

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Caracterización de un modelo murino de glaucoma: implicación funcional de la señalización del receptor P2X7 en procesos neurodegenerativos de la retina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Jesús Pérez de Lara

Director

Jesús Pintor Just

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV



**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE GLAUCOMA:
IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR
P2X7 EN PROCESOS NEURODEGENERATIVOS
DE LA RETINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Jesús Pérez De Lara

Madrid, 2015



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV

Av Puerta del Hierro, S/N 28040

Teléfono: 91 394 38 96

D^o. Jesús Pintor Just, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA

Que **D^a. María Jesús Pérez de Lara**, licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado “**Caracterización de un modelo murino de glaucoma: Implicación funcional de la señalización del receptor P2X7 en procesos neurodegenerativos de la retina**”. Como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Octubre de 2015.

V^o B^o DIRECTOR

Dr. Jesús Pintor Just

*“Sólo si nos detenemos a
pensar en las pequeñas cosas,
llegaremos a entender las
grandes”*

José Saramago

A mis padres

RESUMEN

CURRICULUM VITAE

RESUMEN DEL *CURRICULUM VITAE*

Durante mi estancia en el laboratorio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid, he participado en diversos proyectos de investigación, cuyos resultados han dado lugar a diferentes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. A continuación, se recopilan esas contribuciones (las publicaciones de primer autor constituyen la base de los resultados mostrados en esta tesis doctoral).

ARTÍCULOS.

Pérez de Lara, M.J., Guzman-Aranguez, A., de la Villa, P., Díaz-Hernández J.I., Miras-Portugal M.T., Pintor J.

“Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology”. *Molecular Vision*. pp. 1060 - 1070. (Estados Unidos de América): 02/09/2015. ISSN 1090-0535

Fernández-Arroyo, S., Huete-Toral, F., **Pérez de Lara, M.J.**, de la Luz Cadiz-Gurrea, M., Legeai-Mallet, L., Micol, V., Segura-Carretero, A., Joven, J., Pintor, J.

“The impact of polyphenols on chondrocyte growth and survival: a preliminary report”. *Food Nutrition Research*. ISSN 1654-661X

Loma; P., Guzmán Aranguez, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J.

“Diadenosine tetraphosphate improves adrenergic anti-glaucomatous drug delivery and efficiency”. *Experimental Eye Research*. (Estados Unidos de América): 19/02/2015. ISSN 0014-4835

Loma; P., Guzmán Aranguez, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J.

“Diadenosine tetraphosphate induces tight junction disassembly increasing corneal epithelial permeability”. *British Journal of Pharmacology*. (Reino Unido): 01/10/2014. ISSN 0007-1188

Pérez de Lara, M.J., Pintor, J.

“Presence and Release of ATP from the Retina in an Alzheimer's Disease Model”. *Journal of Alzheimer's Disease*. (Holanda): 24/07/2014. ISSN 1387-2877

Pérez de Lara, M.J., Santano, C., Guzmán Aranguez, A., Valiente Soriano, F. J., Avilés Trigueros, M., Vidal Sanz, M., de la Villa, P. Pintor, J. “Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma”.

Experimental Eye Research. C, pp. 40 - 49. (Estados Unidos de América): 12/03/2014. ISSN 0014-4835

Martin Gil, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Crooke, A., Santano, C., Peral, A., Pintor, J. "Silencing of P2Y(2)Receptors Reduces Intraocular Pressure in New Zealand Rabbits". British Journal of Pharmacology. 4b, pp. 1163 -1172. (Reino Unido): 01/02/2012. ISSN 0007-1188

Eliahu, S., Martín-Gil, A., **Perez de Lara, M.J.**, Pintor, J., Camden, J., Weisman, G. A., Lecka, J., Sevigny, J., Fischer, B. "2-MeS-beta,gama-CCl2-ATP is a Potent Agent for Reducing Intraocular Pressure". Journal of Medicinal Chemistry. 8, pp. 3305 - 3319. (Estados Unidos de América): 22/04/2010. ISSN 0022-2623

EN PREPARACIÓN.

Pérez de Lara, M.J., Avilés Trigueros, M., Guzmán Aranguez, A., Valiente Soriano, F. J., de la Villa, P., Vidal Sanz, M., Pintor, J. "Characterization and potential role of P2X7 receptor in apoptotic processes in a murine model of glaucoma". Investigative Ophthalmology and Visual Science

Loma, P., Guzmán Aranguez, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J. "Lactoferrin levels in tears are increased by the topical application of diadenosine tetraphosphate". Current Eye Research.

Martínez-Aguila, A., Fonseca, B., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J. "Effect of Melatonin and 5-MCA-NAT on the IOP on normal and glaucomatous mice" Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.

CAPÍTULOS DE LIBROS.

Santano, C., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J. "Retinal Disturbances in Patients and Animal Models with Huntington's, Parkinson's and Alzheimer's Disease". Springer Science Business Media, LLC, 03/03/2011.

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Awad Alcozi, H., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J., Martínez Águila, A., Fonseca Vázquez, B.

Título del trabajo: "Melatonin and its synthesising inzyme increses under ocular hypertension and glaucomatous conditions". Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Denver, Colorado (2015).

Pintor, J., **Pérez de Lara, M.J.**

Título del trabajo: “Changes in the purinergic system in the retina of a glaucomatous model”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Denver, Colorado, USA (2015).

Awad Alcozi, H., Martín-Gil, A., Fonseca Vázquez, B., **Pérez de Lara, M.J.**, Martínez Águila, A., Pintor, J.

Título del trabajo: ¿Son los nucleótidos procedentes del cristalino responsables del desarrollo del glaucoma? Vision Sciences and Eye Research (Viser) Santiago, España (2014).

Loma, P., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J.

Título del trabajo: “Ap₄A increases corneal epithelial permeability inducing tight junction disassembly”. Purines, Bonn, Alemania (2014).

Pérez de Lara, M.J., Pintor, J.

Título del trabajo: “Retinal P2X7 receptors in a murine model of glaucoma”. Purines, Bonn, Alemania (2014).

Pérez de Lara, M.J., Pintor, J.

Título del trabajo: “Effect of Ap₄A on aquaporin-1 present in human achondroplastic chondrocytes”. Purines, Bonn, Alemania (2014).

Awad Alcozi, H., Martínez Águila, A., Fonseca Vázquez, B., Crooke, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J.

Título del trabajo: “Hypotensive effect of melatonin and its analogues in different animal models”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2015).

Fonseca Vázquez, B., Martínez Águila, A., **Pérez de Lara, M.J.**, Crooke, A., Pintor, J.

Título del trabajo: “Participation of P2Y2 and P2Y6 purinergic receptors in the physiopathology of glaucoma”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2015).

Guzmán Aranguez, A., Loma, P., **Pérez de Lara, M.J.**, Pintor, J.

Título del trabajo: “Diadenosine tetraphosphate modifies corneal epithelial tight junction assembly and barrier permeability”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2015).

Pintor, J., de la Villa, P., **Pérez de Lara, M.J.**

Título del trabajo: “Changes in retinal P2X7 receptors in a murine model of glaucoma”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2013).

Pérez de Lara, M.J., de la Villa, P., Pintor, J.

Título del trabajo: “Retinal P2X7 Receptors in a Murine Model of Glaucoma”. Scientific Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. Alicante, España (2013).

Pérez de Lara, M.J., Crooke, A., Santano, C., Pintor, J.

Título del trabajo: “Silencing P2Y2 Receptors Reduce Intraocular Pressure”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2009).

Santano, C., **Pérez de Lara, M.J.**, Diaz-Hernandez, M., Miras Portugal, M.T., Lucas, J.J, Pintor, J.

Título del trabajo: “Disturbances of VMAT2 and P2Y2 expression in the retina of a mouse model of Huntington Disease”. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA (2009).

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido d esoxirribonucleico.
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMPA	Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metilisozazol-4-propiónico
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
Ap₄A	P ¹ , P ⁴ -di (adenosina-5') tetrafosfato
APP	Proteína precursora amiloide (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
ARN_m	Ácido ribonucleico m ensajero
ATP	Adenosina-5'-trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
ATPe	ATP extracelular
BBG	Azul brillante G (<i>Brilliant Blue G</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BzATP	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosina-5'-trifosfato
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio citosólico libre
Calf serum	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
Caspasas	C isteinil A spartato P roteasas
CFN	Capas de Fibras Nerviosas de la retina.
CGR	Células G anglionares de la R etina
CNE	Capa Nuclear E xterna
CNI	Capa Nuclear I nterna
CPE	Capa Plexiforme E xterna.
CPI	Capa Plexiforme I nterna.
Cy3	Cianina tipo 3
DMEM	Medio Dulbecco modificado (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	D imetilsulfóxido
DTT	D itiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC₅₀	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo.
ECL	Reactivo quimioluminiscente (<i>Enhanced ChemiLuminiscence</i>)
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetraacético
ELISA	<i>E</i> nzyme- <i>L</i> inked <i>I</i> mmuno <i>S</i> orbent <i>A</i> ssay
ERG	E lectrorretinograma
ERKs	Quinasas reguladas por señales extracelulares (<i>Extracellular signal Regulated Kinases</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
Fura-2 AM	Fura-2-acetoximetil éster
GABA	Ácido- γ -aminobutírico (<i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP	Proteína gliofibrilar ácida (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GMP_c	Guanosina-5'-Monofosfato Cíclico
Gp^{nmb}	Glicoproteína transmembrana NMB
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (<i>High-pressure Liquid Chromatography</i>)
HRP	Enzima peroxidasa de rábano (<i>Horseradish Peroxidase Enzyme</i>)
IC₅₀	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
IPD	Dispersión del pigmento del iris (<i>Iris pigment dispersión</i>)
IPr	Ioduro de Propidio.
ISA	Atrofia del estroma del iris (<i>Iris stromal atrophy</i>)
JNKs	Quinasa de c-Jun N-terminal. (<i>c-jun N-terminal Kinases</i>)
LED	Diodo emisor de luz (<i>Light-emitting Diode</i>).
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MLE	Membrana Limitante Externa
MLI	Membrana Limitante Interna
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio
NDS	Suero de burro (<i>Normal Donkey Serum</i>)
NF	Neurofilamentos
NGS	Suero de cabra (<i>Normal Goat Serum</i>)
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NO	Óxido Nítrico
NP-40	Nonidet [®] P-40 (<i>Nonilfenilpolietilen glicol</i>)
p38	MAP quinasa p38
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Fosfodiesterasa (<i>Phosphodiesterase</i>)
PFA	<i>p</i> -formaldehído
PIO	Presión intraocular
PKC	Proteína Quinasa C
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PPADS	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico
PSA	Persulfato de Amonio
RIPA	<i>Radio-inmunoprecipitación Assay</i>
SD	Desviación Estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
STR	Respuesta umbral escotópica (<i>Scotopic threshold response</i>)
Syp	Sinaptofisina (<i>Synaptophysin</i>)
TBA	Tetrabutil Amonio
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
Tyrp1	Proteína relacionada con tirosinasa1 (<i>Tyrosinase-related Protein1</i>)
UTP	Uridina-5'-trifosfato (<i>Uridine Triphosphate</i>)
VNUT	Transportador Vesicular de Nucleótidos
2MeSADP	2-Metil.tio-adenosina-5'-difosfato
2MeSAMP	2-Metil-tio-adenosina-5'-monofosfato
2MeSATP	2-Metil-tio-adenosina-5'-trifosfato
α, β-meATP	α , β -metilen-adenosina-5'-trifosfato

ÍNDICE

4.3.2	Receptores purinérgicos en cámara anterior.....	61
4.3.3	Receptores purinérgicos en la retina.....	62
5.	PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS.....	68
5.1	Proteínas p38-MAPK (MAP quinasas p38).	69
5.2	Proteínas JNK (quinasas c-Jun N-terminal).	70
6.	MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.	71
6.1	Las caspasas.....	73
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
	MATERIAL	81
1.	REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.	81
1.1	Soluciones generales y tampones.	82
2.	INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPAMIENTO.....	83
2.1	General.....	83
2.2	Electrofisiología.	85
2.2.1	Equipo de estimulación.	85
2.2.1.1	Fuentes de iluminación.....	86
2.2.2	Sistema de adquisición de datos.	87
2.3	Cromatografía.....	87
2.4	Microfluorimetría.	88
3.	SOFTWARE, BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.	88
	MÉTODOS.....	90
4.	MODELOS EXPERIMENTALES.	90
4.1	Animales de experimentación.	90
4.1.1	Modelos animales y anestesia.....	90
4.1.2	Genotipado de los animales.....	92
4.1.2.1	Extracción del ADN y cuantificación.....	93
4.1.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	94
4.1.2.3	Digestión de fragmentos de PCR y electroforesis.	95
4.1.3	Tratamiento: Inyección intraperitoneal de BBG.	96
4.2	Modelo celular de células precursoras de retina de rata.....	97
4.2.1	Descongelación del cultivo celular.....	97
4.2.2	Mantenimiento del cultivo celular y subcultivos.....	98
4.2.3	Conservación de la línea celular.....	99
4.2.4	Tratamiento de las células R28 con distintos agentes.	99
5.	MEDIDAS DE PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO).....	100

6. REGISTROS ELECTRORETINOGRÁFICOS.	101
6.1 Procedimiento de preparación del animal.	101
6.2 Protocolo de estimulación.	103
6.2.1. Respuesta escotópica umbral y respuesta escotópica.	103
7. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES.....	104
7.1. Aplicación del trazador.....	104
8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES DE INMUNODETECCIÓN.....	105
8.1 Inmunohistoquímica.	106
8.1.1 Perfusión de los animales.	106
8.1.2 Disección y procesado histológico de las retinas.	106
8.1.2.1 Secciones transversales (fijación, inclusión y corte).	106
8.1.2.2 Montajes globales a plano de retinas “ <i>in toto</i> ”.	108
8.1.3 Estudio inmunohistoquímico.	108
8.1.3.1 Inmunofluorescencia en secciones transversales.	109
8.1.3.2 Inmunofluorescencia en montaje global.	111
8.1.4 Análisis morfológico y morfométrico de las retinas.	112
8.1.4.1 Procesado de imágenes.	112
8.1.4.1.1 Cuantificación de las células ganglionares de la retina.	114
8.1.4.2 Mapas de isodensidad.	114
8.2 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot.	115
8.2.1. Lisado y extracción de proteínas totales.	116
8.2.2. Determinación de la cantidad de proteína.	117
8.2.3 Preparación de las muestras.	118
8.2.4 Electroforesis, transferencia y revelado de proteínas.	119
8.2.5. Condiciones experimentales para experimentos de distintas condiciones.	122
8.3 Ensayos de inmunodetección por ELISA.	123
9. RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	124
9.1 Extracción del ARN y cuantificación.	124
9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	126
9.3 Electroforesis.	127
10. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	127
10.3.1 Aislamiento de la retinas para el análisis por HPLC.	127
10.3.1.1 Determinación de los niveles de ATP y Ap ₄ A tras la estimulación retiniana.	128

10.3.1.2 Determinación de los niveles de ATP total.	129
10.3.2 Extracción de humor acuoso para el análisis por HPLC.	130
11. MICROFLUORIMETRÍA. DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.....	130
12. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR.	133
13. DETECCIÓN DE APOPTOSIS CELULAR.	134
13.1 Detección morfológica de la muerte celular.	134
13.2 Cuantificación de apoptosis mediante caspasa-3.	135
13.2.1 Análisis de las muestras mediante citometría de flujo.	136
13.2.2 Obtención de lisados celulares y determinación de la actividad de la caspasa-3.....	137
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.	138
RESULTADOS 143	
1. EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN LA DEGENERACION GLAUCOMATOSA.....	143
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL MODELO GLAUCOMATOSO.	144
2.1 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 3 meses.	145
2.1.2 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 9 meses.	146
2.3 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 15 meses.	147
2.4 Evolución temporal de la degeneración glaucomatosa entre 3 y 15 meses....	149
3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE NUCLEÓTIDOS EN EL GLAUCOMA.....	151
3.1 Determinación de los niveles de ATP y Ap ₄ A extracelular en retinas estimuladas.	151
3.1.1 Determinación de los niveles de ATP extracelular.	152
3.1.2 Determinación de los niveles de Ap ₄ A.....	154
3.2 Determinación de los niveles de ATP total.	156
3.3 Determinación de los niveles de ATP en el humor acuoso.	157
4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RETINA DEL RATÓN DBA/2J.....	159
4.1 Caracterización del sistema purinérgico.....	159
4.1.1 Caracterización del receptor P2X7.....	160
4.1.1.1 Inmunorreactividad para el receptor P2X7.....	160
4.1.1.2 Niveles de expresión del receptor P2X7 por Western Blot.	161
4.1.1.3 Niveles de expresión del ARN _m del receptor P2X7.....	162
4.1.2 Caracterización del transportador VNUT.....	163

4.1.2.1 Inmunorreactividad para VNUT.....	164
4.1.2.2 Niveles de expresión de VNUT por Western Blot.	166
4.1.2.3 Correlación entre la disfunción retiniana, el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) y liberación de ATP extracelular (ATP _e).	167
4.1.3 Caracterización del enzima NPP1.	167
4.1.3.1 Niveles de expresión de NPP1 por Western Blot.	168
4.2 Activación de la respuesta astrocitaria por proteína ácida fibrilar glial (GFAP).	168
4.2.1 Inmunorreactividad frente a GFAP.	168
4.2.2 Niveles de expresión para la proteína fibrilar ácida (GFAP) por Western Blot.	169
4.3 Pérdida de conexión sináptica.	170
4.3.1 Inmunorreactividad para Sinaptofisina (Syn).....	170
4.3.2 Niveles de expresión de sinaptofisina (Syn) por Western Blot.....	172
4.4 Degeneración de las células ganglionares en la retina del modelo de glaucoma DBA/2J.	172
4.4.1 Inmunorreactividad frente a Brn3a.....	172
4.4.2 Niveles de expresión de Brn3a por Western Blot.....	174
4.4.3 Estudio morfofuncional de la población de células ganglionares de la retina.	174
4.4.3.1 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales control.....	175
4.4.3.2 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales glaucomatosos.	176
4.4.4 Correlación entre la disfunción retiniana y la pérdida neuronal (CGR)..	180
4.4.5 Estudio temporal de las alteraciones en la capa de fibras de la retina (NF).	181
4.4.5.1 Estudio de la capa de fibras de la retina en animales control.	181
4.4.5.2 Cambios en la capa de fibras de la retina en animales glaucomatosos.	182
4.4.5.3 Doble marcaje con P2X7.....	183
5. IMPLICACIONES DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR P2X7 EN EL GLAUCOMA.	184
5.1 <i>In vivo</i>	184
5.1.1 Fosforilación de las proteínas p38 y JNK en el proceso de neurodegeneración glaucomatosa.....	184
5.1.2 Activación y medida de la actividad enzimática de la caspasa-3.	187
5.2 <i>In vitro</i>	188

