *Prog. Brain Res.* **116**: 23-43.



- Das A., Pansky B., Budd G.C. y Kollarits C.R. (1984) Immunocytochemistry of mouse and human retina with antisera to insulin and S-100 protein. *Curr. Eye Res.* **3**: 1397-1407.
- Dawson T.M. y Snyder S.H. (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* **14**: 5147-5159.
- de la Villa P. y Blanco R. (2004) Métodos electrofisiológicos para el estudio de la función retiniana y sus alteraciones. [www.retinosis.org](http://www.retinosis.org).
- Dehnes Y., Chaudhry F.A., Ullensvang K., Lehre K.P., Storm-Mathisen J. y Danbolt N.C. (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* **18**: 3606-3619.
- Deininger M.H., Meyermann R. y Schluesener H.J. (2002) The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett.* **514**: 115-121.
- Devery J.M., King N.J. y Geczy C.L. (1994) Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **152**: 1888-1897.
- Dieterle P. y Gordon E. (1956) Standard curve and physiological limits of dark adaptation by means of the Goldmann-Weekers adaptometer. *Br. J. Ophthalmol.* **40**: 652-655.
- Dijkstra C.D., Dopp E.A., Joling P. y Kraal G. (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* **54**: 589-599.
- Doi M., Uji Y. y Yamamura H. (1995) Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J. Comp. Neurol.* **356**: 368-386.
- Donato R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta.* **1450**: 191-231.
- Donato R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**: 540-551.
- Dowling J.E. y Sidman R.L. (1962) Inherited retinal dystrophy in the rat. *J. Cell. Biol.* **14**: 73-109.
- Dryja T.P. (1992) Dooyne Lecture. Rhodopsin and autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Eye* **6**: 1-10.
- Dryja T.P. y Berson E.L. (1995) Retinitis pigmentosa and allied diseases: implications of genetic heterogeneity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**: 1197-1200.
- Dryja T.P., Finn J.T., Peng Y.W., McGee T.L., Berson E.L. y Yau K.W. (1995) Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10177-10181.
- Dryja T.P. y Li T. (1995) Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum. Molec. Genet.* **4**: 1739-1743.
- Dunlop J., Lou Z. y McIlvain H.B. (1999) Properties of excitatory amino acid transport in the human U373 astrocytoma cell line. *Brain Res.* **839**: 235-242.
- Edwards R.B. (1994) Biosynthesis of retinoic acid by Müller glial cells: a model for the central nervous system?. *Prog. Ret. Eye Res.* **13**: 231-242.
- Eliasof S., Arriza J.L., Leighton B.H., Kavanaugh M.P. y Amara S.G. (1998) Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J. Neurosci.* **18**: 698-712.
- Eng L.F., Vanderhaeghen J.J., Bignami A. y Gerstl B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* **889**: 251-255.
- Ericson J., Thor S., Edlund T., Jessell T.M. y Yamada T. (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *islet1*. *Science* **256**: 1555-1560.



- Fairman W.A., Vandenberg R.J., Arriza J.L., Kavanaugh M.P. y Amara S.G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**: 599-603.
- Falk G. (1988) Signal transmission from rods to bipolar and horizontal cells: a synthesis. En: *Progress in Retinal Research*. Osborne N., Chader G. (eds.). New York: Pergamon. Vol. 10. 121-160.
- Farber D.B. y Lolley R.N. (1974) Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* **186**: 449-451.
- Fariss R.N., Li Z.Y. y Milam A.H. (2000) Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* **129**: 215-223.
- Fernández-González A., La Spada A.R., Treadaway J., Higdon J.C., Harris B.S., Sidman R.L., Morgan J.I. y Zuo J. (2002) Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* **295**: 1904-1906.
- Fischer A.J., Dierks B.D. y Reh T.A. (2002) Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* **129**: 2283-2291.
- Fishman P.S. y Savitt J.M. (1989) Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **48**: 212-220.
- Freyd G., Kim S.K. y Horvitz H.R. (1990) Novel cysteine rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**: 876-879.
- Frishman L.J. y Steinberg R.H. (1989a) Intraretinal analysis of the threshold dark-adapted ERG of cat retina. *J. Neurophysiol.* **61**: 1221-1232.
- Frishman L.J. y Steinberg R.H. (1989b) Light-evoked increases in  $[K^+]_0$  in proximal portion of the dark-adapted cat retina. *J. Neurophysiol.* **61**: 1233-1243.
- Furuta A., Martin L.J., Lin C.L., Dykes-Hoberg M. y Rothstein J.D. (1997) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* **81**: 1031-1042.
- Fyk-Kolodziej B., Qin P., Dzhagaryan A. y Pourcho R.G. (2004) Differential cellular and subcellular distribution of glutamate transporter in the cat retina. *Visual Neurosci.* **21**: 551-565.