5.2.1 Caracterización farmacológica del receptor P2X7.	188
5.2.2 Ensayos de viabilidad celular.	190
5.2.3 Fosforilación de las proteínas p38 y JNK mediada por BzATP en la línea inmortalizada de retina R28.....	192
5.2.4 Identificación del receptor P2X7 como responsable de la respuesta inducida por el BzATP sobre la fosforilación de las proteínas p38 y JNK.	195
5.2.5 Efecto del BzATP en la activación del marcador de apoptosis caspasa-3.	196
6. EFECTO DEL BBG EN LA DEGENERACIÓN RETINIANA DEL MODELO DBA/2J.	198
6.1 Efecto del BBG sobre la respuesta electroretinográfica de los ratones glaucomatosos tratados.....	198
6.2 Estudio de los niveles de expresión de las MAPK.	199
7. ESTUDIO COMPARATIVO CON UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	201
7.1 Caracterización funcional de la respuesta electroretinográfica del proceso neurodegenerativo en la enfermedad de Alzheimer.	201
7.2 Estudio temporal de la población de las CGR en el modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer.....	205
7.3 Caracterización molecular del modelo de enfermedad de Alzheimer.	207
7.3.1 Detección de la proteína β -amiloide en las retinas de enfermedad de Alzheimer.	207
7.3.1.1 Detección morfológica de la proteína β -amiloide en las retinas del modelo animal de enfermedad de Alzheimer.	207
7.3.1.2 Cuantificación de los niveles de proteína β -amiloide.....	208
7.3.2 Cuantificación de los niveles de P2X7 en las retinas de enfermedad de Alzheimer.	210
7.4 Evaluación de los niveles de ATP en el modelo de EA.	211
DISCUSIÓN.....	217
1. GENOTIPADO DEL RATÓN DBA/2J.....	217
2. EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN EL MODELO DBA/2J.....	218
3. DISFUNCIÓN VISUAL EN LOS RATONES GLAUCOMATOSOS.	220
4. DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES.....	221
5. ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE NUCLEÓTIDOS.....	223
6. EL RECEPTOR P2X7 EN LA PATOGÉNESIS DEL GLAUCOMA.	227
7. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR P2X7 EN EL GLAUCOMA.	228
8. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA DEGENERACIÓN GLAUCOMATOSA Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	234

CONCLUSIONES 239
BIBLIOGRAFÍA 245

RESUMEN

SUMMARY

RESUMEN

Introducción

El glaucoma es una de las causas más comunes de discapacidad visual y una de las enfermedades neurodegenerativas oculares más frecuentes de pérdida irreversible de visión. La afectación originada en la retina se caracteriza por la degeneración de las células ganglionares y la pérdida de axones. La presión intraocular es un factor de riesgo importante en el glaucoma, entre otros factores, implicando mecanismos bioquímicos que desencadenan la muerte de las células ganglionares. El ratón DBA/2J es un modelo de hipertensión ocular y de degeneración de las células ganglionares de la retina (CGR). Las características principales de éste son la dispersión del pigmento del iris (IPD) y la atrofia del estroma del iris (ISA) que conducen a la patogénesis del glaucoma.

Los mecanismos bioquímicos que comprometen al sistema purinérgico en procesos patológicos como la degeneración glaucomatosa han sido estudiados en los últimos años, siendo de gran relevancia como posibles dianas farmacológicas para el tratamiento de diferentes neuropatías. Los receptores P2X comprenden una familia de siete canales iónicos de membrana activados por ligando (P2X1-7) que se activan por el ATP extracelular (ATPe). En particular, los receptores P2X7 podrían estar involucrados en la regulación de la transmisión sináptica y la muerte neuronal en la retina. Además, la excitotoxicidad mediada por ATP a través de la activación del receptor P2X7 sugiere su posible implicación en la degeneración neuronal y la pérdida de la función visual en las retinas glaucomatosas. Tan importante como la presencia de este receptor purinérgico es estudiar los niveles de ATP extracelular de la retina, así como evaluar los cambios en la expresión del transportador de nucleótidos vesicular (VNUT) y los niveles de ecto-nucleotidasa (E-NPP1) en este modelo murino de glaucoma durante el desarrollo de la enfermedad.

Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis son:

- ✓ Determinar la aparición de alteraciones funcionales y morfológicas en la retina interna de los ratones DBA/2J.

- ✓ Estudiar los cambios en los niveles de nucleótidos de la retina en el ratón glaucomatoso DBA/2J durante el progreso de la patología.
- ✓ Caracterizar las señales moleculares que subyacen a la lesión de la retina glaucomatosa. Para ello, se analizará la expresión y localización de los receptores purinérgicos P2X7 en relación con diferentes marcadores de la retina. Además, trataremos de establecer la relación entre el receptor P2X7 y los procesos de apoptosis en estudios *in vitro* y en las retinas lesionadas a través de diferentes vías.
- ✓ Establecer el antagonismo del receptor P2X7 como un posible recurso terapéutico.

Material y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando retinas de ratones glaucomatosos DBA/2J en diferentes estadios, junto con ratones C57BL/6J utilizados como controles de la misma edad.

Para la evaluación de la funcionalidad de la retina, se registraron las respuestas electroretinográficas y fue estudiada su correlación con los cambios morfológicos (pérdida de las células ganglionares de la retina, CGR). Para ello, se identificaron las CGR mediante el marcaje retrógrado con metanosulfonato de hidroxistilbamidina (OHSt), aplicado en el colículo superior. Las retinas montadas a plano fueron procesadas para cuantificar la población de CGR identificadas por el trazador OHSt y por inmunodetección de Brn3a, se contaron utilizando un software de análisis de imágenes y se generaron sus correspondientes mapas de isodensidad para cada retina.

El estudio de la liberación de nucleótidos se realizó mediante el disecado de las retinas y extracciones a plano, para someterlas a condiciones de estimulación en tampón Ringer con o sin 59 mM de KCl y analizarlas mediante cromatografía líquida de alta resolución tras el procesamiento adecuado.

Los cambios morfológicos en la retina interna de los ratones DBA/2J fueron evaluados mediante un estudio inmunohistoquímico y un análisis mediante Western Blot con anticuerpos frente a GFAP, NF, Syp y Brn3a. Además, se analizó la expresión del receptor nucleotídico P2X7, del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) y de una de las enzimas perteneciente a la familia de las ecto-fosfodiesterasas (NPP1).

También se estudiaron proteínas implicadas en las vías de señalización de los procesos apoptóticos tales como p38 y JNK. Con el fin de analizar el proceso de muerte de las células ganglionares de la retina, se evaluó la actividad de la caspasa-3 en modelos *in vivo* e *in vitro* mediante Western Blot y citometría de flujo.

Para verificar la ruta de señalización propuesta en el presente trabajo, se comprobó la implicación del receptor P2X7 mediante estudios de inmunodetección por ELISA. Finalmente, se realizó un tratamiento en los ratones DBA/2J mediante inyección de un antagonista específico del receptor P2X7.

Resultados

Los ratones DBA/2J mostraron una reducción significativa (68%) en las amplitudes de la respuesta umbral escotópica positiva (pSTR) a los 15 meses de edad, en comparación con los ratones de 3 meses. Además, dicha pérdida funcional se correlacionó con la reducción heterogénea de las CGR identificadas mediante marcadores específicos (OHSt y Brn3a).

Se observaron alteraciones en la liberación neta de nucleótidos de la retina en los ratones DBA/2J a los 15 meses, así como un incremento significativo en la expresión de VNUT en comparación con el ratón control de la misma edad (36%) y, con respecto a los ratones glaucomatosos de 3 meses (46%). Además, se encontraron niveles elevados de la ecto-fosfodiesterasa NPP1 en los ratones DBA/2J a los 15 meses (80%).

Por otra parte, se detectó una pérdida de conexiones sinápticas y un descenso en los neurofilamentos de la capa de fibras durante el progreso de la patología. Los ratones glaucomatosos mostraron cambios en la expresión del receptor P2X7. Los análisis de inmunotransferencia por Western Blot mostraron una sobre-expresión de P2X7 (78%) a los 15 meses con respecto al control. Además los estudios de inmunofluorescencia en secciones mostraron un significativo aumento de este receptor en las neuronas primarias lesionadas, las CGR, correlacionándolo con la posible activación de procesos apoptóticos de este tipo neuronal. Para ello, se analizaron algunos componentes de la vía de señalización de las MAPK y la expresión de la caspasa-3 encontrando una activación de estas proteínas en las retinas del ratón DBA/2J, que sugiere su posible implicación en los procesos de apoptosis de las CGR en el glaucoma. Esta hipótesis se

verificó mediante estudios *in vitro*, encontrando una muerte celular mediada por la activación del receptor P2X7 y, regulada en parte, por la señalización intracelular de las MAPK induciendo la posterior activación de la caspasa-3.

Por último, el tratamiento de ratones DBA/2J disminuyó significativamente la activación de los niveles de MAPK pero no fue eficaz para disminuir el deterioro funcional de la retina en las condiciones establecidas.

Conclusiones

Estos animales mostraron cambios característicos de la degeneración glaucomatosa, incluyendo un aumento de la presión intraocular (PIO) y una disfunción de la actividad retiniana entre los 9 y 15 meses, además de mostrar un patrón de muerte sectorial de las CGR.

Nuestros resultados indican la existencia de una correlación entre el deterioro de la función de la retina y la pérdida neuronal. Dicho análisis funcional y morfológico permite evaluar la progresión de la enfermedad. Además, esta disfunción retiniana también se puede correlacionar con los niveles elevados de ATP extracelular y el transportador de nucleótidos, probablemente por la interacción con el receptor P2X7 presente en las retinas del modelo animal. Este entorno extracelular podría justificar las alteraciones funcionales y bioquímicas observadas durante el progreso de la patología. El aumento en la presencia del receptor P2X7 podría contribuir, junto con otros factores, a los cambios en la funcionalidad de la retina y la concomitante muerte celular de las CGR. Estos resultados proporcionan una posible vía intracelular responsable de la apoptosis de las CGR mediada por la activación de la caspasa-3 a través de la vía de señalización de las MAPK en el glaucoma.

Introduction

Glaucoma is a common cause of blindness and one of the most frequent ocular neurodegenerative diseases. This retinal impairment is characterized by ganglion cell degeneration and the loss of axons. Intraocular pressure is an important risk factor in glaucoma together with other factors that compromise biochemical mechanisms involved in ganglion cell death. The DBA/2J mouse is a model of ocular hypertension and retinal ganglion cell (RGC) degeneration, the main features of which are iris pigment dispersion (IPD) and iris stromal atrophy (ISA) leading glaucoma symptoms.

The biochemical mechanisms that involves purinergic signalling in developing glaucoma remains unknown and have covered an important relevance in the study of this neurodegenerative disease. P2X receptors comprise a family of seven ligand-gated membrane ion channels (P2X1-7) that are activated by extracellular ATP (eATP). Particularly, P2X7 receptors could be involved in the regulation of the synaptic transmission and neuronal death in the retina. Furthermore, ATP-mediated excitotoxicity via activation of the P2X7 receptor (P2X7R) is suggested to be involved in neuronal degeneration and loss of visual function in glaucomatous retinas. As important as the presence of this purinergic receptor subtype is to study retinal extracellular ATP levels and to assess the changes in the vesicular nucleotide transporter (VNUT) expression and ecto-nucleotidase levels (E-NPP1) in this murine model of glaucoma during the development of the disease.

Objectives

The main objectives/aims of this/the present work thesis are the following:

- ✓ Determine the onset of functional and morphological changes exhibited by DBA/2J mice in the inner retina.
- ✓ Investigate the changes of nucleotide levels in the glaucomatous retina of the DBA/2J mice during the progress of the pathology.
- ✓ Characterize the molecular signals underlying glaucomatous retinal injury. We analysed the expression and localization of P2X7 purinergic receptor and in relation to other elements of the purinergic system and retinal markers. Furthermore, we tried to

establish a relation between P2X7R related to apoptosis processes in *in vitro* studies and injured retinas through different pathways.

- ✓ Establish a possible therapeutic approach by antagonising P2X7 receptors.

Material and methods

To perform the experiments, mice retinas were obtained from the glaucomatous DBA/2J mice at different stages of age together with C57BL/6J mice used as age-matched controls.

For the assessment of retinal functionality, electroretinographic responses were recorded and their correlation with morphological changes were studied (loss of RGC). For that, we identified the RGC by retrograde tracing with hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt), applied on the superior colliculi. Whole-mount retinas were processed to quantify the population of RGCs identified by fluorogold tracing and Brn3a immunodetection, and an isodensity contour plot was generated for each retina.

For the study of retinal nucleotide release retinas were dissected and prepared as flattened whole-mounts and stimulated in Ringer buffer with and without 59 mM KCl then analyzed by high performance liquid chromatography.

Immunohistochemical and western-blot analysis were performed to assess the morphological changes in the inner retina of DBA/2J mice with antibodies against GFAP, NF, Syp and Brn3a. Furthermore, we analysed the P2X7 nucleotide receptor expression, vesicular nucleotide transporter (VNUT) and an ecto-fosfodiesterase enzyme (NPP1). Furthermore, proteins involved in signalling pathways of apoptotic processes such as p38 and JNK were studied. Sections of mouse retinas were examined and photographed using confocal microscopy. In order to investigate the ganglion cell death, caspase-3 cleavage was evaluated in *in vivo* and *in vitro* model by western blot and flow citometry.

To verify the signalling pathway proposed in the present work, the implication of activated P2X7 receptor and its antagonism by ELISA immunoassays studies was performed. Finally, glaucomatous mice were treated with a specific antagonist of P2X7 receptor.

Results

DBA/2J mice showed a significant reduction in the positive scotopic threshold response (pSTR) amplitudes (68%) at 15 months of age, as compared to glaucomatous mice at 3 months. Furthermore, retinal dysfunction was correlated to a non-homogeneous reduced population of RGC in DBA/2J mice by fluorogold tracing and Brn3a immunodetection.

Glaucomatous mice exhibited changes in the release of retinal nucleotides as long as the pathology progressed. Concomitantly, VNUT expression was up-regulated compared to control mice (36%) at the same age. Furthermore, the expression of one of the ectonucleotidase, NPP1 was evaluated. It was found that NPP1 protein levels were elevated in DBA/2J mice at 15 months (80%).

In addition, there was a loss of synaptic ribbons together with a severe decrease of neurofilaments during the assessment of the pathology. Glaucomatous mice exhibited changes in P2X7R expression as long as the pathology progressed. Western blotting analyses revealed up-regulation of P2X7R finding a 78% of rise in the presence of this receptor with glaucoma progression in DBA/2J mice. There was an increase of P2X7 receptor in primary injured neurons, the RGCs, being presumably correlated with the activation of apoptotic processes. For that, we analyzed the expression of MAPK and caspase-3 proteins and found an up-regulation of these proteins in the DBA/2J retinas suggesting their possible involvement in apoptotic processes in neuronal death in glaucoma. These results were crosschecked with *in vitro* studies finding a caspase-mediated cell death induced by activation of P2X7 receptor and regulated in part by MAP kinase signalway.

Finally, the treatment of DBA/2J mice decreased significantly the activation of MAPK levels but the retinal dysfunction was not improved.

Conclusions

These animals exhibited glaucomatous changes, including an increase in intraocular pressure (IOP) and retinal activity dysfunction beginning at about 9-15 months of age and sectorial RGC death in the retina.

Our results indicate the existence of a correlation between retinal function impairment and RGC loss. The functional and morphological analysis allows a reliable assessment of the progression of the disease. Furthermore, this retinal dysfunction correlated with the increased levels of extracellular ATP and nucleotide transporter probably due to the nucleotide interacting with P2X7R present in the retinas of this animal model. This modified cellular environment could contribute to explain the functional and biochemical alterations observed during the development of the pathology. The increase in the presence of P2X7 receptors may contribute, together with other factors, to the changes in the functionality of the retina and the concomitant death of retinal ganglion cells. The present findings provide possible intracellular pathways responsible for regulating apoptosis through caspase-3 activation during glaucomatous degeneration via MAPK signal pathway.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA DEL OJO

1.1 Estructura general del globo ocular.

El globo ocular es una estructura sensorial casi esférica, formada por tres capas concéntricas: la capa externa (túnica fibrosa), la capa intermedia o úvea (túnica vascular) y la capa más interna (túnica nerviosa) (*Figura 1*). **La capa externa** está formada por la esclerótica recubierta de la conjuntiva, la córnea y la unión entre ambas, el limbo esclerocorneal. La córnea es la primera lente del sistema óptico ocular y se encarga de refractar los rayos luminosos hacia el cristalino. **La capa intermedia o úvea** está formada por dos estructuras, en la parte posterior se sitúa la coroides que nutre la retina más externa y evita la reflexión de los rayos luminosos hacia el exterior. En la parte anterior del globo ocular, se encuentra el iris y el cuerpo ciliar. El cuerpo ciliar está formado en su superficie interna por los denominados procesos ciliares, que segregan el humor acuoso. El cuerpo ciliar contiene el músculo ciliar, cuya función permite regular el grado de acomodación del cristalino, con el fin de poder enfocar sobre la retina los objetos cercanos. **La capa más interna** o retina es el elemento neural del globo ocular. Está formada por diversas capas neuronales cuyas prolongaciones constituyen las capas plexiformes. Su función consiste en transformar la luz en impulsos eléctricos, procesando y enviando la información visual desde el nervio óptico al cerebro (Fischbarg, 2005).

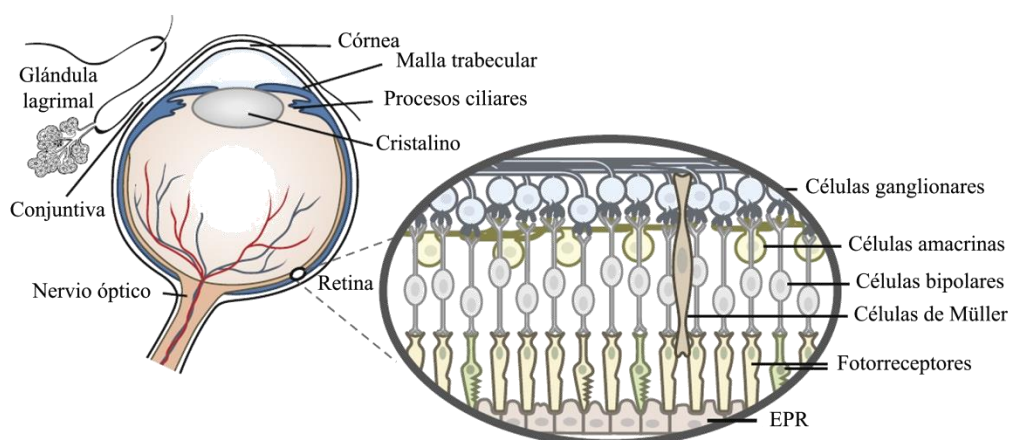


Figura 1. Estructura del globo ocular. Esquema representativo del globo ocular en el que se representan las diferentes estructuras que lo componen. *Modificada de Sanderson (2014).*

1.2 La Retina.

La retina de los vertebrados se desarrolla a partir del ectodermo neural precursor embrionario de todo el sistema nervioso (SNC) (Kolb, 2003) . Es una delgada capa de tejido nervioso de aproximadamente 0.5 mm de grosor situada en la parte posterior del globo ocular y su función es convertir la energía luminosa en señales eléctricas que serán enviadas a través del nervio óptico (NO) al núcleo geniculado lateral (NGL) que proyecta a la corteza visual. La estructura de la retina se conoce muy bien y contiene una gran cantidad de tipos neuronales. En la retina de los mamíferos se distinguen alrededor de 50 tipos neuronales basados en su morfología, bioquímica y características funcionales (Masland, 2001) .