- Gallego A. (1971) Células interplexiformes de la retina del gato. *Arch. Soc. Esp. de Oftalmol.* **31**: 299-304.
- Galli-Resta L., Resta G., Tan S.S. y Reese B.E. (1997) Mosaics of *islet1*-expressing amacrine cells assembled by short-range cellular interactions. *J. Neurosci.* **17**: 7831-7838.
- Gargini C., Terzibasi E., Mazzoni F. y Strettoi E. (2007) Retinal organization in the retinal degeneration 10 (*rd10*) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J. Comp. Neurol.* **500**: 222-238.
- Gariano R.F., Sage E.H., Kaplan H.J. y Hendrickson A.E. (1996) Development of astrocytes and their relation to blood vessels in fetal monkey retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**:2367-2375.
- Geneser F. (2000) El ojo. En *Histología*. Panamericana, Buenos Aires **24**: 706-708.
- Gerth C., Wright T., Héon E. y Westall C.A. (2007) Assessment of central retinal function in patients with advanced retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**: 1312-1318.
- Ghosh K.K., Bujan S., Haverkamp S., Feigenspan A. y Wässle H. (2004) Types of bipolar cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* **469**: 70-82.
- Giulian D. y Baker T.J. (1986) Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain *J. Neurosci.* **6**: 2163-2178.
- Gouras P. y MacKay C.J. (1989) Light adaptation of the electroretinogram. Diminished in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**: 619-624.



- Graeber M.B., López-Redondo F., Ikoma E., Ishikawa M., Imai Y., Nakajima K., Kreutzberg G.W. y Kohsaka S. (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res.* **813**: 241-253.
- Graeber M.B., Streit W.J., Kiefer R., Schoen S.W. y Kreutzberg G.W. (1990) New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J. Neuroimmunol.* **27**: 121-132.
- Gränse L., Ponjavic V. y Andréasson S. (2004) Full-field ERG, multifocal ERG and multifocal VEP in patients with retinitis pigmentosa and residual central visual fields. *Acta Ophthalmol. Scand.* **82**: 701-706.
- Greenlee M.H., Roosevelt C.B. y Sakaguchi D.S. (2001) Differential localization of SNARE complex proteins SNAP-25, syntaxin, and VAMP during development of the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* **430**: 306-320.
- Griffith O.W. y Stuehr D.J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 707-736.
- Grossmann R., Stence N., Carr J., Fuller L., Waite M. y Dailey M.E. (2002) Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* **37**: 229-240.
- Grünert U. y Martin P.R. (1991) Rod bipolar cells in the macaque monkey retina: immunoreactivity and connectivity. *J. Neurosci.* **11**: 2742-2758.
- Guervich L. y Slaughter M.M. (1993) Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* **33**: 2431-2435.
- Gupta N., Brown K.E. y Milam A.H. (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **76**: 463-471.
- Gutiérrez-Torre S.M. (1995) Retinosis pigmentaria. Clasificación y tratamiento. *Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo.*
- Hajós F. y Kálmán M. (1989) Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp. Brain Res.* **78**: 164-173.
- Handel M.A. y Dawson M. (1981) Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, Purkinje cell degeneration. *Gamete Res.* **4**:185-192.
- Hanitzsch R., Zeumer C., Lichtenberger T. y Wurziger K. (1998) Impaired function of bipolar cells in the Royal College of Surgeons rat. *Acta Anat. (Basel)* **162**: 119-126.
- Hanna M.C. y Calkins D.J. (2007) Expression of genes encoding glutamate receptors and transporters in rod and cone bipolar cells of the primate retina determined by single-cell polymerase chain reaction. *Mol. Vis.* **13**: 2194-2208.
- Harada T., Harada C., Kohsaka S., Wada E., Yoshida K., Ohno S., Mamada H., Tanaka K., Parada L.F. y Wada K. (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* **22**: 9228-9236.
- Harris A., Morgan J.I., Pecot M., Soumare A., Osborne A. y Soares H.D. (2000) Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol. Cell Neurosci.* **16**: 578-596.
- Haverkamp S. y Wässle H. (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* **424**: 1-23.
- Heckenlively J.R., Rodríguez J.A. y Daiger S.P. (1991) Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. *Arch. Ophthalmol.* **109**: 84-91.
- Heneka M.T. y Feinstein D.L. (2001) Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J. Neuroimmunol.* **114**: 8-18.





- Herron W.L. Jr., Riegel B.W., Brennan E. y Rubin M.L. (1974) Retinal dystrophy in the pigmented rat. *Invest. Ophthalmol.* **13**: 87-94.
- Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H. y Maru Y. (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol.* **8**: 1369-1375.
- Höllander H., Makarov F., Dreher Z., van Driel D., Chan-Ling T.L. y Stone J. (1991) Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *J. Comp. Neurol.* **313**: 587-603.
- Hood D.C. y Birch D.G. (1993) Human cone receptor activity: the leading edge of the a-wave and models of receptor activity. *Vis. Neurosci.* **10**: 857-871.
- Hood D.C. y Birch D.G. (1995) Phototransduction in human cones measured using the a-wave of the ERG. *Vision Res.* **35**: 2801-2810.
- Hood D.C. y Birch D.B. (1996) Abnormalities of the retinal cone system in retinitis pigmentosa. *Vision Res.* **36**: 1699-1709.
- Hosaka M. y Südhof T.C. (1998) Synapsins I and II are ATP-binding proteins with differential Ca<sup>2+</sup> regulation. *J. Biol. Chem.* **273**: 1425-1429.
- Huang S.H., Pittler S.J., Huang X.H., Oliveira L., Berson E.L. y Dryja T.P. (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the a subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nature Genet.* **11**: 468-471.
- Iadecola C. (1999) Mechanisms of cerebral ischemic damage. En *Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology* (Walz W. edit.) Humana Press Inc. Totowa, NJ. 3-32.
- Ito D., Imai Y., Ohsawa K., Nakajima K., Fukuuchi Y. y Kohsaka S. (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **57**: 1-9.
- Ito D., Tanaka K., Suzuki S., Dembo T. y Fukuuchi Y. (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* **32**: 1208-1215.
- Jamison J.A., Bush R.A., Lei B. y Sieving P.A. (2001) Characterization of the rod photoresponse isolated from dark-adapted primate ERG. *Vis. Neurosci.* **18**: 445-455.
- Janaky M., Coupland S.G. y Benedek G. (1996) Human oscillatory potentials: components of rod origin. *Ophthalmologica* **210**: 315-318.
- Kanai Y. y Hediger M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**: 467-471.
- Karim M.M., Fujisawa K., Kanomata N. y Ito H. (1996) Glial fibrillary acidic protein expression in the developing human retina. *Kobe J. Med. Sci.* **42**: 111-117.
- Karim M.M. y Itoh H. (1997) Demonstration of S-100 protein immunoreactivity in normal human retina and retinoblastoma. *Ophthalmologica*. **211**: 351-353.
- Karlsson O., Thor S., Norberg T., Ohlsson H. y Edlund T. (1990) Insuline gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**: 879-882.
- Kettenmann H., Faissner A. y Trotter J. (1996) Neuron-glia interactions in homeostasis and degeneration. En *Comprehensive Human Physiology de Cellular Mechanisms to Integration* (Greger R. y Windhorst U. eds.) Springer-Verlag, Berlín 533-543.
- Knowles R.G. y Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258.
- Kolb H. (2003) How the retina work. *American scientist* **91**:28-35.
- Kolb H., Fernández E. y Nelson R. (2000) Webvision. [http:// www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu).



- Kolb H., Fernández E., Schouten J., Ahnelt P., Limberg K.A. y Fisher S.K. (1994) Are there three types of horizontal cell in the human retina?. *J. Comp. Neurol.* **343**: 370-386.
- Kolb H., Limberg K.A. y Fisher S.K. (1992) The neurons of the human retina: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* **318**: 147-187.
- Kolb H. y West R.W. (1977) Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J. Neurocytol.* **6**: 155-170.
- Kondo M. y Sieving P.A. (2001) Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 305-312.
- Kondo M. y Sieving P.A. (2002) Post-photoreceptor activity dominates primate photopic 32-Hz ERG for sine-square-, and pulse stimuli. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**: 2500-2507.
- Kone B.C., Kuncewicz T., Zhang W. y Yu ZY. (2003) Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: 178-190.
- Kooijman A.C. y Damhof A. (1980) ERG lens with built-in Ganzfeld light source for stimulation and adaptation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**: 315-318.
- Kröncke K.D., Fehsel K. y Kolb-Bachofen V. (1995) Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**: 327-343.
- Ksiezak-Reding H., Dickson D.W., Davies P. y Yen S.H. (1987) Recognition of tau epitopes by anti-neurofilament antibodies that bind to Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3410-3414.
- Kuschel R., Deininger M.H., Meyermann R., Bornemann A., Yablonka-Reuveni Z. y Schluessener H.J. (2000) Allograft inflammatory factor-1 is expressed by macrophages in injured skeletal muscle and abrogates proliferation and differentiation of satellite cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**: 323-332.
- Lam B.L. (2005) Full-field electroretinogram. En: *Electrophysiology of vision. Clinical testing and applications*. Taylor & Francis, Boca Raton (FL). 1-64.
- Lau W., Devery J.M. y Geczy C.L. (1995) A chemotactic S100 peptide enhances scavenger receptor and Mac-1 expression and cholesterol ester accumulation in murine peritoneal macrophages in vivo. *J. Clin. Invest.* **95**: 1957-1965.