1.2.1 Organización de la retina.

La retina interna se encuentra en contacto con el cuerpo vítreo y su parte más externa limita con la coroides. A su vez, la retina se extiende desde la cabeza del nervio óptico hasta la *ora serrata*. La retina está constituida por diferentes tipos celulares interconectados (Ramon y Cajal, 1904). Todos ellos se encuentran organizados entre capas nucleares y capas plexiformes donde se establecen conexiones sinápticas originando una estratificación de la retina en diferentes capas que pueden identificarse histológicamente:

Epitelio pigmentado de la retina (EPR): La retina neural está en contacto con el epitelio pigmentado de la retina (EPR), desarrollado a partir de la misma capa de neuroepitelio. Es la capa más externa de la retina limitando con la membrana de Bruch de la coroides y, está formada por células epiteliales que contienen una elevada concentración de gránulos de melanina responsables de los fenómenos de absorción y reflexión de la luz en el interior del ojo. El EPR es esencial para el correcto desarrollo de la retina, promueve la supervivencia de los fotorreceptores y les proporciona la cantidad de nutrientes y oxígeno vitales y, está implicado en el transporte selectivo de iones contribuyendo al equilibrio osmótico del medio extracelular de los segmentos externos de los fotorreceptores (SE). Entre otros, su papel es la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores que desempeñan una función esencial para mantenimiento de la excitabilidad de los mismos (Strauss, 2005).

Capa de los segmentos de los fotorreceptores: se encuentra formada por los segmentos externos (SE) e internos (SI) de los fotorreceptores.

Membrana limitante externa (MLE): La MLE se sitúa entre los núcleos y segmentos de los fotorreceptores y está formada por uniones entre los segmentos internos (SI) de fotorreceptores y las prolongaciones de las células de Müller (CM).

Capa nuclear externa (CNE): constituida por los cuerpos celulares de los fotorreceptores: los conos y los bastones.

Capa plexiforme externa (CPE): formada por los contactos sinápticos entre los axones de los fotorreceptores y las dendritas de células bipolares, prolongaciones de las células horizontales y células interplexiformes.

Capa nuclear interna (CNI): se localizan los somas de las células bipolares (CB) para bastón y para conos. Además se encuentran los núcleos de las células horizontales (CH), células amacrinas (CA), las células interplexiformes (CIP) y las células de Müller (CM).

Capa plexiforme interna (CPI): formada por los axones de las células bipolares que establecen contactos sinápticos con las dendritas de las células ganglionares y las prolongaciones de las células amacrinas y células interplexiformes.

Capa de células ganglionares de la retina (CCGR): está constituida por las células ganglionares, las células amacrinas desplazadas y células gliales (astrocitos).

Capa de fibras nerviosas de la retina (CFN): formada por los axones de las células ganglionares de la retina.

Membrana limitante interna (MLI): se localiza en la parte más vítrea de la retina y está formada por los terminales de las células de Müller.

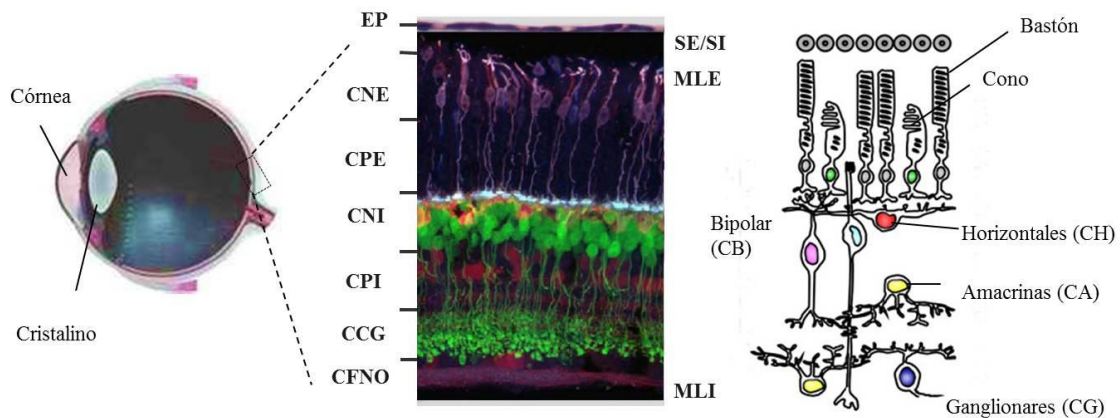


Figura 2. Localización y estructura de la retina. Imagen de microscopía confocal de una sección de retina; EP: Epitelio Pigmentado, SE: Segmentos externos de los fotorreceptores, SI: Segmentos Internos de los fotorreceptores, CNE: Capa Nuclear Externa, CPE: Capa Plexiforme Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CPI: Capa Plexiforme Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares, CFNO: Capa de Fibras del Nervio Óptico. Esquema representativo de los tipos neuronales que constituyen las capas de la retina. Modificado de (Morgan, 2008).

De la misma forma que en el resto de sistema nervioso central hay muchas células gliales en la retina. Los subtipos de células gliales identificadas en la retina de los mamíferos son las CM, de gran tamaño que se extiende a lo largo de toda la retina de manera radial aportando sustento a todas las neuronas de la retina. Además también existen otras poblaciones gliales como son los astrocitos, situados en la CGR rodeando a las fibras nerviosas y a los vasos sanguíneos (Ramirez y cols., 1996; Trivino y cols., 1996) y las células de microglía, de naturaleza fagocítica y morfología variable.

1.2.2 La transmisión de la información visual.

La visión tiene lugar mediante la absorción de fotones por los pigmentos visuales de los segmentos externos de los fotorreceptores. A continuación, dichos pigmentos desencadenan una serie de mecanismos bioquímicos originando la cascada de fototransducción visual. De este modo, el circuito retiniano integra la información lumínica absorbida por los fotorreceptores, así como el procesamiento neural de toda la información visual que se codifica a nivel de las células ganglionares en frecuencias de potenciales de acción.

1.2.2.1 Los fotorreceptores: El proceso de fototransducción visual.

Los bastones son los responsables de la visión a baja iluminación, denominada visión escotópica y los conos de la visión diurna, visión en color o visión fotópica. La predominancia de estas células sensoriales depende de los diferentes hábitats donde se desarrollan los animales (Kolb, 2003) . Por otra parte, la distribución de los conos y los bastones no es uniforme a lo largo de la retina. La mácula se localiza en la retina central humana y está caracterizada por una gran concentración de fotorreceptores a diferencia de la retina periférica. Además el centro de la mácula, llamado fovea, está constituido por sólo un tipo de fotorreceptor, los conos, responsables de la agudeza visual.

Los conos y los bastones responden a la información lumínica transformándola en impulsos eléctricos por medio de un proceso bioquímico denominado **fototransducción** (Figura 3). En condiciones fotópicas, un fotón es absorbido produciendo un cambio conformacional y se activa la proteína G transducina, que a su vez estimula a un enzima, la fosfodiesterasa (PDE), cuya acción disminuye los niveles de GMPc significativamente. Como resultado, ya no se pueden mantener abiertos los canales de Na^+ activados por GMPc y dejan entrar iones Na^+ produciendo un cambio en el potencial de membrana adquiriendo valores más negativos con respecto al potencial de membrana en reposo -70 mV de una neurona, es decir, se produce la hiperpolarización del fotorreceptor. La consecuencia directa del cambio de potencial de membrana es el cierre de los canales de Ca^{2+} , disminuyendo de esta manera, la liberación de glutamato.

En condiciones escotópicas, la concentración de GMPc que se alcanza en el interior de los fotorreceptores es suficiente como para mantener abiertos los canales de Na^+ . Dado que la concentración de Na^+ dentro del fotorreceptor es menor que fuera, se produce una entrada de Na^+ . Este influjo de iones genera una corriente de cargas positivas, denominada *corriente de oscuridad* que lleva al potencial a valores menos negativos (-30 mV), lo que se conoce como despolarización. La despolarización permite la apertura de canales de Ca^{2+} activados por voltaje y la entrada de éstos permite la liberación por exocitosis del neurotransmisor.

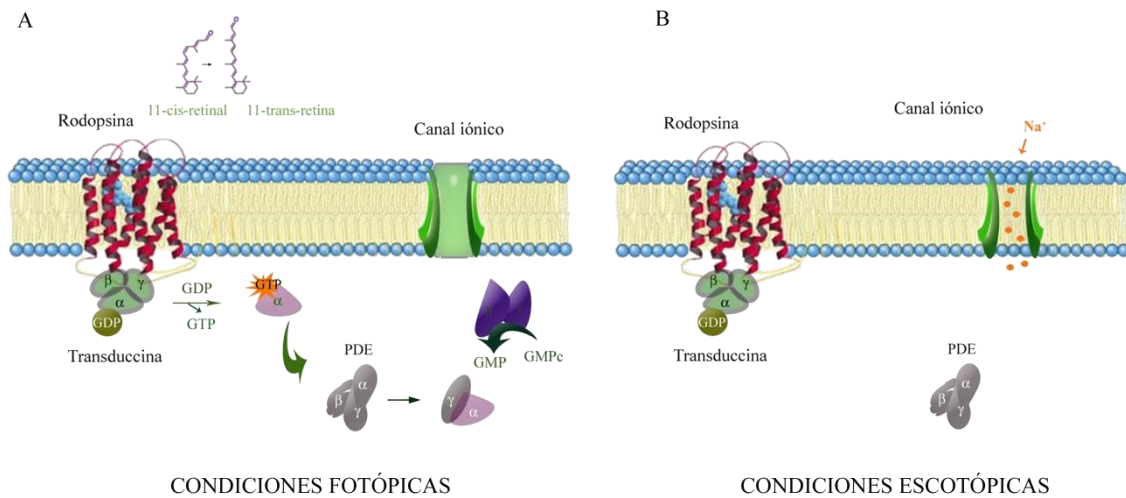


Figura 3. Cascada de señalización del proceso de fototransducción en el segmento externo del fotorreceptor. (A) Condiciones fotópicas y (B) condiciones escotópicas. En condiciones fotópicas, el cambio conformacional del 11-cis-retinal desencadena la activación de la cascada que conduce a la liberación de la fosfodiesterasa (PDE) produciendo la hidrólisis de GMPc a 5'GMP y la consecuente cerrada de los canales, llevando al fotorreceptor a una hiperpolarización y una disminución en la liberación del neurotransmisor, a diferencia de los que ocurre en condiciones de oscuridad.

La obtención de la imagen visual se genera a través de la integración de un complejo sistema neuronal en el que se producen convergencias y divergencias sinápticas originando dos vías de conducción de la información: la vía centrípeta y la vía transversal. Una vez que se ha producido la hiperpolarización o despolarización del fotorreceptor la información visual se transmite de la célula fotorreceptora a las CB para hacer sinapsis con las CGR, cuyos axones envían el mensaje visual al encéfalo. Esta comunicación neuronal recibe el nombre de **vía principal o centrípeta de la información visual**.

En condiciones de oscuridad los fotorreceptores están despolarizados constantemente liberando glutamato. Sus efectos están mediados por receptores ionotrópicos de glutamato AMPA (Marc, 2004) presentes en las CB. La activación de estos receptores hiperpolariza estas células inhibiendo la propagación de los potenciales de acción a través del nervio óptico.

Bajo condiciones fotópicas, los cambios eléctricos generados en los fotorreceptores durante el proceso de fototransducción origina el cese de liberación de glutamato. Las CB puede hiperpolarizarse (*tipo OFF*) o despolarizarse (*tipo ON*) estableciendo conexiones sinápticas con CG *tipo ON* y *tipo OFF* respectivamente a

través de la vía vertical visual, a su vez modulada, por la vía lateral visual (*figura 5*). La información visual se transmite a través de las vías verticales *ON* y *OFF* dependiendo de si están despolarizadas o no las CB por receptores metabotrópicos de glutamato tipo mGluR6 (*ON*), incluidas las CB de tipo *OFF* para bastón, o hiperpolarizadas por los receptores AMPA (*OFF*). La distinción *ON-OFF* también se establece a nivel de la capa de las células ganglionares de la retina. De esta manera, las CB tipo *OFF* excitan a CG tipo *OFF*, a excepción de las CB de bastón *ON* que no procesan la información visual directamente a las CG sino que es a través de las células amacrinas *tipo AII* (Kolb et al, 2000). En presencia de un estímulo luminoso, la CG *tipo ON* se despolariza y genera potenciales de acción para procesar la imagen visual mientras que la de *tipo OFF* se hiperpolariza.

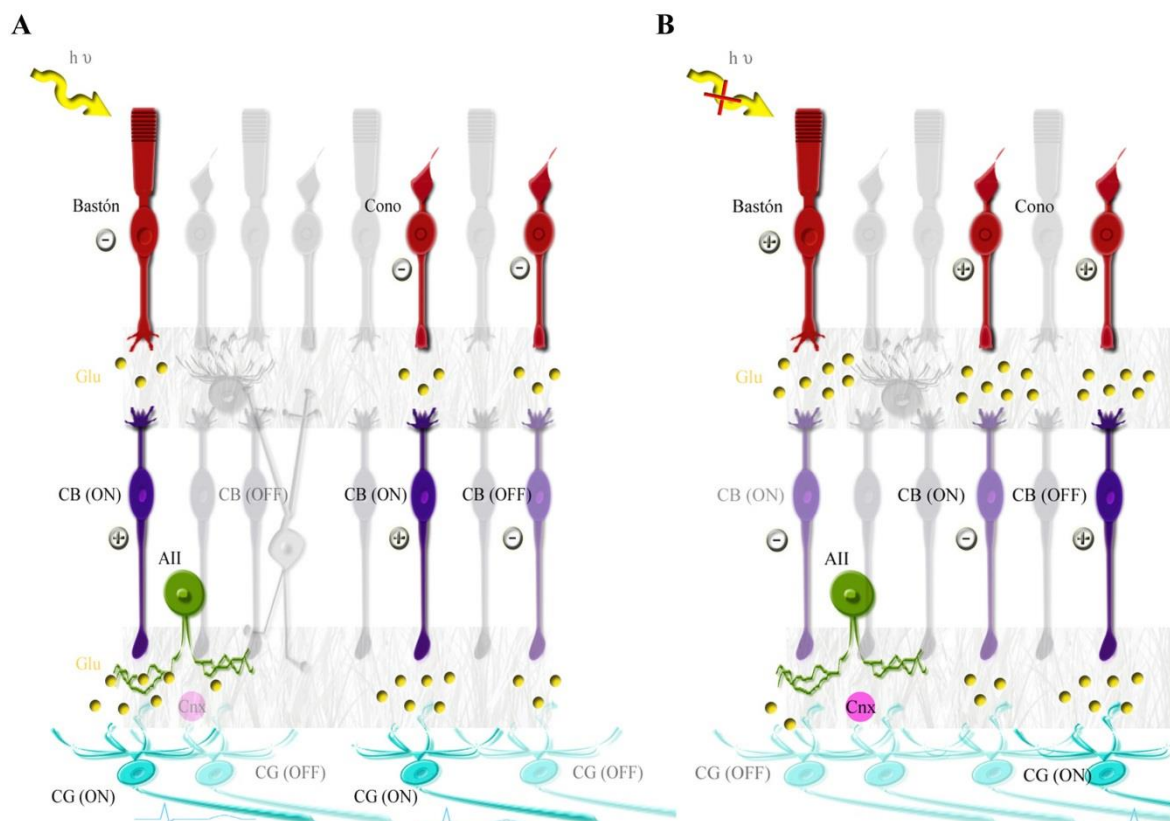


Figura 4. Vía principal de la transmisión de la información visual. (A) Condiciones fotópicas y (B) condiciones escotópicas. Las CB se despolarizan-hiperpolarizan en función del receptor metabotrópico mgluR6 o de tipo AMPA clasificándose en CB (*tipo ON*) y CB (*tipo OFF*) que se activan por el glutamato liberado por los fotorreceptores, estableciendo conexiones con las respectivas CG *tipo ON* y *OFF*, respectivamente.

La modulación de la transmisión de la información visual se lleva a cabo a través de la sinergia entre la vía visual vertical y la vía paralela lateral. **En la vía lateral o transversal** de procesamiento de la información, las CH y las IP están involucradas en la inhibición de la transmisión de señales desde los fotorreceptores a CB a nivel de la CPE (figura 5). Las CA modulan las conexiones entre CB y CG en la CPI mediado por la liberación de glicina, GABA, dopamina, acetilcolina y mediante sinapsis eléctricas mediadas por las CA.

Además de la distinción *ON-OFF* realizada, las CB y CG, poseen una organización centro-periferia antagónica generando los denominados campos receptores. Dependiendo de la extensión de las señales de excitación sobre las arborizaciones dendríticas de las CB o de las CG se establecen los campos receptores. Éstos se pueden clasificar en *centros ON*, con periferia inhibidora y *centros OFF*, con periferia excitadora, generando o no potenciales de acción.