- LaVail M.M. y Batelle B.A. (1975) Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat. *Exp. Eye Res.* **21**: 167-192.
- LaVail M.M., Blanks J.C. y Mullen R.J. (1982) Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse I. Light microscopic and autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* **212**: 217-230.
- Lee Y.B., Nagai A. y Kim S.U. (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J. Neurosci. Res.* **69**: 94-103.
- Levenson J., Weeber E., Selcher J.C., Kategaya L.S., Sweatt J.D. y Eskin A. (2002) Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat. Neurosci.* **5**: 155-161.
- Lewis G.P., Kaska D.D., Vaughan D.K. y Fisher S.K. (1988) An immunocytochemical study of cat retinal Müller cells in culture. *Exp. Eye Res.* **47**: 855-868.
- Li Z.Y., Jacobson S.G. y Milam A.H. (1994) Autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the threonine-17-methionine rhodopsin mutation: retinal histopathology and immunocytochemistry. *Exp. Eye Res.* **58**: 397-408.
- Li Z.Y., Kljavin I.J. y Milam A.H. (1995a) Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J. Neurosci.* **15**: 5429-5438.



- Li Z.Y. y Milam A.H. (1995) Apoptosis in retinitis pigmentosa. En: *Retinal Degeneration II*. Anderson R.E., Hollyfield J.G. y LaVail M.M. (eds.). Plenum Press, New York. 1-12.
- Li Z.Y., Possin D.E. y Milam A.H. (1995b) Histopathology of the bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* **102**: 805-816.
- Li X. y Yuan N. (1990) Measurement of the oscillatory potential of the electroretinogram in the domains of frequency and time. *Doc Ophthalmol.* **76**: 65-71.
- Linser P. y Moscona A.A. (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6476-6480.
- Loihl A.K. y Murhpy S. (1998) Expression of nitric oxide synthase-2 in glia associated with CNS pathology. *Prog. Brain Res.* **118**: 253-267.
- Machida S., Kondo M., Jamison J.A., Khan N.W., Kononen L.T., Sugawara T., Bush R.A. y Sieving P.A. (2000) P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**: 3200-3209.
- Makarova K.S. y Grishin N.V. (1999) The Zn-peptidase superfamily: functional convergence after evolutionary divergence. *J. Mol. Biol.* **292**: 11-17.
- Mariani A.P. (1990) Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J. Comp. Neurol.* **301**: 382-400.
- Marmor M.F., Holder G.E., Seeliger M.W. y Yamamoto S. (2004) Standard for clinical electroretinography *Documenta ophthalmologica* **108**: 107-114.
- Massie A., Vandesande F. y Arckens L. (2001) Expression of the high-affinity glutamate transporter EAAT4 in mammalian cerebral cortex. *Neuroreport* **12**: 393-397.
- Massof R.W., Johnson M.A., Sunness J.S., Perry C. y Finkelstein D. (1986) Flicker electroretinogram in retinitis pigmentosa. *Doc. Ophthalmol.* **62**: 231-245.
- Master B.S. (1994) Nitric oxide synthases: why so complex?. *Annu. Rev. Nutr.* **14**: 131-145.
- McMahon H.T. y Südhof T.C. (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* **270**: 2213-2217.
- Melloni R.H. y DeGennaro L.J. (1994) Temporal onset of synapsin I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system. *J. Comp. Neurol.* **342**: 449-462.
- Milam A.H. y Li Z.Y. (1995) Retinal pathology in retinitis pigmentosa: considerations for therapy. En *Degenerative diseases of the retina*. Anderson R.E., LaVail M.M. y Hollyfield J.G. (editores). Plenum Press. New York. 275-284.
- Milam A.H., Li Z.Y., Cideciyan A.V. y Jacobson S.G. (1996) Clinicopathologic effects of the Q64ter rhodopsin mutation in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**: 753-765.
- Milam A.H., Li Z.Y. y Fariss R.N. (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog. Retinal Eye Res.* **17**: 175-205.
- Monzón-Mayor M., Yanes C., Ghandour M.S., de Barry J. y Gombos G. (1990) Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J. Comp. Neurol.* **295**: 569-579.
- Moore B.W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**: 739-744.
- Mullen R.J. (1977) Site of *pcd* gene action and Purkinje cell mosaicism in cerebella of chimaeric mice. *Nature* **270**: 245-247.
- Mullen R.J., Eicher E.M. y Sidman R.L. (1976) Purkinje cell degeneration: a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 208-212.



- Mullen R.J. y LaVail M. (1975) Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature* **258**: 528-530.
- Müller R.F. y Dowling J.E. (1970) Intracellular responses of Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to the b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **33**: 323-341.
- Naarendorp F. y Sieving P.A. (1991) The scotopic threshold response of the cat ERG is suppressed selectively by GABA and glycine. *Vision Res.* **31**: 1-15.
- Nag T.C. y Wadhwa S. (1999) Developmental expression of calretinin immunoreactivity in the human retina and a comparison with two other EF-hand calcium binding proteins. *Neuroscience* **91**: 41-50.
- Nag T.C. y Wadhwa S. (2001) Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina. *J. Biosci.* **26**: 179-191.
- Nagao S., Kwak S. y Kanazawa I. (1997) EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* **78**: 929-933.
- Nakajima K., Kikuchi Y., Ikoma E., Honda S., Ishikawa M., Liu Y. y Kohsaka S. (1998) Neurotrophins regulate the function of cultured microglia. *Glia* **24**: 272-289.
- Nakamura Y., McGuire B.A. y Sterling P. (1980) Interplexiform cell in cat retina: identification by uptake of  $\gamma$ -[ $^3$ H] aminobutyric acid and serial reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 658-661.
- Nelson R., Famiglietti EV. Jr. y Kolb H. (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.* **41**: 472-483.
- Neville M.J. y Campbell R.D. (1999) A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC. *J. Immunol.* **162**: 4745-4754.
- Newman R.A. y Odette L.L. (1984) Model of electroretinogram b-wave: a test of the K<sup>+</sup> hypothesis. *J. Neurophysiol.* **51**: 164-182.
- Ng T.F. y Streilein J.W. (2001) Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 3301-3310.
- Nichols B.E., Sheffield V.C., Vandenberg K., Drack A.V., Kimura A.E. y Stone E.M. (1993) Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea is caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nature Genet.* **3**: 202-207.
- Norenberg M.D. y Martínez-Hernández A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* **161**: 303-310.
- Oba S. y Koji T. (2000) *In situ* nick end-labeling: light microscopical. En: *Molecular histochemical techniques*. Koji T. (ed.). Tokio. 19-30.
- O'Gorman S. (1985) Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice II. Cytology of neuron loss. *J. Comp. Neurol.* **234**: 298-316.
- O'Gorman S. y Sidman R.L. (1985) Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J. Comp. Neurol.* **234**: 277-297.
- Otani A., Dorrell M.I., Kinder K., Moreno S.K., Nusinowitz S., Banin E., Heckenlively J. y Friedlander M. (2004) Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* **114**: 765-774.
- Pagon R.A. (1988) Retinitis pigmentosa. *Surv. Ophthalmol.* **33**: 137-177.
- Pagon R.A. (1993) Syndromic retinal dystrophy. En: *Retinitis pigmentosa: present knowledge and outlook*. Rinaldi E. (ed.). Liviana medicina, Naples. 151-166.



- Peichl L. y González-Soriano J. (1994) Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis. Neurosci.* **11**: 501-517.
- Peichl L. y Wässle H. (1981) Morphological identification of on- and off-centre brisk transient (Y) cells in the cat retina. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **212**: 139-153.
- Peitch M.C., Müller C. y Tschopp J. (1993) DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4206-4209.
- Peng Y.W., Hao Y., Petters R.M. y Wong F. (2000) Ectopic synaptogenesis in the mammalian retina caused by rod photoreceptor-specific mutations. *Nat. Neurosci.* **3**: 1121-1127.
- Penn R.D. y Hagins W.A. (1969) Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature* **223**: 201-205.
- Petralia R.S., Sans N., Wang Y.X., Vissel B., Chang K., Noben-Trauth K., Heinemann S.F. y Wenthold R.J. (2004) Loss of GLUR2 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor subunit differentially affects remaining synaptic glutamate receptors in cerebellum and cochlear nuclei. *Eur. J. Neurosci.* **19**: 2017-2029.
- Pfaff S.L., Mendelsohn M., Stewart C.L., Edlund T. y Jessell T.M. (1996) Requirement for LIM homeobox gene *isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**: 309-320.
- Pignataro L., Sitaramayya A., Finnemann S.C. y Sarthy V.P. (2005) Nonsynaptic localization of the excitatory amino acid transporter 4 in photoreceptors. *Mol. Cell Neurosci.* **28**: 440-451.
- Pignatelli V., Cepko C.L. y Strettoi E. (2004) Inner retinal abnormalities in a mouse model of Leber's congenital amaurosis. *J. Comp. Neurol.* **469**: 351-359.
- Pinaud R., De Weerd P., Currie R.W., Fiorani Jr.M., Hess F.F. y Tremere L.A. (2003) Ngfi-a immunoreactivity in the primate retina: implications for genetic regulation of plasticity. *Int. J. Neurosci.* **113**: 1275-1285.
- Pinaud R., Tremere L.A., Penner M.R., Hess F.F., Barnes S., Robertson H.A. y Currie R.W. (2002) Plasticity-driven gene expression in the rat retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **98**: 93-101.