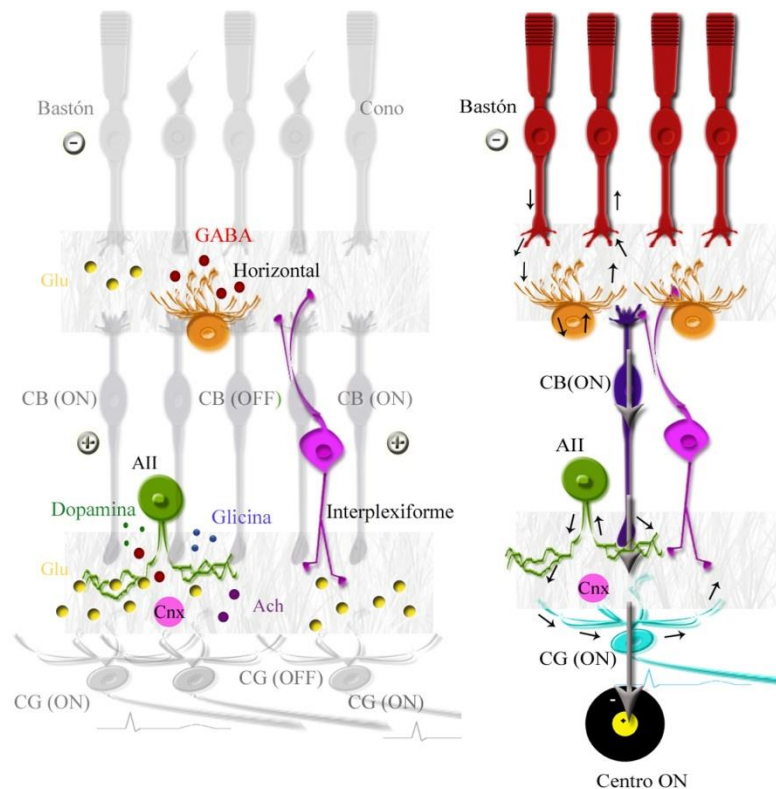


Figura 5. Vía lateral de procesamiento de la información visual. Convergencia de transmisión de señales de los fotorreceptores a CB (tipo ON) con campo receptor centro ON conectando con CG (tipo ON) con campo receptor centro ON, y la consecuente generación de potenciales de acción.

1.2.2.2 Las células ganglionares: El procesamiento de la información visual.

Tal y como se detallado anteriormente, las CGR son las últimas dentro de la vía vertical de señalización en la retina. Las células ganglionares se encargan de recoger toda información visual procesada en la retina y la envían a través de sus axones, que convergen formando el nervio óptico, desde la retina a los centros visuales del tálamo (cuerpo geniculado lateral), que son proyectados a la corteza visual.

Una de las regiones visuales de proyección de las CGR en el ratón es el colículo superior, donde se localizan la inmensa mayoría de los axones de estas células (70-97%) (Hofbauer y Drager, 1985) y, en menor medida, el núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo y el área pretectal. Aunque un alto porcentaje de las CGR envían información a los centros visuales del cerebro, sin embargo, existen otras que lo hacen a regiones no visuales, a través de las CGR denominadas fotorreceptoras fotosensibles (ipRGC) (Berson y cols., 2002; Hattar y cols., 2002; Berson, 2003; Hattar y cols., 2006; Berson y cols., 2010). En el ratón, estas células constituyen aproximadamente entre 1-3% de CGRs (Hattar y cols., 2002; Berson y cols., 2010; Gonzalez-Menendez y cols., 2010a; Gonzalez-Menendez y cols., 2010b), involucradas principalmente en la sincronización del ritmo circadiano con los ciclos luz-oscuridad (Hankins y cols., 2008; Gonzalez-Menendez y cols., 2009), el reflejo pupilar, la supresión de la melatonina debida a estimulación lumínica (Freedman y cols., 1999; Lucas y cols., 2003), la supresión de la actividad motora (masking) (Mrosovsky y Hattar, 2003), y la regulación de las fases de sueño-vigilia (Panda y cols., 2003). En los últimos años se ha documentado la participación de estas células en otras funciones visuales como la discriminación del brillo (Brown y cols., 2012).

Un método de identificación de CGR se basa en la aplicación de trazadores neuronales en el colículo superior. A partir de esta estructura, los trazadores se transportan de forma retrógrada por axones retinofugales de las CGR, acumulándose en somas y dendritas. Existen trazadores fluorescentes como el Fluorogold (FG) o su análogo, el metanosulfonato de hidroxistilbamidina (OHSt), que es una molécula pequeña con propiedades similares al FG (Cheunsuang y Morris, 2005), entre otros. Estos trazadores comienzan a detectarse en las CGRs a partir de los 2-3 días de su aplicación en el colículo superior y alcanzan sus valores máximos a los 5-6 días. El

marcaje neuronal se mantiene entre 3-4 semanas, momento tras el cual la señal fluorescente comienza a disminuir progresivamente (Selles-Navarro y cols., 1996; Gomez-Ramirez y cols., 1999). También existen trazadores neuronales que se aplican a nivel del nervio óptico, donde se localizan todos los axones de las CGR (Vidal-Sanz y cols., 2012). De esta manera, se ha determinado que aproximadamente el 50% de los somas de la capa de CGR corresponden a CGR y resto de los somas de otras células desplazadas a esta capa (Pang y Wu, 2011).

Marcadores neuronales de las CGR

Entre los marcadores neuronales específicos para CGRs, se encuentra la proteína asociada a los microtúbulos 1A (microtubule-associated protein 1A; MAP1A) (McKerracher y cols., 1989), γ -synuclein (Soto y cols., 2008; Surgucheva y cols., 2008), Bex1/2 (Bernstein y cols., 2006), Thy-1 (Barnstable y Drager, 1984; Casson y cols., 2004; Chidlow y cols., 2005), NeuN (Buckingham y cols., 2008) y factores de transcripción con dominio POU clase IV (Pou4f) o Brn3b (Quina y cols., 2005; Weishaupt y cols., 2005; Nadal-Nicolas y cols., 2009).

Entre las más empleadas, se encuentra el Thy1 que es una proteína de superficie celular que se expresa en las CGR de la retina de roedores (Barnstable y Drager, 1984; Perry y cols., 1984), aunque se encuentra también en las células de Müller *in vitro* (Schlamp y cols., 2001), y característicamente desciende su expresión en presencia de daño neuronal.

El **Brn3a** es un factor de transcripción de la familia de dominios POU que se expresa en las neuronas sensoriales y, desempeñan una importante función a nivel de desarrollo, diferenciación y supervivencia de las mismas. En el ratón adulto, los factores de transcripción Brn3 se expresan únicamente en las CGR (Xiang y cols., 1993; Xiang y cols., 1995; Nadal-Nicolas y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013b).

La detección de los **neurofilamentos (NFs)** se ha utilizado ampliamente como marcador de CGR. Los NFs son las proteínas fundamentales del citoesqueleto de las neuronas maduras y son responsables de mantener la conducción de la señal nerviosa. Están formados por tres subunidades, las altas (H), medias (M) y bajas (L) en función del peso molecular. Los NFs son muy abundantes a nivel de los axones y en ellos se

localizan de manera dispersa o formando haces (Wuerker y Kirkpatrick, 1972) dispuestos paralelos ininterrumpidamente al eje del axón, aunque se hacen discontinuos a nivel de los nodos de Ranvier (Tsukita y cols., 1981).

En situaciones no patológicas, las proteínas de los NFs muestran una distribución variable de las isoformas fosforiladas y no fosforiladas a nivel celular. Las isoformas no fosforiladas se observan predominantemente en el soma, las dendritas primarias y la región del axón más proximal de las neuronas. Sin embargo, los NFs experimentan un cambio en la fosforilación de los NFs cuando la proteína se transporta desde el soma hasta el axón (Nixon y Lewis, 1986) originando que las isoformas fosforiladas estén presentes principalmente en los axones (Sternberger y cols., 1985).

Sin embargo, ante diversas situaciones anómalas, los NFs sufren modificaciones, siendo uno de los más habituales la fosforilación. La fosforilación, en particular la de los NFs-H, se ha asociado a una disminución de la velocidad de transporte axonal (Jung y Shea, 1999; Perrot y cols., 2008). Además, se ha demostrado la distribución anormal de los NFs (H) fosforilados en los somas celulares y en las dendritas proximales de las CRGs (Drager y Hofbauer, 1984; Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Perez y cols., 1988; Balkema y Drager, 1990; Silveira y cols., 1994; Dieterich y cols., 2002; Soto y cols., 2008; Soto y cols., 2011) en enfermedades neurodegenerativas y otras lesiones neuronales (Dieterich y cols., 2002; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008; Soto y cols., 2011).

También se ha observado una disminución en los niveles de ARNm de los NFs tras diferentes tipos de lesiones retinianas tales como la axotomía del nervio óptico, la isquemia o la excitotoxicidad (McKerracher y cols., 1990; Hoffman y cols., 1993; Chidlow y cols., 2005; Agudo y cols., 2008) lo cual podría asociarse a un deterioro celular progresivo.

Los anticuerpos que detectan los NFs fosforilados de alto peso molecular, el NF-200 y el RT97, son marcadores indirectos específicos de CGR supervivientes pero dañadas (Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Perez y cols., 1988; Villegas-Perez y cols., 1996; Villegas-Perez y cols., 1998; Parrilla-Reverter y cols., 2009a), ya que no marcan las células amacrinas desplazadas a la capa de CGR (Drager y Hofbauer, 1984; Kong y Cho, 1999).

2. ELECTORRETINOGRAMA DE CAMPO COMPLETO

El electroretinograma (ERG) es el registro integrado de los cambios de potencial eléctrico en la retina tras un estímulo luminoso. La respuesta obtenida es la actividad eléctrica global producida por el movimiento de iones en las distintas células de la retina. El movimiento iónico se debe fundamentalmente al potasio (K^+) y al sodio (Na^+), producido por la apertura y cierre de canales. Cabe señalar que el ERG de campo completo aporta información sobre la funcionalidad de la retina valorando la función general de bastones y conos pero no puede detectar adecuadamente una disfunción local ni proporciona una información topográfica de los déficits retinianos. En estos casos, son útiles otro tipo de registros como son ERG patrón (pERG) y ERG multifocal (mERG) (Lam, 2005), cuyo origen reside en las capas más internas de la retina, principalmente de las CG, y de diferentes áreas precisas de la retina, respectivamente.

2.1 Orígenes de las respuestas electroretinográficas.

La representación gráfica de un ERG consiste en una serie de deflexiones positivas y negativas, resultantes de la activación de distintos tipos celulares en la retina. Se denominó con la letra *a* a la deflexión negativa inicial, con la letra *b* señalaron el siguiente potencial positivo y finalmente como onda *c*, un último y prolongado componente positivo. La onda a es producida por efecto de la hiperpolarización del fotorreceptor en condiciones lumínicas. El potencial de membrana originado por la disminución en la concentración de GMPc y el concomitante cierre de los canales de Na^+ se refleja funcionalmente como una disminución del potencial.

La onda b se origina en condiciones ínfimas de luz en la que la respuesta eléctrica es debida a los bastones y amplificada por las células bipolares despolarizantes (*ON*) (Frishman, 2006).

Coexiste otra posible hipótesis sobre la generación de onda b asociado a la participación de las células de Müller (CM). Al ser activadas las CB por parte de las células fotorreceptoras, las CB (*tipo ON*) liberan gran cantidad de K^+ al medio extracelular siendo éste recapturado por las CM para restablecer las condiciones fisiológicas del medio extracelular generándose una corriente transretiniana a lo largo de las CM originando la correspondiente deflexión positiva (Miller y Dowling, 1970).

2.2 Respuestas estándar en el ERG y origen fisiológico.

Un ERG estándar comprende cinco respuestas electroretinográficas establecidas según la *Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión* (del inglés ISCEV) atendiendo a las condiciones lumínicas en las que son obtenidas las respuestas.

En condiciones de adaptación a la oscuridad, escotópicas, se obtiene **la respuesta de bastones** originando la correspondiente *onda b*. Sin embargo, la *onda a* no es perceptible por la baja intensidad de los estímulos luminosos para que las respuestas hiperpolarizantes de los bastones sean detectadas. La respuesta escotópica a intensidades de luz mayores da lugar a la obtención de la *onda a* y la *onda b*, es la denominada **respuesta mixta**. La *onda a* es originada por la hiperpolarización de los fotorreceptores y la *onda b* se debe a la actividad de las CB *tipo ON* (despolarizantes) causando, al mismo tiempo, la despolarización de las células de Müller (CM).

En condiciones fotópicas, la respuesta es debida a los **conos**, originándose inicialmente una deflexión negativa producida por la fototransducción de los conos y la posterior contribución de la actividad postsináptica de los mismos. La *onda a* está influenciada por esa actividad de la retina interna incluyendo la hiperpolarización de CB *tipo OFF*. Por otro lado, la *onda b* vuelve a deberse a las despolarizaciones de las CB (*tipo ON*) de la retina interna, siendo también afectada por las actividades de bipolares *OFF* hiperpolarizantes y de las células horizontales. Es decir, la respuesta se obtiene por la vía de señalización de los conos.

En las condiciones fotópicas también es posible generar una respuesta consistente en varias *ondas b*. Es también una respuesta de conos con un estímulo repetido con una frecuencia de entre 20 y 50 Hz. En este caso la contribución directa de los conos es muy pequeña. Esta respuesta, conocida como **flicker**, está constituida por componentes *On* y *Off*, que se van contrarrestando.

Bajo condiciones escotópicas y fotópicas también puede registrarse una serie de deflexiones positivas y negativas, de curso temporal rápido y que se obtienen al filtrar eléctricamente componentes de baja frecuencia en el registro, son los denominados **potenciales oscilatorios (PO)**. Esta respuesta se debe a la actividad conjunta de conos y bastones originándose entre 3 y 6 ondas denominadas *PO: OPI-OP6*. Como origen de

los *PO* se ha propuesto la actividad de circuitos inhibitorios retroalimentados en la CPI probablemente originados por las CA y las CG, aunque no está bien establecido y es motivo de controversia entre diferentes autores (Wachtmeister, 1998; de la Villa, 2004; Lam, 2005).

En cada registro, debe medirse la **amplitud máxima** de cada onda y el **tiempo implícito**, es decir, el tiempo en el que transcurre desde la aplicación del estímulo luminoso hasta el pico máximo para cada onda analizada (valor mínimo de la *onda a* o máximo en la *onda b* (Marmor y cols., 2004; Lam, 2005).

2.3 Respuesta escotópica umbral (STR)

Los posibles registros electroretinográficos comentados anteriormente engloban las respuestas ISCEV. En condiciones escotópicas es posible registrar la denominada **respuesta escotópica umbral** (STR: scotopic threshold response). Disminuyendo las intensidades lumínicas en condiciones escotópicas se puede detectar una deflexión positiva, *onda b*, precedida por una *onda a* negativa, tratándose de la parte más sensible de detección del ERG (Saszik y cols., 2002; Frishman, 2006).

El origen de esta respuesta corresponde a la participación de células ganglionares y a la contribución de las células amacrinas desplazadas.

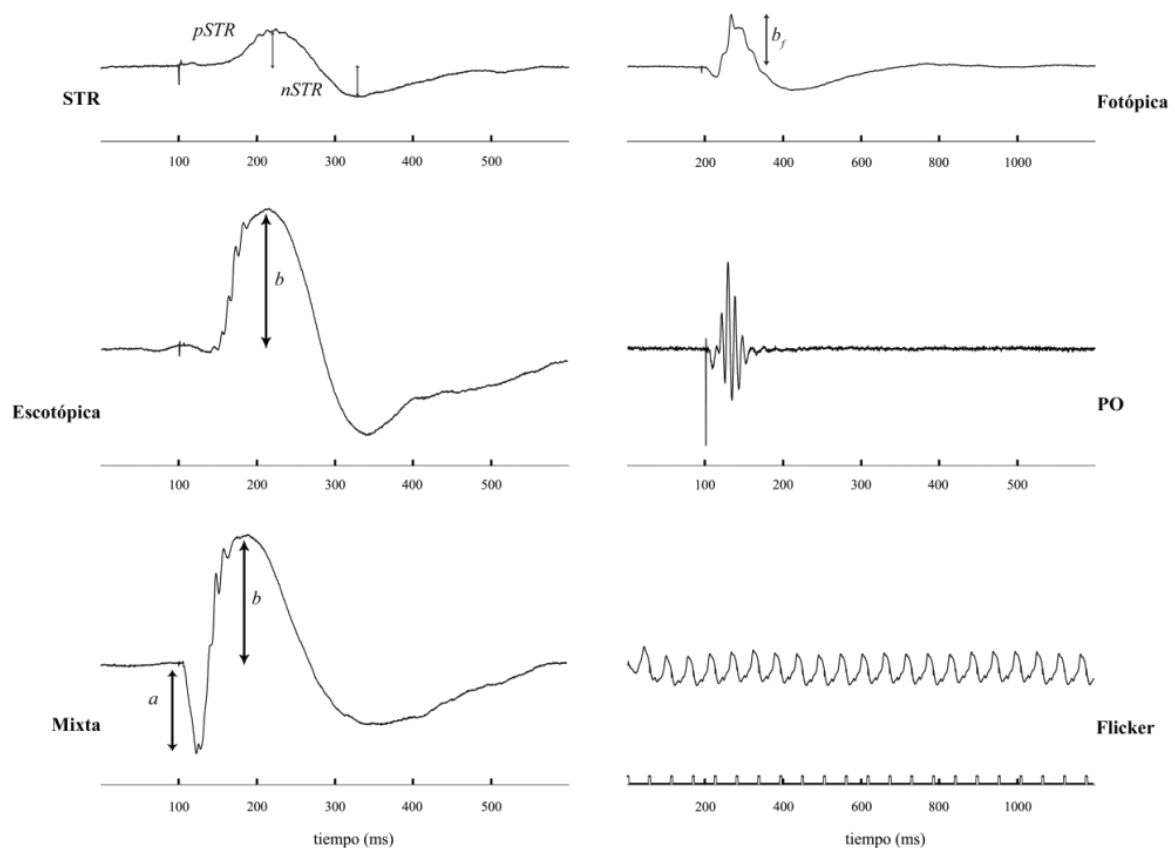


Figura 6. Respuestas representativas de los cinco registros electroretinográficos y de la respuesta STR en condiciones fisiológicas. Representación de los registros. Onda a (a); onda b (b) y onda b fotópica (b_f).

3. GLAUCOMA

El glaucoma es una de las causas más importantes de ceguera en el mundo, se estima que 4.5 millones de personas en el mundo sufren pérdida visual irreversible debido al glaucoma, constituyendo el 12.3% de la ceguera global (OMS, 2004) y afecta a aproximadamente 60 millones de personas en el mundo (Quigley y Broman, 2006).

Esta neuropatía se caracteriza por la degeneración de células ganglionares de la retina (CGR) y pérdida axonal. Aun así, los mecanismos que originan el desarrollo del glaucoma no están claros. Además de toda la información acerca de esta patología, muy a menudo el glaucoma va asociado a la elevación anormal de presión intraocular (PIO). Esta es la principal razón por la que la mayor parte de los tratamientos van dirigidos hacia el descenso de la presión intraocular para proteger las CGR (Schuetauf y cols., 2002).

A pesar de esto, el glaucoma es una enfermedad cuya fisiopatología es multifactorial. Además de la presión intraocular, la desregulación vascular y procesos de inflamación contribuyen a la lesión inicial en los axones de CGR en la lámina cribosa, alterando la microcirculación del nervio óptico. Los factores que dan lugar a un daño secundario incluyen la excitotoxicidad provocada por glutamato o glicina liberada de las neuronas lesionadas y, el daño oxidativo causado por un exceso de producción de óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno. Como resultado de la interacción de múltiples factores, se produce una disfunción y posterior muerte de CGR que conducen a una pérdida visual irreversible (Kaushik y cols., 2003).