- Pines G., Danbolt N.C., Bjørås M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., Kanner B.I. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **360**: 464-467.
- Pochet R., Pasteels B., Seto-Oshima A., Bastianelli E., Kitajima S. y Van Eldik L.J. (1991) Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. *J. Comp. Neurol.* **314**: 750-762.
- Polyak S.L. (1941) The retina. The University of Chicago Press. Chicago.
- Provis J.M., Penfold P.L., Edwards A.J. y van Driel D. (1995) Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia* **14**: 243-256.
- Pugh E.N. Jr. y Lamb T.D. (1993) Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1141**: 111-149.
- Qiu H., Fujiwara E., Liu M., Lam B.L. y Hamasaki D.I. (2002) Evidence that a-wave latency of the electroretinogram is determined solely by photoreceptors. *Jpn. J. Ophthalmol.* **46**: 426-432.
- de Raad S., Szczesny P.J., Munz K. y Remé C.E. (1996) Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Müller cells in correlation with photoreceptor damage. *Ophthalmic Res.* **28**: 99-107.
- Radner W., Sadda S.R., Humayun M.S., Suzuki S. y de Juan E. Jr. (2002) Increased spontaneous retinal ganglion cell activity in rd mice after neural retinal transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**: 3053-3058.



- Ramírez J.M., Ramírez A.I., Salazar J.J., de Hoz R. y Triviño A. (2001) Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **73**: 601-615.
- Ramírez J.M., Triviño A., Ramírez A.I., Salazar J.J. y García Sánchez J. (1996) Structural specializations of human retinal glial cells. *Vis. Res.* **36**: 2029-2036.
- Rauen T., Rothstein J.D. y Wassle H. (1996) Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* **286**: 325-336.
- Rauen T., Taylor W.R., Kuhlbrodt K. y Wiessner M. (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res.* **291**: 19-31.
- Reichenbach A. y Robinson S.R. (1995) The involvement of Müller cells in the outer retina. *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina*. Djamgoz M.B.A., Archer S.N. y Vallergera S. (Eds.). Chapman y Hall, Londres. 395-416.
- Richter K., Langnaese K., Kreutz M.R., Olias G., Zhai R., Scheich H., Garner C.C. y Gundelfinger E.D. (1999) Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J. Comp. Neurol.* **408**: 437-448.
- Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A. y Gage F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* **20**: 570-7.
- Robson A.G., Saihan Z., Jenkins S.A., Fitzke F.W., Bird A.C., Webster A.R. y Holder G.E. (2006) Functional characterisation and serial imaging of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Br. J. Ophthalmol.* **90**: 472-479.
- Rodieck R.W., Binmoeller K.F. y Dineen J.T. (1985) Parasol and midget ganglion cells of the human retina. *J. Comp. Neurol.* **233**: 115-132.
- Rodríguez-Kern A., Gegelashvili M., Schousboe A., Zhang J., Sung L. y Gegelashvili G. (2003) Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB. *Neurochem. Int.* **43**: 363-370.
- Rogers J.H. (1987) Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* **105**: 1343-1353.
- Roque R.S. y Caldwell R.B. (1990) Müller cell changes precede vascularization of the pigment epithelium in the dystrophic rat retina. *Glia* **3**: 464-475.
- Roque R.S., Imperial C.J. y Caldwell R.B. (1996) Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**: 196-203.
- Roque R.S., Rosales A.A., Jingjing L., Agarwal N. y Al-Ubaidi M.R. (1999) Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res.* **836**: 110-119.
- Roth J., Thorens B., Hunziker W., Norman A.W. y Orci L. (1981) Vitamin D dependent calcium binding protein: immunocytochemical localization in chick kidney. *Science* **214**: 197-199.
- Rousseau S. y Lachapelle P. (1999) The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic oscillatory potentials. *Doc Ophthalmol.* **99**: 135-150.
- Rungger-Brändle E., Dosso A.A. y Leuenberger P.M. (2000) Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**: 1971-1980.
- Sakagami K., Ishii A., Shimada N. y Yasuda K. (2003) RaxL regulates chick ganglion cell development. *Mech. Dev.* **120**: 881-895.
- Salama I., Malone P.S., Mihaimed F. y Jones J.L. (2007) A review of the S100 proteins in cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* doi:10.1016/j.ejso.2007.04.009.





- Sandberg M.A., Sullivan P.L. y Berson E.L. (1981) Temporal aspects of the dark-adapted cone a-wave in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **21**: 765-769.
- Sardón T., Baltrons M.A. y García A. (2004) Nitric oxide-dependent and independent down-regulation of NO-sensitive guanylyl cyclase in neural cells. *Toxicol. Letters* **149**: 75-83.
- Sarthy V. y Egal H. (1995) Transient induction of the glial intermediate filament protein gene in Müller cells in the mouse retina. *DNA Cell Biol.* **14**: 313-320.