3.1 Mecanismos moleculares implicados en la degeneración glaucomatosa.

Los mecanismos moleculares que originan la degeneración de las CGR son el resultado de la interacción entre un daño axonal primario, pérdida de factores tróficos, isquemia, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, plegamiento anómalo de las proteínas y componentes inflamatorios e inmunes (Agudo-Barriuso, 2011; Almasieh y cols., 2012). A continuación, se detallarán algunos de los elementos que contribuyen a la fisiopatología del glaucoma.

La elevación de la presión intraocular

La elevación de la PIO origina deformaciones mecánicas en los tejidos oculares y, cuando los niveles de estrés exceden la tolerancia fisiológica se producen remodelaciones para regular el entorno homeostático (Downs, 2011; Grytz y cols., 2011). Se ha observado en ojos glaucomatosos, alteraciones en los componentes de la matriz extracelular (MEC) en respuesta a la elevación de la PIO, siendo ésta la que facilita la supervivencia y la interconexión celular en el tejido (Werb, 1997). La remodelación de la MEC incluye cambios en el colágeno tipo I, IV y V, en el factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), y de las metaloproteinasas de matriz (MMP-9), enzimas de degradación de la MEC (Johnson y cols., 1996; Pena y cols., 1999; Cordeiro, 2002). La exposición a un incremento de la PIO induce un aumento de la secreción de MMP-9 y, la concomitante pérdida de laminina, componente de gran importancia en la MEC, desencadenando un proceso de muerte celular por apoptosis de las CGR (Grossmann, 2002; Zhang y cols., 2004; Guo y cols., 2005). Este aumento de MMP-9 parece estar relacionado con el aumento de los receptores de glutamato en las

células de la retina durante la progresión de la patología glaucomatosa (Yan y cols., 2000). Por otro lado, otros trabajos muestran como la activación de astrocitos durante el incremento de la PIO podría ser fuente importante de MMP-9 (Agapova y cols., 2001).

Además, estas alteraciones de la MEC y del propio daño mecánico originado en los axones en la región del nervio óptico pueden contribuir a la disfunción mitocondrial generando una deficiencia en el transporte axonal retrógrado de factores neurotróficos (Quigley, 1999; Crish y cols., 2013) y desencadenando la muerte de CGR por apoptosis (Nickells, 1996). También se ha observado un incremento del TNF- α originado por la hipertensión ocular (Nakazawa y cols., 2006). Esta molécula parece contribuir a la neurodegeneración glaucomatosa de dos posibles formas; una dañando directamente los axones de las CGRs que tienen receptores para el TNF- α (Tezel y cols., 2001; Yuan y Neufeld, 2001) y la otra, induciendo la producción de NOS-2 en los astrocitos (Yuan y Neufeld, 2000) que indirectamente dañará las CGRs.

Insuficiencia vascular: Procesos isquémicos

Como se ha comentado anteriormente, la elevación de la PIO es un factor crucial en la patología glaucomatosa a pesar de que su disminución no garantiza la detención de la degeneración retiniana (Chauhan y Drance, 1992; Rossetti y cols., 1993; Tezel, 2011). Además, la pérdida progresiva del campo visual en pacientes normotensos indica que otros factores contribuyen activamente desde el inicio de la neuropatía a la muerte celular de las CGR por apoptosis (Caprioli y Spaeth, 1985; Agarwal y cols., 2009).

Existe una alta prevalencia entre la enfermedad glaucomatosa y pacientes con migraña, lo que sugiere que el daño de las CGR podría ser originado como consecuencia de una neuropatía óptica isquémica (Gass y cols., 1997; Wang y cols., 1997; O'Brien y Butt, 1999; Cursiefen y cols., 2000; Boland y Quigley, 2007). En pacientes con glaucoma, se han detectado elevadas concentraciones de un vasoconstrictor, la endotelina (ET-1) (Cellini y cols., 1997; Noske y cols., 1997; Tezel y cols., 1997; Hollo y cols., 1998; Emre y cols., 2005) y de la MMP-9 (Golubnitschaja-Labudova y cols., 2000) en humor acuoso y plasma. Por otro lado, también se considera un importante factor de riesgo para el glaucoma, la disminución progresiva de la perfusión cerebral y ocular (Martinez y Sanchez, 2005; Siesky, 2012; Martínez, 2013).

Excitotoxicidad inducida por glutamato

La muerte celular apoptótica de las CGR también se ha atribuido a la toxicidad inducida por glutamato, principal neurotransmisor excitatorio de la retina. Los astrocitos y las células de Müller se encargan de recapturar el exceso de glutamato para transformarlo en glutamina, por lo que una posible alteración en este mecanismo podría originar un aumento del neurotransmisor (Naskar y cols., 2000; Moreno y cols., 2005; Sullivan y cols., 2006) así como también una liberación masiva del mismo tras la muerte de CGR (Dreyer y cols., 1996; Dkhissi y cols., 1999). Como consecuencia de la acumulación del NT, se produce una sobreactivación de los receptores de glutamato, principalmente los ionotrópicos N-metil-Daspartato (NMDA) que va a provocar un significativo incremento de los niveles de calcio intracelular originando la muerte neuronal.

Estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas el óxido nítrico (NO) desempeña un papel importante y beneficioso, sin embargo, el exceso de producción de NO se ha asociado con diferentes enfermedades oculares, incluyendo el glaucoma donde la desregulación vascular o la isquemia pueden favorecer la generación de radicales libres (Flammer y cols., 1999; Chen y Kadlubar, 2003). En situaciones de estrés oxidativo las funciones endoteliales están alteradas, especialmente la producción de NO y de endotelina-1 (Tamm y cols., 1996; Wiederholt, 1998).

En los pacientes glaucomatosos se ha descrito un aumento de la enzima que sintetiza el NO, la óxido nítrico sintasa (NOS) localizada en astrocitos y microglia reactiva (Liu y Neufeld, 2000; Wax y Tezel, 2002; Agarwal y cols., 2009). El exceso de NO puede alcanzar a los axones de las CGR formándose radicales muy reactivos induciendo la apoptosis de las mismas (Neufeld, 1999b; Flammer y Mozaffarieh, 2007). Así como puede inducir la elevación de la liberación de glutamato.

Además se ha asociado con el incremento de NO, alteraciones en los niveles de ET-1 en pacientes glaucomatosos observándose niveles elevados de éste péptido (Okuno y cols., 2003) así como con otras alteraciones de la MEC (Rao y cols., 2008) o

del transporte axonal (Hollander y cols., 1995; Stokely y cols., 2002) o astrogliosis (Prasanna y cols., 2002; Prasanna y cols., 2005; Rigosi y cols., 2010).

Inflamación y componentes autoinmunes

Además del daño mecánico y/o isquémico asociado a la neuropatía óptica glaucomatosa, ciertas respuestas inflamatorias mediadas por el sistema inmune, pueden estar relacionadas con la patogénesis del glaucoma (Tezel, 2013).

Las reacciones inflamatorias de tipo autoinmune parecen ser originadas por anomalías en el control de las respuestas inmunes observadas en el glaucoma. Se ha detectado una mayor prevalencia de gammapatía monoclonal en los pacientes glaucomatosos (Hammam y cols., 2008; Gramlich y cols., 2013; Pinazo-Duran y cols., 2013). Se ha observado un aumento de auto-anticuerpos en el suero (Tezel y cols., 1998; Tezel y cols., 1999; Maruyama y cols., 2000; Yang y cols., 2001b; Joachim y cols., 2008; Reichelt y cols., 2008; Dervan y cols., 2010) y en el humor acuoso de estos pacientes (Joachim y cols., 2007b) dirigidos contra algunos glicosaminoglicanos de la cabeza del nervio óptico (Tezel y cols., 1999) y una amplia variedad de antígenos retinianos como la glutatión S-transferasa (Yang y cols., 2001b; Kokotas y cols., 2012), la fosfatidilserina (Kremmer y cols., 2001), las proteínas de shock térmico (HSP) (Tezel y cols., 1998; Wax y cols., 1998; Tezel y Wax, 2004; Kokotas y cols., 2012) y las α -cristalinas (Tezel y cols., 1998; Wax y cols., 1998; Huang y cols., 2007; Joachim y cols., 2007a; Joachim y cols., 2007b). Estas proteínas protegen a las neuronas del daño oxidativo (Wax y cols., 1998) y de estímulos apoptóticos (Tezel y cols., 1999; Tezel y Wax, 2000b) y, se encargan de estabilizar el citoesqueleto celular y promover la reparación del tejido (Wax y Tezel, 2009). Sin embargo, estas proteínas son muy antigénicas, lo cual puede ser consecuente con una respuesta autoinmune en multitud de patologías (Young, 1992). Se ha visto que los altos niveles de auto-anticuerpos presentes en los pacientes glaucomatosos se correlacionan con la apoptosis de las CGRs (Tezel y cols., 1998; Tezel y Wax, 2000b; Wax y Tezel, 2009).

Las células gliales son capaces de activarse, ante cualquier tipo de daño para garantizar el correcto funcionamiento del sistema inmune del que consta el tejido nervioso (Tezel y cols., 2007). Se sabe que una activación crónica de estas células es un indicador claro de que están teniendo lugar procesos neuroinflamatorios, bien de tipo

innato o adquirido (Tezel y Fourth, 2009). La ausencia de señales de inhibición glial procedente de las neuronas y un ambiente rico en sustancias proinflamatorias, parecen ser factores claves en la activación de las células gliales de la retina y del nervio óptico que se observan tanto en la patología humana (Hernandez y Pena, 1997; Neufeld, 1999a; Wang y cols., 2002; Tezel y cols., 2003; Tezel, 2013), como en los modelos de glaucoma experimentales (Tanihara y cols., 1997; Wang y cols., 2000; Naskar y cols., 2002; Lam y cols., 2003; Woldemussie y cols., 2004; Ju y cols., 2006; Inman y Horner, 2007; Ramirez y cols., 2010). Una activación glial temprana, moderada y transitoria se ha correlacionado con una respuesta inmune de carácter neuroprotectora. Sin embargo, la activación crónica de estas células induce la secreción de ciertas sustancias proinflamatorias, siendo la principal fuente de TNF- α , IL-1 (Tezel y Wax, 2000a; Yan y cols., 2000; Yuan y Neufeld, 2000; Tezel y cols., 2001; Sappington y Calkins, 2008; Boehm y cols., 2011; Yang y cols., 2011) y NO (Neufeld y cols., 1997; Liu y Neufeld, 2000; Morgan, 2000). También son capaces de aumentar la secreción de sustancias que pueden alterar la estructura de la MEC, entre ellas, las MMPs (Yan y cols., 2000; Agapova y cols., 2001), resultando todo ello en cambios en el tejido que pueden exacerbar el curso de la patología.

Esta reactivación glial en el glaucoma se correlaciona también con un aumento de la expresión de otros factores ligados al sistema inmune, entre ellos diferentes componentes del complemento (Kuehn y cols., 2006; Stasi y cols., 2006; Tezel y cols., 2010; Gramlich y cols., 2013), los TLRs (Luo y cols., 2010) y el MHC-II (Yang y cols., 2001c; Ebnetter y cols., 2010).

Estudios recientes han detectado alteraciones en los niveles de IL-6 y IL-1 β en el nervio óptico de ratones DBA/2J mostrando una desregulación en la señalización de citoquinas (Wilson y cols., 2015). Así como, un aumento en la IL-18 en estructuras de la cámara anterior, como los procesos ciliares, cuerpo ciliar y el humor acuoso en ratones DBA/2J jóvenes (Zhou y cols., 2005).

De igual manera a lo que ocurre en otras enfermedades autoinmunes, en los pacientes con glaucoma se ha detectado una alteración sérica de las poblaciones de linfocitos T, y del receptor de la IL-2 (Yang y cols., 2001a) lo que sugiere que existe una respuesta inmune aberrante en esta neuropatía óptica (Huang y cols., 2010). Debido

a la alteración de la barrera hematorretiniana que se observa en los pacientes glaucomatosos, las células T podrían acceder a la retina (Tezel y Wax, 2004; Grieshaber y Flammer, 2007). Una entrada de estas células podría estar en relación con ciertos mecanismos neuroprotectores, como la eliminación de los auto-antígenos y las células dañadas del tejido. Sin embargo, la presentación de antígenos y la presencia de linfocitos de manera prolongada podrían inducir la entrada de nuevos linfocitos desde el torrente sanguíneo, los cuales pueden liberar citoquinas proinflamatorias que prolongarán la respuesta inmune (Rieck, 2013).

Hasta el momento, la mayor parte de los estudios han coincidido en que el glaucoma es una patología que no se caracteriza por una infiltración masiva de células T ni en la retina ni en el nervio óptico (Tezel, 2013). A pesar de ello, no se puede descartar la participación de los linfocitos T en la fisiopatología del glaucoma y el daño ocasionado en las células de la retina y del nervio óptico (Tezel, 2008).

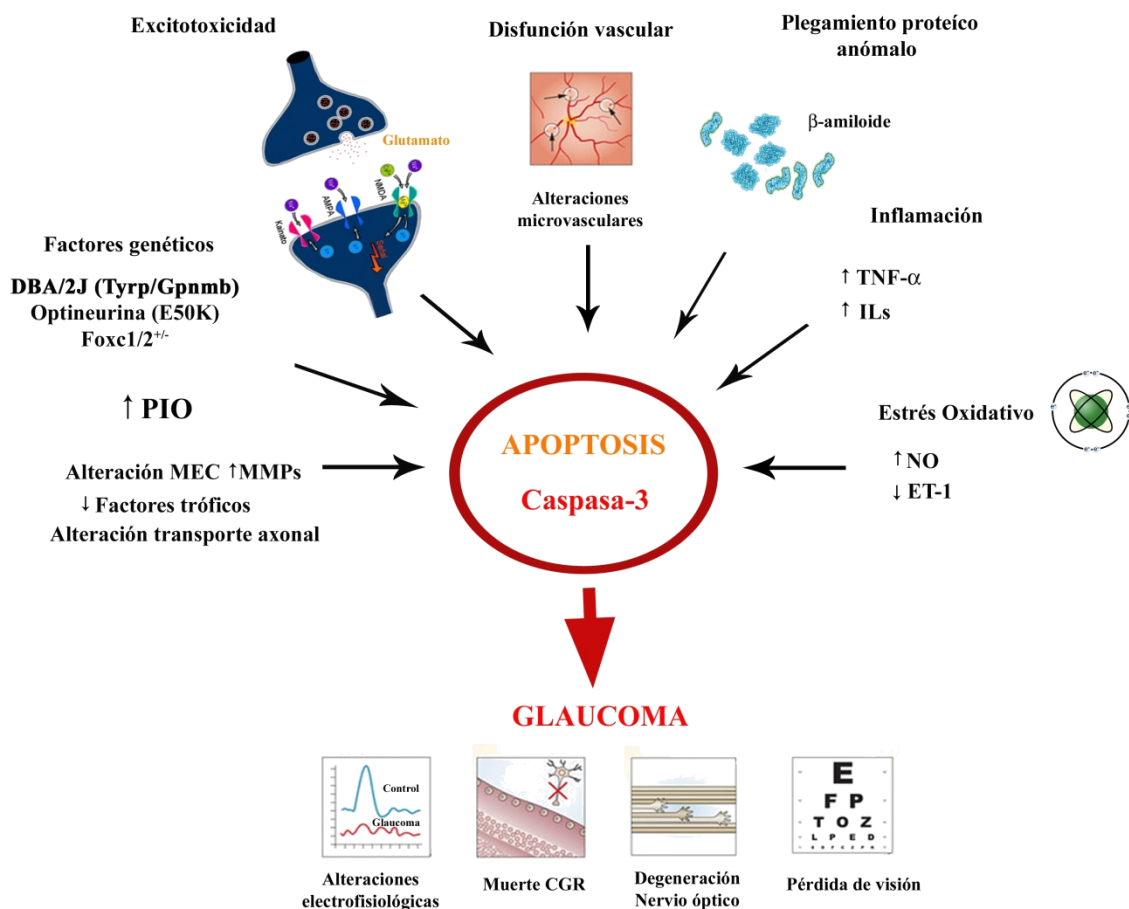


Figura 7. Principales factores implicados en la patogénesis del glaucoma. Algunos dibujos han sido modificados de (London y cols., 2013).

La pérdida neuronal por apoptosis

El desencadenante principal de la lesión neuronal que origina la pérdida de los axones de las células ganglionares no se conoce, pero tal y como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que la muerte de las mismas se produce mediante un proceso apoptótico en pacientes y en modelos experimentales de glaucoma (Quigley y cols., 1995; Pease y cols., 2000; Almasieh y cols., 2012).

La activación de las caspasas transcurre por varias rutas. La vía extrínseca implica la interacción de ligandos específicos a los receptores de muerte (TNFR) para inducir la muerte celular. Uno de estos ligandos, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se sobreexpresa en pacientes glaucomatosos y en modelos animales de hipertensión ocular (Tezel, 2008). La vía intrínseca (o mitocondrial), se activa por la supresión de señales de supervivencia, por la liberación de especies reactivas de oxígeno, es decir por estrés oxidativo (Tezel, 2006), y/o por fallo del metabolismo básico de las CGRs, bloqueo de la traducción de proteínas y de la generación de energía. Esta vía está regulada por moléculas pro-apoptóticas liberadas en la mitocondria y 3) la vía de estrés de retículo endoplásmático (Doh y cols., 2010). Se ha encontrado como la aplicación intraocular de varios inhibidores de caspasas han disminuido la muerte de las CGRs en un modelo de axotomía en rata (Kermer y cols., 1998).

3.2 Modelos experimentales de glaucoma en roedor.

La generación de modelos animales o experimentales ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, así como en la identificación de dianas terapéuticas.

Se conocen gran variedad de modelos inducidos de glaucoma que intentan mimetizar alguno de los mecanismos patológicos, que pueden estar contribuyendo al daño glaucomatoso tales como la degeneración de las células ganglionares de la retina (CGR) o el aumento de PIO mediante técnicas experimentales, dando lugar a la pérdida de la función visual.

Entre los modelos de inducción de hipertensión ocular, cabe destacar la fotocoagulación de la vena episcleral (Mabuchi y cols., 2003) y perilimbar, escleritis de la vena episcleral por inyección de solución hipertónica (Morrison y cols., 1997). La fotocoagulación láser de las vías de drenaje de humor acuoso, malla trabecular, venas perilimbares y episclerales en rata (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Vidal-Sanz y cols., 2012) y ratón (Aihara y cols., 2003; Grozdanic y cols., 2003; Salinas-Navarro y cols., 2009c; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014) y, la cauterización de las venas episclerales (Shareef y cols., 1995) que originan una pérdida progresiva de las CGR. Otras técnicas se han basado en la inyección en cámara anterior de sustancias capaces de bloquear las vías de drenaje del humor acuoso. La administración intracamerular periódica (semanalmente) de ácido hialurónico (Moreno y cols., 2005), la inyección de microesferas de látex con o sin suplemento de hidroxipropilmetilcelulosa (Urcola y cols., 2006; Sappington y cols., 2010), producen un bloqueo a nivel de malla trabecular. Así como la administración sistémica de antígeno-S en adyuvante completo de Freund simula un modelo de glaucoma uveítico (Mermoud y cols., 1994).

Por otro lado, están los modelos que inducen el daño específico de las CGR sin alterar la PIO. Esto se consigue mediante la generación de daño mecánico en el nervio óptico (Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Perez y cols., 1988; Vidal-Sanz y cols., 1991; Villegas-Perez y cols., 1993; Peinado-Ramon y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2000; Nadal-Nicolas y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2010; Galindo-Romero y cols., 2013a), la inyección intraocular de agentes tóxicos como glutamato o el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA, N-Methyl-D-aspartate) en ratón (Li y cols., 1999; Li y cols., 2002) como en rata (Siliprandi y cols., 1992; Morizane y cols., 1997; Lam y cols., 1999; Osborne y cols., 1999; Honjo y cols., 2000; Mizuno y cols., 2001) o la inducción de isquemia transitoria (Selles-Navarro y cols., 1996; Lafuente Lopez-Herrera y cols., 2002). Estos modelos no representan el desarrollo glaucomatoso en humano pero permiten estudiar los mecanismos moleculares de muerte de CGR y su posible neuroprotección.

3.3 El modelo animal DBA/2J.

Además de los modelos de glaucoma basados en el aumento de la hipertensión ocular y los orientados a la muerte selectiva de las células ganglionares, se conocen modelos genéticos que mimetizan características inherentes a la progresión glaucomatosa. Dentro de los numerosos modelos genéticos, se incluyen los ratones deficientes para los transportadores de glutamato GLAST o EAAC1 (Harada y cols., 2007; Johnson y Tomarev, 2010) así como el ratón transgénico que expresa el gen *optineurina* mutado (E50K) bajo el promotor de actina (Johnson y Morrison, 2009) que cursan un glaucoma normotenso, a diferencia del ratón *Foxc1*^{+/-} y *Foxc2*^{+/-} (Smith y cols., 2000) que generan un aumento de PIO.

Dentro de los modelos genéticos con aumento de la hipertensión ocular se encuentra la cepa de ratón DBA/2J, que desarrolla espontáneamente un glaucoma de tipo pseudoexfoliativo (Anderson y cols., 2002) y que se caracterizará a lo largo de esta Tesis Doctoral. El progreso de la enfermedad en el ratón DBA/2J ocurre como consecuencia de los cambios producidos en cámara anterior. Estos ratones desarrollan glaucoma debido a la dispersión del pigmento del iris (IPD) y la atrofia del estroma del iris (ISA) causado por las mutaciones en los genes *Gpnmb* y *Tyrp1* (John y cols., 1998; Libby y cols., 2005; Howell y cols., 2007) .

La acumulación del pigmento en la malla trabecular causa su obstrucción y la disminución del flujo del humor acuoso, originando un aumento en la PIO en los ratones DBA/2J. Los valores de PIO aumentan moderadamente entre 2 y 6 meses y hay un aumento significativo de los mismos entre los 8 y 12 meses (Saleh y cols., 2007; Harazny y cols., 2009) alcanzando su valor máximo entre 10 y 11 meses (Scholz y cols., 2008). Esta variabilidad es una importante característica del modelo animal y de la propia evolución de la patología así como de la muerte de CGR (McKinnon y cols., 2009).

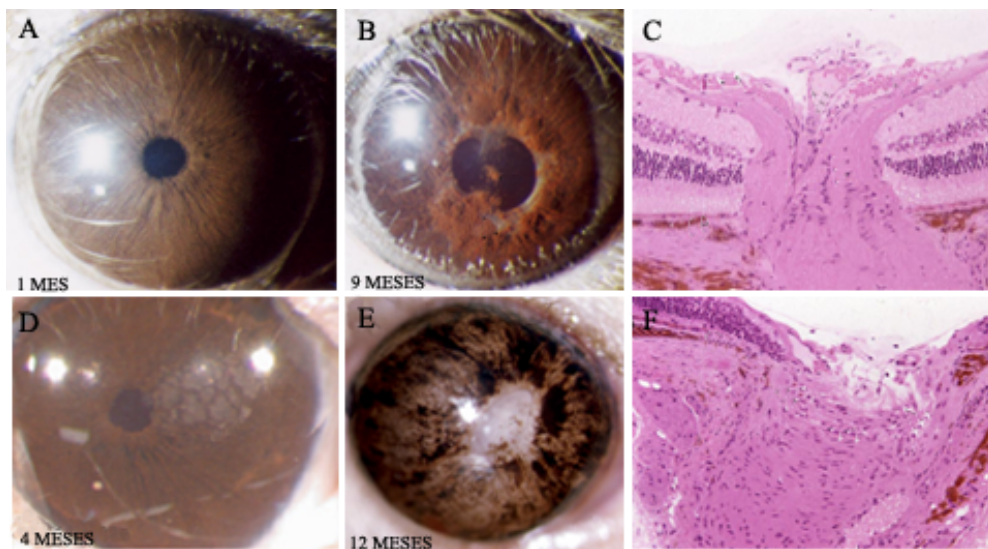


Figura 8. Evolución de IPD e ISA en función del tiempo en el animal glaucomatoso DBA/2J (A-B, D-E). (C-F) Secciones de retina de DBA/2J teñidas con hematoxilina-eosina mostrando el adelgazamiento de la retina central de un ratón DBA/2J (C) y la excavación del NO (F). *Modificado de Anderson, 2006.*

Los cambios en la PIO están correlacionados con la muerte de CGR y el déficit del transporte axonal (Danias y cols., 2003; Schuettauf y cols., 2004; Libby y cols., 2005; Schlamp y cols., 2006; Buckingham y cols., 2008; Crish y cols., 2010). Hay también una vulnerabilidad metabólica debida al daño mitocondrial (Buckingham y cols., 2008) que causa una importante disfunción en la retina interna (Ju y cols., 2009). La muerte de CGR durante el desarrollo de este glaucoma pigmentario involucra diferentes mecanismos. Existe una gran controversia entre los procesos de apoptosis (Jakobs y cols., 2005; Zhou y cols., 2005) y necrosis (Schuettauf y cols., 2004). Además de la muerte de CGR se trata de una muerte sectorial a lo largo de toda la retina (Schlamp y cols., 2006).

Además de los cambios morfológicos observados en la retina interna, se han investigado las implicaciones funcionales de estos cambios en la degeneración retiniana. La actividad eléctrica ha sido evaluada por medio de pERG mostrando un descenso significativo de la actividad (Porciatti y cols., 2007) junto con un aumento en la PIO (Saleh y cols., 2007; Harazny y cols., 2009). Los análisis de ERG muestran importantes reducciones de la amplitud de respuesta de algunos tipos celulares en ratones DBA/2J de avanzada edad (Nagaraju y cols., 2007; Heiduschka y cols., 2010), indicando el daño

en la retina más externa. Además el estudio muestra un importante descenso en la pERG en animales DBA/2J (Nagaraju y cols., 2007).

3.4 Glaucoma y enfermedad de Alzheimer.

A lo largo de esta *Introducción*, se han descrito brevemente algunos de los mecanismos principales que contribuyen al inicio de la cascada apoptótica en el glaucoma. Uno de estos factores es el plegamiento anómalo de proteínas.

Los depósitos de β -amiloide son una característica distintiva de varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Pepys, 2006) y la enfermedad de Parkinson (Attems y Jellinger, 2006; Verwey y cols., 2008; Villemagne y cols., 2008). Así como también, se ha detectado en patologías oculares tales como la degeneración macular (Johnson y cols., 2002) y el glaucoma (McKinnon y cols., 2002; Yoneda y cols., 2005; Goldblum y cols., 2007; Guo y cols., 2007b). Además, el tratamiento mediante fármacos dirigidos hacia β -amiloide, como inhibidores de β -secretasa han disminuido la muerte de CGR en estudios *in vitro* e *in vivo* (Yamamoto y cols., 2004; Guo y cols., 2007b), congo red y anticuerpos para β -amiloide (Yankner, 1996; Guo y cols., 2007b) así como, la terapia combinada aumentando el efecto neuroprotector de las CGR en un modelo de hipertensión ocular en rata (Guo y cols., 2007b).

Por otra parte, se ha demostrado que la activación de la caspasa-3 podría estar implicada en el proceso de degeneración de las CGR, así como el procesamiento anómalo de la proteína precursora amiloide. Se ha demostrado el incremento de la proteína β -amiloide en las CGR en un modelo de hipertensión de rata pudiendo contribuir a la patofisiología del glaucoma (McKinnon y cols., 2002).

Todas estas evidencias entre el glaucoma y la enfermedad de Alzheimer también se han establecido debido a la pérdida de CGR encontrada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Blanks y cols., 1996a; Blanks y cols., 1996b; Parisi y cols., 2001; Iseri y cols., 2006) y en la enfermedad de Parkinson (Bayer y cols., 2002b). Esta muerte neuronal va asociada a cambios característicos propios del glaucoma. Además de estas observaciones clínicas, los mecanismos patológicos que involucran a la proteína β -amiloide en la muerte neuronal presentan grandes similitudes entre la pérdida de las

CGR y la degeneración observada en el hipocampo de modelos de EA (Vickers y cols., 1995; Archer y cols., 1998; Johnson y cols., 2002). Otra proteína involucrada en los procesos neurodegenerativos es la proteína tau. Tau promueve el ensamblaje de tubulina en microtúbulos que estabilizan el citoesqueleto axonal. Se han detectado niveles disminuidos de la presencia de dicha proteína en la CNI y CPI en pacientes de glaucoma, encontrándose una fosforilación de la misma (Gupta y cols., 2008). Estos resultados podrían apoyar la hipótesis de que el glaucoma comparte vías de señalización con otras enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, para poder establecer un paralelismo entre el modelo de degeneración glaucomatosa en el ratón DBA/2J y la enfermedad de Alzheimer, se utilizó el modelo murino Tg ($APP_{swe}/PSEN1_{\Delta E9}$).

El modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer Tg ($APP_{swe}/PSEN1_{\Delta E9}$)

Los genes identificados como causa familiar de la enfermedad de Alzheimer con segregación autosómica dominante incluyen el gen que codifica para la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP), el gen de la presenilina 1 (PSEN1) y el gen de la presenilina 2 (PSEN2). Se han localizado diferentes mutaciones en el gen de la APP localizado en el cromosoma 21 (Goate y cols., 1991; Spire y Hyman, 2005). Así como también, se han encontrado mutaciones para la presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 (St George-Hyslop, 1992; Sherrington y cols., 1995) y la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1 (Levy-Lahad y cols., 1995; Rogaev y cols., 1995). Adicionalmente existe un cuarto gen, el APOE (alelo ϵ_4) en el cromosoma 19, que es otro elemento de riesgo especialmente en las formas no familiares, y en forma tardía de manifestación de la EA.

Existen numerosos modelos de ratón que expresan mutaciones en APP, PS1 y PS2 originando modelos transgénicos simples o, dobles y triples transgénicos en función del número de genes que expresan (Parnell y cols., 2012). Entre ellos se encuentra el modelo de ratón que contiene mutaciones en el gen para APP y para PSEN1 ($APP_{swe}/PSEN1_{\Delta E9}$). En este modelo animal se detectaron placas β -amiloide, encontradas principalmente en las capas plexiformes y se detectaron un número mucho menor de placas en CPI, CGR y CNE. (Perez y cols., 2009) aunque parece haber

controversia en el intervalo temporal de la detección de estos depósitos y en la expresión de dichas placas (Ning y cols., 2008; Dutescu y cols., 2009).

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizó este modelo animal de Enfermedad de Alzheimer con el objetivo de establecer un estudio comparativo entre ambas patologías.

4. EL SISTEMA PURINÉRGICO.

El ATP, como molécula central del metabolismo energético, es esencial para realizar múltiples procesos celulares tales como la síntesis de macromoléculas a partir de precursores simples, mantenimiento de gradientes iónicos de membrana, movimiento de orgánulos y transporte de macromoléculas, etc. Además, realiza funciones relevantes en la señalización intracelular, siendo un compuesto regulador de la función de múltiples proteínas intracelulares.

Las primeras evidencias de la participación de los nucleótidos y nucleósidos en los procesos biológicos fue la implicación de los mismos en procesos de vasodilatación de arterias coronarias y la disminución de la presión arterial (Drury y Szent-Gyorgyi, 1929; Bennet y Drury, 1931), motilidad intestinal y contracción uterina (Watts, 1953). Actualmente, se sabe que regulan numerosas funciones entre las que se encuentran implicadas la respuesta inmune, la secreción endocrina y exocrina, la inflamación, la agregación plaquetaria, entre otras. Las primeras evidencias de la acción del ATP extracelular como neurotransmisor se propusieron desde mitad de los años 50, mediante experimentos que demostraron la liberación de ATP por la estimulación retrógrada de nervios sensitivos (Holton y Holton, 1953, 1954; Holton, 1959), hasta que Burnstock tras la estimulación de nervios periféricos determinó que el neurotransmisor que se liberaba era el ATP, denominando por primera vez a dicha transmisión “*neurotransmisión purinérgica*” (Burnstock y cols., 1970; Burnstock, 1972).

Además se comprobó que el ATP estaba presente en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción y, podía ser co-almacenado y co-liberado junto adrenalina, acetilcolina (Burnstock, 1976; Richardson y Brown, 1987; von Kugelgen y Starke, 1991; Burnstock, 2007), junto con otros diadenosin polifosfatos (Ap_nA) y otros nucleótidos en los gránulos cromafines (Rodríguez del Castillo y cols.,

1988; Pintor y cols., 1991; Pintor y cols., 1992), así como con serotonina en los gránulos de las plaquetas y con histamina en los mastocitos y en los basófilos (Luthje y Ogilvie, 1983; Dubyak y el-Moatassim, 1993). La presencia del ATP, ADP (adenosina 5'-difosfato) y GTP (guanosina 5'-trifosfato) con diadenosin polifosfatos en vesículas sinápticas del sistema nervioso, se describió por primera vez en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *torpedo marmorata* (Pintor, 1992) así como también se liberan por exocitosis junto con el ATP en terminales nerviosas de rata (Pintor y cols., 1993, 1995). Todos estos trabajos postulaban la idea de que una misma célula podía almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores, se definía, por tanto, el concepto de co-transmisión. Posteriormente, se describió el almacenamiento y liberación del ATP en terminales colinérgicas, terminaciones gabaérgicas y glutamatérgicas (Jo y Schlichter, 1999; Mori y cols., 2001) y la regulación que ejerce el ATP y diadenosin polifosfatos sobre la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA desde terminaciones sinápticas del cerebro de rata (Diaz-Hernandez y cols., 2001; Gomez-Villafuertes y cols., 2001; Diaz-Hernandez y cols., 2002; Gomez-Villafuertes y cols., 2003; Gualix y cols., 2003; Diaz-Hernandez y cols., 2004; Gomez-Villafuertes y cols., 2004). Todos estos estudios, junto con estudios posteriores, establecen firmemente el concepto de co-transmisión que se conoce en la actualidad (Pankratov y cols., 2006).

El papel de este nucleótido y otros, adquirió mayor interés cuando esta molécula fue identificada como componente de gránulos secretores y vesículas sinápticas en sistemas neurosecretores (Gualix y cols., 1997). El co-almacenamiento con acetilcolina, monoaminas, e incluso neurotransmisores como glutamato y el ácido gamma butírico (GABA) reveló al ATP como un relevante modulador de la actividad de la mayoría de las sinapsis del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso autónomo (Trachte y cols., 1989).

Actualmente, los nucleótidos desempeñan un importante papel dentro del sistema nervioso central participando en funciones de neuroprotección, en el control central de funciones autónomas, en las interacciones neurona-glia, angiogénesis, regulación de la permeabilidad de microvesículas y en la traducción mecano sensorial, (Gordon, 1986; Dubyak y el-Moatassim, 1993; Burnstock, 1997, 2006).

4.1 Almacenamiento y degradación de nucleótidos.

Almacenamiento y transporte

El almacenamiento de estas moléculas en los gránulos de secreción, requiere un sistema de transporte al interior de los gránulos en contra de gradiente de concentración, los transportadores vesiculares. Sin embargo, hasta hace poco tiempo se asumía que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas. Hoy en día está reconocido que la liberación de ATP por parte de células sanas es un mecanismo fisiológico (Bodin y Burnstock, 2001; Lazarowski y cols., 2003).

Los nucleótidos y dinucleótidos de adenina se almacenan en el interior de vesículas de secreción alcanzando concentraciones mucho mayores de las que se encuentran en el citoplasma celular (>100 mM frente a 2-5 mM), para ser liberados mediante un sistema de transporte activo. Durante mucho tiempo se postularon diferentes mecanismos de transporte activo para acumular nucleótidos (Weber y cols., 1983; Currie y Fox, 1996). A pesar de las evidencias de la posible existencia de un transportador de nucleótidos vesicular (Gualix y cols., 1997; Gualix y cols., 1999) no se descubrió la proteína responsable de la acumulación del ATP hasta hace apenas unos años (Sawada y cols., 2008). La identificación de la proteína SLC17A9 como transportador vesicular de nucleótidos (denominado posteriormente VNUT) contribuye al almacenamiento y liberación de ATP en gran variedad de tejidos. Se trata de una isoforma de la familia de los transportadores SLC17 (Reimer y Edwards, 2004; Fredriksson y cols., 2008; Sreedharan y cols., 2010) con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos. La presencia de VNUT está ampliamente expresada en diferentes tejidos en humano y roedores (Nishida y cols., 2014) lo que sugiere que la entrada de nucleótidos mediada por VNUT en la vía secretora no se limita al sistema nervioso y neuroendocrino, como consecuencia, contribuye a la liberación de ATP (y al igual que otros nucleótidos) en una variedad de condiciones fisiológicamente relevantes (Sawada y cols., 2008). Además, un estudio reciente muestra la implicación de dicho transportador en el efecto modulador del ATP extracelular sobre la diferenciación neuronal (Diaz-Hernandez y cols., 2015).