- Sarthy V. Fu M. y Huang J. (1991) Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 623-637.
- Saszik S.M., Robson J. y Frishman L. (2002) The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J. Physiol.* **543**: 899-916.
- Saszik S.M., Wu J., Robson J.G. y Frishman L.J. (2001) The scotopic threshold response of the dark-adapted ERG of the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, supl.
- Schmidt-Kastner R. y Szymas J. (1990) Immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein, vimentin and S-100 protein for study of astrocytes in hippocampus of rat. *J. Chem. Neuroanat.* **3**: 179-192.
- Schnitzer J. (1988) Astrocytes in mammalian retina. *Prog. Ret. Res.* **7**: 209-232.
- Seal R.P. y Amara S.G. (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 431-456.
- Seto-Oshima A. (1994) Review: calcium-binding proteins in the central nervous system. *Acta Histochem. Cytochem.* **27**: 93-106.
- Shapley R. y Perry V.H. (1986) Cat and monkey retinal ganglion cells and their visual functional roles. *Trends Neurosci.* **9**: 229-235.
- Sheedlo H.J., Li L., Gaur V.P., Young R.W., Seaton A.D., Stovall S.V., Jaynes C.D. y Turner J.E. (1992) Photoreceptor rescue in the dystrophic retina by transplantation of retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* **138**:1-49.
- Sieving P.A. y Frishman L.J. y Steinberg R.H. (1986) Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *J. Neurophysiol.* **56**: 1049-1061.
- Sieving P.A., Murayama K. y Naarendorp F. (1994) Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis. Neurosci.* **11**: 519-532.
- Sieving P.A. y Nino C. (1988) Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**: 1608-1614.
- Sieving P.A. y Wakabayashi K. (1991) Comparison of rod threshold ERG from monkey, cat and human. *Clinical Vision Sci.* **6**: 171-179.
- Speros P. y Price J. (1981) Oscillatory potentials: history, techniques, and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. *Surv. Ophthalmol.* **25**: 237-252.
- Stockton R.A. y Slaughter M.M. (1989) B-wave of the electroretinogram: a reflection of ON bipolar cell activity. *J. Gen. Physiol.* **93**: 101-122.
- Stone J.L., Barlow W.E., Humayun M.S., De Juan E.Jr. Y Milam A.H. (1992) Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* **110**: 1634-1639.
- Stork T., Schulte S., Hoffmann K. y Stoffel W. (1992) Structure, expression, and functional analysis of a (Na<sup>+</sup>)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10955-10959.
- Streit W.J. (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* **22**: 619-624.



- Strettoi E. y Pignatelli V. (2000) Modification of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11020-11025.
- Strettoi E., Pignatelli V., Rossi C., Porciatti V. y Falsini B. (2003) Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vis. Res.* **43**: 867-877.
- Strettoi E., Porciatti V., Falsini B., Pignatelli V. y Rossi C. (2002) Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J. Neurosci.* **22**: 5492-5504.
- Szamier R.B. (1981) Ultrastructure of the preretinal membrane in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **21**: 227-236.
- Sullivan R., Penfold P. y Pow D.V. (2003) Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**: 856-865.
- Szamier R.B. y Berson E.K. (1977) Retinal ultrastructure in advanced Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **16**: 947-962.
- Thanos S., Kacza J., Seeger J. y Mey J. (1994) Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labeling of microglial cells in vivo. *Trends Neurosci.* **5**: 177-182.
- Thanos S. y Ritcher W. (1993) The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**: 671-680.
- Thanos S., Ritcher W. y Thiel H.J. (1995) The protective role of microglia-inhibitory factor in the retina suffering of hereditary photoreceptor degeneration. En: *New strategies in prevention and therapy. Cell and Tissue protection in ophthalmology*. Pleyer U., Schmidt K. y Thiel H.J. (eds.). 195-205.
- Thor S., Ericson J., Brannstrom T. y Edlund T. (1991) The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* **7**: 881-889.
- tom Dieck S., Sanmartí-Vila L., Langnaese K., Ritcher K., Kindler S., Soyke A., Wex H., Smalla K.H., Kämpf U., Fränzer J.T., Stumm M., Garner C.C. y Gundelfinger E.D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* **142**: 499-509.
- Utans U., Arceci R.J., Yamashita Y. y Russell M.E. (1995) Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J. Clin. Invest* **95**: 2954-2962.
- Valero J. (2006) Degeneración de las células mitrales y sus efectos en la neurogénesis adulta del bulbo olfatorio del ratón mutante *pcd*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Salamanca.
- Valverde D. (2001) Las bases genéticas de la retinosis pigmentaria. En: *La retinosis pigmentaria en España; estudio clínico y genético*. Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE).