Liberación no exocitótica

En muchos tipos celulares, como células endoteliales, musculares y gliales, la liberación de nucleótidos ocurre mediante mecanismos que no involucran vesículas exocitóticas en respuesta a estímulos como hipoxia, inflamación, daño tisular o estrés mecánico o a determinados agonistas liberando al medio elevadas concentraciones de nucleótidos (rango mM) (Bodin y Burnstock, 2001). Los mecanismos de liberación no exocitótica de nucleótidos de ATP no están totalmente identificados, aunque se ha propuesto que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC (“*ATP-binding cassette*”). Otras hipótesis señalan la posible participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas, panexinas y otras uniones gap (Buettner y cols., 2000; Bahima y cols., 2006; Eltzschig y cols., 2006). El papel que juegan las conexinas en la liberación de ATP es controvertido, diferentes estudios señalan que los bloqueantes de los hemicanales de estas proteínas, actúan como antagonistas del receptor P2X7. De esta manera, se propone que el receptor P2X7 contribuye a la salida de ATP de los astrocitos y a la propagación de las ondas de calcio (Suadicani y cols., 2006). Diversos grupos apoyan la hipótesis de que las panexinas, moléculas que al igual que las conexinas pueden formar hemicanales, podrían mediar la liberación de ATP (Barbe y cols., 2006; Dahl y Locovei, 2006; Locovei y cols., 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP (Uridina-5'-trifosfato), UDP (Uridina 5'-difosfato) y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el aparato de Golgi y el grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del aparato de Golgi (Lazarowski, 2006).

Una vez definido el ATP como neurotransmisor, su almacenamiento en vesículas de secreción y su liberación al medio extracelular, interaccionará con receptores específicos de membrana para, finalmente, ser inactivado, degradado o retirado del medio extracelular para evitar su acción prolongada.

Degradación de nucleótidos

Una vez liberados los nucleótidos al medio extracelular donde actúan sobre receptores específicos son hidrolizados por ecto-nucleotidasas (Zimmermann, 2000;

Robson y cols., 2006; Gomez-Villafuertes y cols., 2014). Los mecanismos de degradación de nucleótidos implican una cascada de señalización de enzimas extracelulares unidas a la membrana plasmática que conducen a la formación de diferentes intermediarios hasta generar el nucleósido correspondiente y fosfato, susceptibles de ser recapturados para la síntesis de nucleótidos de células adyacentes.

Las ecto-enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan formando cascadas de hidrólisis. Normalmente, se encuentran ancladas a la membrana plasmática con el dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles liberadas al medio (exo-nucleotidasas).

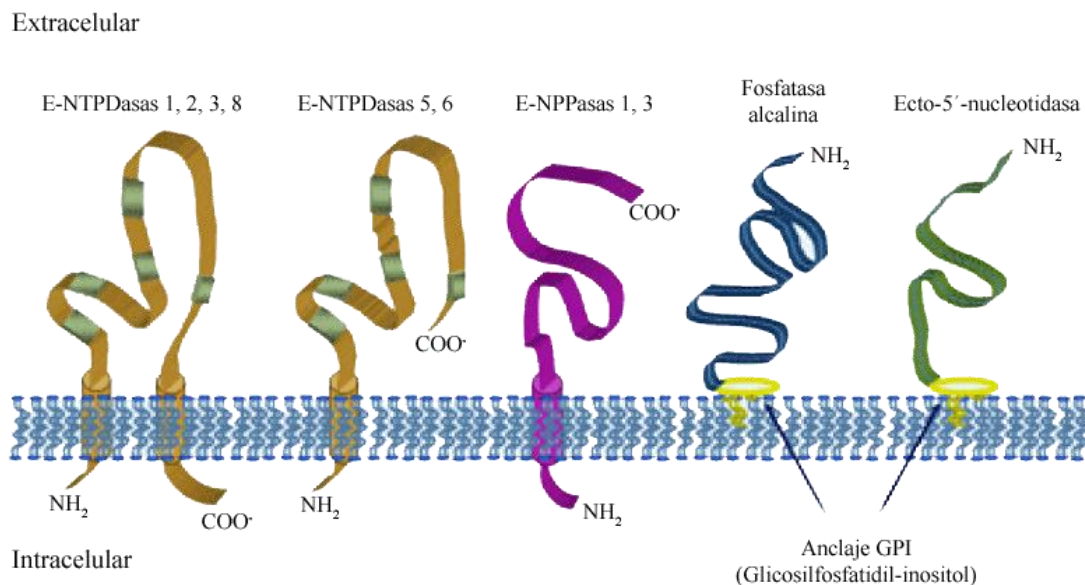


Figura 9. Estructura de algunos miembros de la familia de las ectonucleotidasas (E-NTPDasas, E-NPPasas, fosfatasa alcalina y ecto-5'-nucleotidasa). Figuras modificadas de (Fields y Burnstock, 2006).

Se clasifican en cuatro familias de enzimas que tienen diferente afinidad por el sustrato:

- Familia de las E-NTPDasas (Ecto-nucleotidotrifosfo y difosfohidrolasas). También denominadas como ecto-ATP-asa, ecto-ADPasa, ecto-apirasa o CD39. Están constituidas por dos hélices transmembrana y un dominio extracelular largo e hidrolizan

nucleótidos tri- y di- fosfato generando los correspondientes monofosfatos (Robson y cols., 2006).

- *Familia de las E-NPPasas (ecto-fosfodiesterasas, nomenclartua (Zimmermann, 2000).* Estas enzimas son glicoproteínas ancladas a membrana por un único segmento, con el extremo catalítico hacia el espacio extracelular. Catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, pero sólo las E-NPP-1-3 están implicadas en la degradación de nucleótidos y pueden hidrolizar ATP generando AMP y PPI (Zimmermann, 2000). Los diadenosina polifosfato, coenzimas como el NAD^+ y los lisofosfolípidos pueden ser sustratos de estos tipos de enzimas (Tokumura y cols., 2002; Umezu-Goto y cols., 2002).

- *Ecto-5'-nucleotidasa (CD-73).* Es una proteína dimérica de unión a zinc, anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI). Cataliza la etapa final de la reacción de hidrolisis generando el correspondiente nucleósido y fosfato inorgánico. Es la principal responsable de la formación de adenosina a partir de ATP y ADP (Zimmermann, 1996, 2000).

- *Fosfatasa alcalina.* Estas enzimas forman homodímeros y poseen tres cationes en cada sitio catalítico. Esta familia está formada por ecto-fosfomonoesterasas que liberan fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los nucleótidos tri-, di- y monofosfatos (Millan, 2006). Además, también pueden hidrolizar PPI y catalizar la reacción de transfosforilación en presencia de altas concentraciones de aceptores de fosfato.

Ecto-nucleotidasas	Reacción catalizada	Inhibidores
Familia Ecto-NTPDasa		
NTPDasa 1 (CD39)	$NTP \rightarrow NDP + Pi$	ARL 67156; 8-BuS-ATP; polioxometalatos; antagonistas receptores P2.
NTPDasa 2 (CD39L1)	$NDP \rightarrow NMP + Pi$ $NTP \rightarrow NMP + 2Pi$	
NTPDasa 3 (CD39L3)		
NTPDasa 8	$NTP \rightarrow NMP + Pi$	
Familia Ecto-NPPasas		
NPP1, NPP2, NPP3	$NDP \rightarrow NMP + Pi$ $Np_nN \rightarrow NMP + Np_{n-1}N$ $NAD^+ \rightarrow AMP + \text{nicotinamida mononucleótido}$ $NDP\text{-glucosa} \rightarrow NMP + \text{glucosa-6-fosfato}$	Antagonistas receptores P2; heparina; heparán sulfatos.
Ecto-5'-nucleotidasa		
	$NMP \rightarrow \text{Nucleósido} + Pi$	AOPCP
Fosfatasa alcalina		
TNAP		Levamisol L-homoarginina
Placentar Intestinal De células germinales	$NTP \rightarrow NDP \rightarrow AMP \rightarrow \text{Nucleósido} + 3Pi$	L-fenilalanina

Tabla 1. Familias de ectonucleotidasas. Los datos de la tabla han sido tomados de (Robson y cols., 2006; Zimmermann, 2007; Kukulski y cols., 2011).

4.2 Receptores de nucleótidos.

El ATP y otros nucleótidos liberados actúan sobre familias específicas de receptores P2 (P2X y P2Y), localizadas en las membranas de las células (Burnstock y Kennedy, 1985; Burnstock, 2008; Abbracchio y cols., 2009). Estas dos familias de nucleótidos se diferencian en su estructura molecular y en los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación. Los receptores P2X son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, son receptores metabotrópicos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Ralevic y Burnstock, 1998). La identificación y caracterización farmacológica de los receptores

de nucleótidos P2 no es sencilla, debido principalmente a la falta de agonistas y antagonistas selectivos, así como la co-expresión de diferentes subtipos en un mismo tejido o línea celular, y la acción de las ectoenzimas, pudiendo estar originando compuestos de degradación que actúan a su vez sobre otros receptores presentes.

La nomenclatura empleada en esta Tesis Doctoral tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge y cols., 2009; Coddou y cols., 2011).

4.2.1 Los receptores metabotrópicos P2Y.

Contienen siete dominios transmembrana hidrófobos conectados por tres bucles extracelulares y tres regiones intracelulares, el extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular (Jacobson y Boeynaems, 2010). Se componen de 8 subtipos clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos y están acoplados a las dos vías principales de transducción de señal metabotrópicas.

Los receptores P2Y_{1,2,4,6,11} están acoplados principalmente a la activación de la fosfolipasa C (PLC) a través de una proteína G_q produciéndose incrementos en la concentración intracelular de calcio Ca²⁺ y activando PKC, desencadenando numerosas cascadas de señalización secundarias (Erb y cols., 2006). El receptor P2Y₁₁ tiene la propiedad única de acoplamiento positivo al sistema adenilato ciclasa (AC) a través de una proteína G_s (Jacobson y cols., 2012). Los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ se asocian con proteínas G_i mediante la activación o inhibición de la AC. Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca²⁺ o K⁺, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner y Boehm, 2004; Abbracchio y cols., 2006; Gerevich y cols., 2007).

Estos receptores están ampliamente distribuidos en el organismo (Abbracchio y cols., 2006), (Burnstock, 2007). En el ojo, se han descrito receptores purinérgicos P2 en diferentes estructuras oculares (Guzman-Aranguez y cols., 2013; Sanderson y cols., 2014). En el sistema nervioso central, se ha descrito la expresión de la mayoría estando

involucrados en procesos de regulación de la plasticidad sináptica, liberación de NT y en la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroprotección (Ortega y cols., 2008; Ortega y cols., 2011; Burnstock, 2013) así como en procesos de cicatrización.

4.2.2 Los receptores ionotrópicos P2X.

Los receptores P2X son canales iónicos que forman parte integral de la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular y, una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na^+ , K^+ y, principalmente Ca^{2+}), lo cual produce una despolarización de la membrana y la activación de canales de calcio voltaje dependientes (North, 2002; Coddou y cols., 2011). Se han identificado 7 subunidades P2X diferentes (P2X1-7) con un tamaño comprendido entre 388 (P2X4) y 595 (P2X7) aminoácidos con un 40-50% de homología en la secuencia. El P2X7 es el que presenta menor similitud con el resto de los miembros de esta familia. Estas subunidades no son funcionales por sí solas y se ensamblan en trímeros formando homo o hetero-oligómeros para dar lugar a canales funcionales (Nicke y cols., 1998; Vial y cols., 2004). También han sido identificados los genes que codifican para las diferentes subunidades P2X. Los genes de las subunidades P2X4 y P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a los genes de las subunidades P2X1 y P2X5 (brazo corto del cromosoma 13). El resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de cada una de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar las isoformas de la subunidad P2X2 detectadas en el cerebelo de rata, en la cóclea y en la pituitaria (Simon y cols., 1997; Housley y cols., 1998; Lynch y cols., 1999). Asimismo, se han identificado varias isoformas de los receptores P2X4, P2X1, P2X5 y P2X7 (Le y cols., 1997; Dhulipala y cols., 1998; Hardy y cols., 2000; Gu y cols., 2004; Sellick y cols., 2004; Denlinger y cols., 2005). Aunque la mayoría de estas variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismas, la presencia de estas variantes y la posibilidad de formar distintos heterooligómeros, contribuye a explicar la gran heterogeneidad en las respuestas de los receptores P2X observada *in vivo* y algunas de las diferencias que se han encontrado entre los receptores endógenos y los expresados de forma heteróloga, como ocurre con el receptor P2X4 de ratón (Townsend-Nicholson y cols., 1999).

Además del sistema nervioso, estos receptores se expresan a lo largo de todo el organismo, en células de músculo liso, células gliales, células sistema inmune o plaquetas por lo que median multitud de procesos. Tienen un papel relevante en la transmisión sináptica rápida entre neuronas y en la transmisión neuromuscular en el músculo liso, donde el ATP actúa como uno de los neurotransmisores principales (Edwards y cols., 1992; Sneddon y cols., 2000).

4.2.2.1 Características estructurales y oligomerización.

Los receptores P2X forman parte de una familia dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando presentando diferencias sustanciales, ya que únicamente poseen dos dominios transmembrana (TM1 y TM2) con los extremos amino y carboxilo en el citosol (North, 1996), con motivos de unión a proteínas quinasas.

El extremo amino terminal está bastante conservado y tiene una longitud variable de 24 a 31 aminoácidos. Los dos segmentos transmembrana se extienden desde los residuos 30 al 50 y desde el 330 al 353, respectivamente. Ambos dominios están separados por un región extracelular de aproximadamente 280 aminoácidos donde se encuentran la mayoría de los residuos conservados entre los distintos subtipos de subunidades P2X. En esta región se encuentran también 10 residuos de cisteína altamente conservados que contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria mediante la formación de puentes disulfuro así como también presenta varias secuencias consenso de N- glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando (Torres y cols., 1998; Rettinger y cols., 2000; Hu y cols., 2002). En esta región 93 de los aminoácidos podrían participar en la unión con el ligando (Vial y cols., 2004). En la unión al ligando participan tanto el dominio extracelular como los dos segmentos transmembrana, los residuos Lys⁶⁹⁸, Arg²⁹² y Lis³⁰⁹, son los responsables de la unión de los fosfatos del ATP situados en los dominios TM1 y TM2 (Ennion y cols., 2000). Además los residuos aromáticos Phe¹⁸⁵ y Phe²⁹¹ serían los responsables de coordinar la unión del anillo de adenina del ATP. (Roberts y Evans, 2004). Teniendo en cuenta que el ATP generalmente está complejoado con iones magnesio en el medio extracelular se podrían establecer interacciones con residuos del receptor cargados negativamente no siendo esenciales para la unión del agonista (Jiang y cols., 2000; Ennion y Evans,

2001). Gouaux y su grupo propusieron que el sitio de unión del ATP a los receptores P2X se localiza en las ranuras que quedan entre las distintas subunidades (Kawate y cols., 2009; Hattori y Gouaux, 2012). Estas ranuras, están formadas por residuos implicados en la apertura del canal dependiente de ATP (Jiang y cols., 2000; Ennion y Evans, 2002; Roberts y Evans, 2006; Marquez-Klaka y cols., 2007).

El extremo carboxilo terminal presenta gran variabilidad en su secuencia y longitud. Su tamaño oscila entre los 27 aminoácidos correspondientes al receptor P2X6 a los 239 del receptor P2X7, que posee un dominio hidrofóbico adicional. Este hallazgo sugiere que el extremo C-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor. Las subunidades P2X1,3,4, y 6 presentan un tamaño más corto, mientras que la subunidad P2X2 muestra un extremo C-terminal de 120 aminoácidos, involucrado en la interacción de otros receptores como los de serotonina, canales nicotínicos α -4 β -2 y los de rho1/GABA (Barajas-Lopez y cols., 2002; Boue-Grabot y cols., 2004; Khakh y cols., 2005), mientras que el P2X7 alcanza 240 aminoácidos y posee en este extremo numerosas secuencias para la interacción con otras proteínas (Kim y cols., 2001; Murrell-Lagnado y Qureshi, 2008).

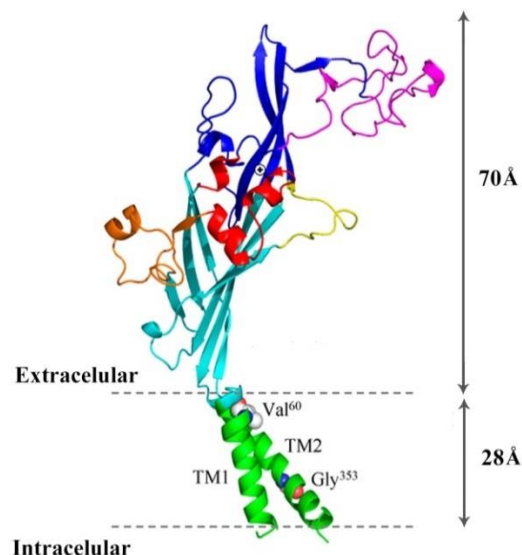


Figura 10. Modelo estructural de la subunidad P2X humana. Modificado de (Kawate y cols., 2009).

La actividad de los receptores P2X se ve modificada en presencia de los protones, iones divalentes y metales contenidos en el medio extracelular (King y cols., 1996). Las subunidades P2X2, P2X4 y P2X7 son los más sensibles a la regulación por dichos iones. La actividad del receptor P2X2 se potencia cooperativamente por Cu^{2+} y Zn^{2+} (Clyne y cols., 2002; Lorca y cols., 2005), a diferencia de los efectos producidos en el receptor P2X4 (Acuna-Castillo y cols., 2000). La actividad del receptor P2X7 es inhibida tanto por Zn^{2+} como por Cu^{2+} (Liu y cols., 2008).

Oligomerización

Como ya se ha comentado anteriormente, al igual que ocurre con otros canales iónicos activados por ligando, es necesario que se produzca un ensamblaje entre 3 o múltiplos de 3 subunidades P2X para que sea funcionalmente activo debido a que los dos segmentos transmembrana no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico (Nicke y cols., 1998; Ding y Sachs, 1999; Stoop y cols., 1999; Jiang y cols., 2003; Aschrafi y cols., 2004; Nagaya y cols., 2005; Barrera y cols., 2007).

Cada una de las subunidades P2X puede ensamblar entre sí para formar homómeros, formados por unidades idénticas, aunque esta interacción es más difícil en el caso de las subunidades P2X5 y P2X6 (King y cols., 2000; Wildman y cols., 2002; Barrera y cols., 2005). Las distintas subunidades también pueden generar interacciones en mayor o menor grado con los dominios transmembrana de otras subunidades diferentes, dando lugar a la formación de hetero-oligómeros, siendo las subunidades P2X3 y P2X4 las más restrictivas (Torres y cols., 1999). La posibilidad de que el receptor P2X7 pudiera formar hetero-oligómeros P2X4-P2X7 ha sido descrita en los últimos años (Guo y cols., 2007a), aunque otros trabajos han mostrado la inestabilidad de los mismos (Nicke, 2008).