- Valverde D., Solans T., Grinberg D., Balcells S., Vilageliu L., Bayes M., Chivelet P., Besmond C., Goossens M., Gonzalez Duarte R. y Baiget M. (1996) A novel mutation in exon 17 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase in two RP sisters in a consanguineous family. *Hum. Genet.* **97**: 35-38.
- Varela C. (2002) Modulación de la información sensorial en células bipolares de bastón de retina de ratón. *Tesis Doctoral*. Universidad de Alcalá de Henares.
- Velasco A. (1992) Glía en el sistema nervioso central de teleosteos. Aportaciones morfológicas e inmunocitoquímicas. *Trabajo de Grado*. Universidad de Salamanca.
- Velasco A., Bragado M.J., Jimeno D., Caminos E., Lillo C., Aijón J. y Lara J.M. (2000) Growing and regenerating axons in the visual system of teleosts are recognized with the antibody RT97. *Brain Res.* **883**: 98-106.



- Villegas-Pérez M.P., Lawrence J.M., Vidal-Sanz M., LaVail M.M. y Lund R.D. (1998) Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J. Comp. Neurol.* **392**: 58-77.
- Viswanathan S., Frishman L.J., Robson J.G. y Walters J.W. (2001) The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 514-522.
- Wachmeister L. (1980) Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG), I: GABA and the glycine antagonists. *Acta Ophthalmol.* **58**: 712-725.
- Wachmeister L. (1981) Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG), II: glutamate, aspartate, and dopamine antagonists. *Acta Ophthalmol.* **59**: 247-258.
- Wachmeister L. (1998) Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog. Retin. Eye Res.* **17**: 485-521.
- Wang T. y Morgan J.I. (2007) The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res.* **1140**: 26-40.
- Ward M.M., Jobling A.I., Kalloniatis M. y Fletcher E.L. (2005) Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. *Diabetologia* **48**: 351-360.
- Ward M.M., Jobling A.I., Puthussery T., Foster L.E. y Fletcher E.L. (2004) Localization and expression of the glutamate transporter, excitatory amino acid transporter 4, within astrocytes of the rat retina. *Cell Tissue Res.* **315**: 305-310.
- Wassermann R.H. (1985) Nomenclature of the vitamin D-induced calcium binding proteins. En: *Vitamin D*. Norman A.W., Schaefer K., Grigolet H.G. y Herrath D. (eds.). Walter de Gruyter, Berlin-New York. 321-323.
- Wassermann R.H. y Taylor A.N. (1966) Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* **152**: 791-793.
- Weleber R.G., Carr R.E., Murphey W.H., Sheffield V.C. y Stone E.M. (1993) Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch. Ophthalmol.* **111**: 1531-1542.
- Wells J., Wroblewski J., Keen J., Inglehearn C., Jubb C., Eckstein A., Jay M., Arden G., Bhattacharya S., Fitzke F. y Bird A.C. (1993) Mutations in the human retinal degeneration slow (rds) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genet.* **3**: 213-218.
- Werbling F.S. (1991) Synaptic connections, receptive fields and patterns of activity in the tiger salamander retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**: 459-483.
- Werbling F.S. y Dowling J.E. (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.* **32**: 339-355.
- Weruaga E., Alonso J.R., Porteros A., Crespo C., Arevalo R., Briñón J.G., Velasco A. y Aijón J. (1998) Nonspecific labeling of myelin with secondary antisera and high concentrations of Triton X-100. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 109-118.
- Whitten D.N. y Brown K.T. (1973) The timecourse of the late receptor potential from the monkey cones and rods. *Vision Res.* **13**: 107-135.
- Williams K.C. y Hickey W.F. (2002) Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**: 537-562.
- Wilson J.X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**: 1149-63.



- Winter C., tom Dieck S., Boeckers T.M., Bockmann J., Kämpf U., Sanmartí-Vila L., Langnaese K., Altmann W., Stumm M., Soyke A., Wieacker P., Garner C.C. y Gundelfinger E.D. (1999) The presynaptic cytomatrix protein bassoon: sequence and chromosomal localization of the human *BSN* gene. *Genomics* **57**: 389-397.
- Wood J.N. y Anderton B.H. (1981) Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Biosci. Ep.* **1**: 263-268.
- Yamaguchi K. y Akagawa K. (1994) Exocytosis relating proteins in the nervous system. *Neurosci. Res.* **20**: 289-292.
- Yen T., Harrison C.A., Devery J.M., Leong S., Iismaa S.E., Yoshimura T. y Geczy C.L. (1997) Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* **90**: 4812-4821.
- Zeiss C.J. y Johnson E.A. (2004) Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 971-976.
- Zhang H.R. (1994) Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog. Ret. Eye Res.* **13**: 243-270.
- Zimmer D.B., Cornwall E.H., Landar A. y Song W. (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* **37**: 417-429.