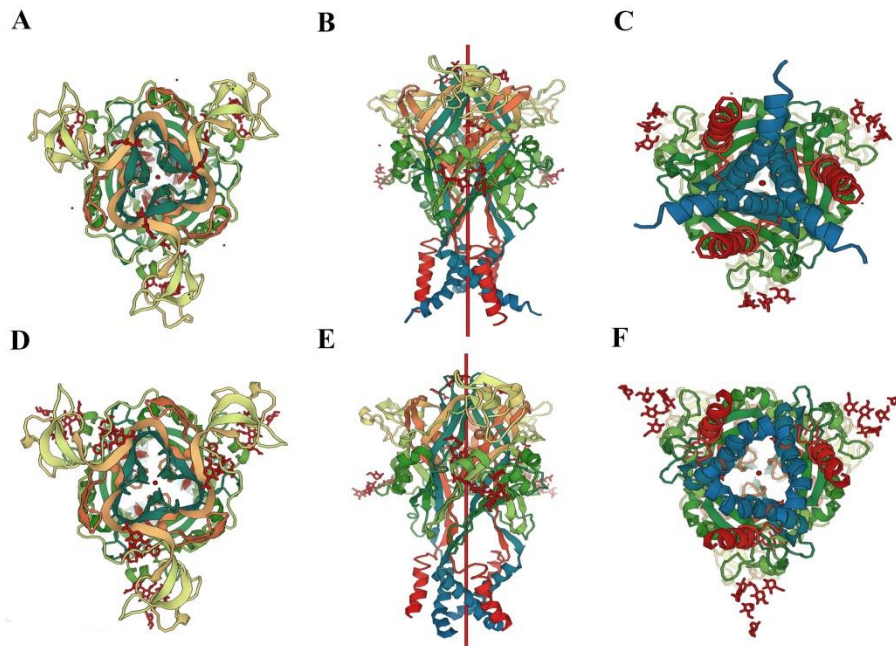


Figura 11. Modelo estructural del receptor homotrimérico P2X4. Se muestran las diferentes conformaciones espaciales de la proteína: cerrada (A, B y C) -sin el ATP unido- (PDB ID: 4DW0) y abierta (D, E y F) -con el ATP unido- (PDB ID: 4DW1). Se muestran las tres subunidades vistas desde el espacio extracelular (A y D), visión frontal de la (B y E) y visión desde abajo (C y F). Modificada de (Hattori y Gouaux, 2012).

4.2.2.2 Características funcionales y regulación de los receptores P2X.

Las propiedades funcionales y farmacológicas de un receptor P2X, pueden estar determinadas por las características de las subunidades que lo componen, mientras que en ocasiones difiere en su totalidad (Lewis y cols., 1995; King y cols., 2000). Así como la co-expresión de diversas subunidades en un tejido o tipo celular dificulta más el estudio de las mismas.

El tamaño del canal es de 8-20 Å, lo que facilita la entrada de iones pequeños, no obstante, algunos receptores pueden aumentar el diámetro del poro en respuesta a una aplicación sostenida de ATP, de modo que permiten el paso de grandes cationes (Egan y cols., 2006). En algunos tipos celulares, por ejemplo en macrófagos, la activación del receptor P2X7 conduce a la formación en pocos segundos de un poro citolítico que permite la entrada de moléculas con un tamaño molecular superior a los 900 Da como puede ser la sonda Yo-Pro-1. La activación del receptor P2X7 induce el reclutamiento de moléculas accesorias, entre las que se encuentra la panexina-1 (Panchin, 2005; Pelegrin y Surprenant, 2006, 2007).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el Cu^{2+} y el Zn^{2+} (Virginio y cols., 1999; North, 2002; Coddou y cols., 2011). Kawate y cols. han propuesto recientemente la presencia de 4 sitios de unión de cationes di- y trivalentes, uno en el centro de la región extracelular, los otros 3 en la periferia del receptor (un sitio por cada subunidad), y una regulación negativa del receptor por parte de estos iones (Kawate y cols., 2009).

A su vez, los receptores P2X pueden modularse a través de diversas acciones sobre su dominio intracelular. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio regulan de forma importante la actividad de los receptores (Boue-Grabot y cols., 2000; Toth-Zsomboki y cols., 2002). Por ejemplo, en la zona de transición entre el dominio TM2 y el C-terminal del receptor P2X7 se localiza una tirosina (Tyr343), cuya defosforilación tras la activación del canal reduce la duración de la respuesta (Becker y cols., 2008).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico provoca la activación de numerosas vías de señalización, como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez y cols., 2006; Leon y cols., 2006), MAPquinasas, proteína quinasa C (PKC) (Erb y cols., 2006) o glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Gomez-Villafuertes y cols., 2009; Ortega y cols., 2009); así como la liberación vesicular de neurotransmisores, como acetilcolina (Diaz-Hernandez y cols., 2002), glutamato (Gualix y cols., 2003) o GABA (Gomez-Villafuertes y cols., 2001).

4.2.2.3 Características farmacológicas de los receptores P2X.

La diferenciación farmacológica de los receptores purinérgicos, no permite en la mayoría de los casos, una diferenciación selectiva entre los distintos subtipos de

receptores P2X, existiendo incluso agonistas y antagonistas que a las mismas concentraciones actúan tanto en receptores P2X como P2Y (*tabla 2 y 3*).

La activación de los receptores P2X origina la entrada rápida (milisegundos) y no selectiva de cationes Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (Bo y cols., 2003). La valoración de la respuesta con el tiempo difiere entre los distintos receptores, en algunos casos la respuesta decae rápidamente (1-2 segundos) en presencia continuada del agonista como es el caso de los receptores, P2X1 y P2X3. Las respuestas del resto de receptores homoméricos y del receptor heteromérico P2X2-3 son más sostenidas, y en el caso del receptor P2X7 la corriente se mantiene durante varios minutos (North, 2002). Esta recuperación puede regularse por muchos factores, incluyendo el agonista utilizado, la presencia de calcio en el medio extracelular, la concentración de agonista libre o de procesos de regulación intracelular (Cook y cols., 1998; Rettinger y Schmalzing, 2004; Sokolova y cols., 2004).

En general, pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los receptores P2X. Los receptores P2X1 y P2X3 se caracterizan por presentar una elevada afinidad por el ATP (baja EC_{50}) y que también son activados por el análogo estructural α , β -meATP. Sin embargo, los receptores P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, muestran menor afinidad por el ATP y desensibilización menos marcada (North, 2002; Gevertz y cols., 2006; Coddou y cols., 2011).

Otros nucleótidos trifosfato (CTP y GTP) y dinucleótidos polifosfatos (Ap_nA , Ap_nG ; $n=3-6$) pueden actuar de manera no selectiva sobre receptores P2X aunque con menor potencia que el ATP. Entre los análogos sintéticos que pueden activar receptores P2X, se encuentran el 2MeSATP, que es un buen agonista de todos los receptores P2X, y también de algunos receptores P2Y, y el BzATP, que actúa sobre los subtipos P2X. Del mismo modo, ocurre con la falta de selectividad de los antagonistas como suramina, PPADS o RB-2 (reactivo azul 2), no pudiendo discriminar entre los diferentes receptores P2X ni siquiera entre los dos subtipos P2. En los últimos años, se han desarrollado análogos de éstos con efectos más específicos que los encontrados de los que derivan.

Receptor	Agonistas principales	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y₁	MRS2365 > 2MeSADP = Ap ₅ (βγ) >> ADPβS > ATP > 2MeSATP = ADP Ap ₃ A > Ap ₄ A > Ap ₅ A = Ap ₆ A >> Ap ₂ A	MRS 2500 > MRS 2279 > MRS 2179 >> Suramina > PPADS; PIT	G _q /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, tracto digestivo, células gliales
P2Y₂	2-S-UTP > UTP, MRS2698 > ATP, INS 365 > INS 37217, UTPγS > ATPγS, MRS2768, Up ₄ -fenil éster Ap ₄ A > Ap ₅ A > Ap ₆ A > Ap ₃ A	AR-C 126313 > Suramina > RB-2, PSB-716, MRS2576	G _q /G ₁₁ , G _o , G ₁₂ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Activación AC	Músculo esquelético, músculo liso, pulmón, hueso, macrófagos, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón
P2Y₄	2-N3-dUTP > UTPγS, UTP ≥ ATP ≥ Ap ₄ A, INS365; INS31217; CTP; ITP	(ATP en humano) > RB-2 > Suramina, MRS2577, PPADS	G _q /G ₁₁ , G _{i0} PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Intestino, cerebro, pituitaria, médula ósea, linfocitos, monocitos, intestino, hígado
P2Y₆	MRS 2693 > UDPβS, PBS0474 > INS 48823, Up ₃ U, fenacil-UDP >> UDP > UTP >> ATP, α,β-meUDP; IDP Ap ₅ A > Ap ₃ A (>1mM)	MRS2578 > RB-2, PPADS, MRS2567, MRS2575 (humano); Suramina	G _q /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Placenta, bazo, riñón, corazón, músculo liso, células adiposas, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y₁₁	ATPγS AR-C67085MX > BzATP ≥ ATP, NF546, NAD ⁺ , NAADP ⁺ ; 2MeSATP ----	NF157 > Suramina > RB-2, 5'-AMPs, NF340, AMP-α-5	G _q /G ₁₁ y G _s PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Activación AC	Cerebro, hígado, bazo, pituitaria, intestino, linfocito B, Células dendríticas, granulocitos
P2Y₁₂	2MeSADP = 2MeSATP >> ADP >> ATP, ADPβS	AR-C69931MX > AZD6140, INS50589 > RB-2 > 2MeSAMP, AR-C66096, CT50547, PSB0413, carbanucleósidos, MRS2395, AR-C67085; Clopidogrel; Tioclopidina; Suramina; INS49266	G _i Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro, megacariocitos
P2Y₁₃	ADP = 2MeSADP > 2MeSATP, ATP Ap ₄ A	AR-C69931MX > AR-C67085 > MRS2211, 2MeSAMP; PPADS > Suramina	G _{i0} PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Inhibición AC	Bazo, cerebro, células gliales, páncreas, médula ósea, ganglios linfáticos, hígado, corazón, hueso
P2Y₁₄	MRS2690 > UDP > UDP-glucosa > UDP-galactosa > UDP Glucurónico > UDP-N-acetilglucosamina	No conocidos	G _{i0} Activación PLC	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón

Tabla 2. Clasificación de los receptores P2Y. Los datos representados en la tabla han sido obtenidos de (Guzman-Aranguez y cols., 2007; Jacobson, 2010; Burnstock, 2014).

Receptor	Agonistas principales	Antagonistas	Desensibilización	Modulación por iones	Distribución mayoritaria
P2X1	BzATP > Lβ,γ-meATP ≥ ATP = 2-MeSATP = α,β-meATP; PAPET-ATP Ap ₆ A > Ap ₅ A > Ap ₄ A > Ap ₃ A	NF449 > IP ₅ I > TNP-ATP > RO 0437626 > NF110 > NF279, NF023, RO1; MRS2159 > PPNSD; Suramina = PPADS	Rápida	↓H ⁺ ↓Zn ²⁺ ↓Cd ²⁺	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X2	ATP ≥ ATP _γ S ≥ 2-MeSATP >> α,β-meATP > β,γ-CF ₂ meATP; BzATP Ap ₄ A	PSB-1011 > RB2 = NF279, isoPPADS > PPADS > Suramina, NF770, NF778, aminoglicosido; TNP-ATP	Lenta	↑H ⁺ ↑Zn ²⁺ ↑Cu ²⁺ ↓Ca ²⁺	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X3	2-MeSATP ≥ ATP ≥ α,β-meATP; PAPET-ATP; BzATP Ap ₃ A > Ap ₄ A > Ap ₅ A > Ap ₆ A	TNP-ATP, isoPPADS > A317491 > NF110 > PPADS, IP ₅ I, rojo fenol, RO4, RN1838, espinorfina, AF353; RO85	Rápida	↓H ⁺ ↑Zn ²⁺ ↓Ca ²⁺	Cerebro, médula espinal, ganglios simpático, neuronas sensoriales
P2X4	ATP > α,β-meATP, CTP, 2-MeSATP; BzATP Potenciación por Ivermectina, y Azul de cibacron y RB-2 Ap ₆ A > Ap ₄ A	5-BDBD >> TNP-ATP, PPADS > BBG, Paroxetina, fenoltaleína, CORM2, fluoxetina	Lenta	↓H ⁺ ↑Zn ²⁺	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X5	ATP = 2-MeSATP = ATP _γ S >> α,β-meATP; GTP Ap ₄ A > Ap ₅ A > Ap ₆ A > Ap ₃ A	BBG > PPADS > Suramina > RB-2; TNP-ATP	Lenta	↓H ⁺ ↑Zn ²⁺ ↓Ca ²⁺	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X6	Sólo como heteromultímero	Sólo como heteromultímero	----	----	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X7	BzATP >> ATP ≥ 2-MeSATP >> α,β-meATP = βγ-meATP Ap ₂ A; Ap ₃ A; Ap ₄ A; Ap ₅ A; Ap ₆ A; Ap ₅ A (>1mM)	AZ11645373; A-847227; AZ-10606120; CBB; GSK314181a; GSK1482160; Suramina, PPADS, KN-62 (no competitivos); KN-04; MRS2427; RN-6189; GSK1370319; AZ-109056; AZD-9056; CE-224535; oxATP	Lenta	↓H ⁺ / ↓Ca ²⁺ ↓Mg ²⁺ / ↓Cu ²⁺ ↓Zn ²⁺	Ganglios de reina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel

Tabla 3. Clasificación de los receptores P2X homoméricos. Los datos representados en la tabla han sido obtenidos de (North, 2002; Guzman-Aranguez y cols., 2007; Coddou y cols., 2011; Syed, 2012; Burnstock, 2014).

4.2.2.4 El receptor ionotrópico P2X7.

El receptor P2X7 se diferencia de las distintas subunidades de los receptores P2X principalmente por su largo extremo C-terminal y por su baja afinidad por el ATP (Surprenant y cols., 1996). Existen numerosos estudios acerca del papel que desempeña el largo extremo C-terminal del receptor P2X7 en la función del canal y en la formación del poro, (Klapperstuck y cols., 2001; Worthington y cols., 2002; Smart y cols., 2003).

Como ya se comentó anteriormente, uno de los receptores sobre los que puede actuar el BzATP, es el receptor homomérico P2X7, que posee características farmacológicas que se diferencian fácilmente del resto de los receptores P2X. La estimulación con agonistas durante un breve período de tiempo < 10 segundos conduce la apertura rápida y reversible del canal, permitiendo el paso de iones. Su activación prolongada provoca la apertura de un poro transmembrana, permeable a moléculas de elevado peso molecular que, finalmente conduce a la muerte celular (Di Virgilio y cols., 1998).

En primer lugar, es el receptor que presenta una menor afinidad por el agonista fisiológico ATP, rango mM, al tiempo que su afinidad por el análogo estructural BzATP es muy elevada, el valor de EC_{50ic50} de este último es 10-30 veces menor que la descrita para el ATP (North, 2002). Sin embargo, el BzATP no es agonista selectivo de los receptores P2X7, puesto que también puede activar al P2X1 y P2X3 (Bianchi y cols., 1999) y el receptor metabotrópico P2Y₁₃ en astrocitos de cerebelo de rata (Carrasquero y cols., 2009). En condiciones fisiológicas, los niveles extracelulares de ATP están en el rango picomolar o nanomolar, pero este compuesto puede ser liberado por tipos celulares, incluso por neuronas, en respuesta a cambios osmóticos, estímulos eléctricos o mecánicos o situaciones patológicas (Le Feuvre y cols., 2002; Lazarowski y cols., 2003).

Lo que también es característico de este receptor es la potenciación de sus respuestas cuando en el medio extracelular se reduce la presencia de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio (Surprenant y cols., 1996; Virginio y cols., 1997). Esto podría estar indicando que ATP^{4-} es el ligando activo de esta subunidad, o que los cationes divalentes son capaces de inhibir dicho receptor alostéricamente (Virginio y

cols., 1997). El receptor P2X7, en roedores, es insensible a concentraciones superiores a 300 μM del antagonista suramina (Chessell y cols., 1998) y sensible a PPADS.

El antagonista reversible más potente y selectivo que permite diferenciar el receptor, es el *Brilliant Blue G* (BBG) en rata 10-100 nM BBG (IC_{50} 10-15 nM), siendo la IC_{50} de 100 nM en el caso de ratón (Jiang y cols., 2000), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). En los últimos años se han desarrollado nuevos antagonistas selectivos, A740003, A438079 y A804598, entre otros (*tabla 2*), cuyo funcionamiento se ha descrito, tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore y cols., 2006) (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007). Además, se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers y cols., 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una IC_{50} en el rango nanomolar (Chen y cols., 2010). El P2X7, es igualmente sensible a PPADS y suramina (North, 2002), aunque en roedores, este último no tiene efecto alguno hasta concentraciones del orden de 300 μM .

Vías de señalización del receptor P2X7

La señalización del receptor P2X7 ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a su importancia en el sistema inmune y amplia distribución en diferentes tejidos y tipos celulares.

La activación del receptor P2X7 desencadena una serie de respuestas celulares como la liberación de citoquinas, proliferación celular o activación de caspasas y la consiguiente muerte celular (North, 2002; Verhoef y cols., 2003; Kahlenberg y Dubyak, 2004). La activación de este tipo de receptores induce la apertura del canal, originando una movilización iónica a través del mismo. Las alteraciones intracelulares de concentración de iones potasio provocan la activación de la caspasa-1 y la liberación de IL-1beta (Kahlenberg y Dubyak, 2004; Ferrari y cols., 2006). La activación de los receptores P2X7 y la consecuente entrada de calcio se ha vinculado a otras vías de señalización entre las que se incluyen NF- κ B (Ferrari y cols., 1997), GSK (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Ortega y cols., 2009; Ortega y cols., 2010) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Aga y cols., 2002; Pfeiffer y cols., 2004;

Lenertz y cols., 2009; Ortega y cols., 2011) como las proteínas JNKs y p38 (Adinolfi y cols., 2003; Aga y cols., 2004; Skaper y cols., 2010), proteínas que tienen un papel determinante en el proceso de apoptosis celular (Panenka y cols., 2001; Wang y cols., 2003a; Kong y cols., 2005), así como la cascada ERK1/2 (Humphreys y cols., 2000; Panenka y cols., 2001; Budagian y cols., 2003). Además, otra importante proteína regulada positivamente por este receptor es la fosfolipasa D (PLD) en distintos modelos de macrófagos y astrocitos (el-Moatassim y Dubyak, 1993; Humphreys y Dubyak, 1996; Sun y cols., 1999; Pochet y cols., 2003; Carrasquero y cols., 2010).

El incremento de calcio citoplasmático inducido por activación del receptor P2X7 y de los canales de calcio dependiente de voltaje, puede desencadenar la activación de numerosas vías de señalización, entre las que se encuentran las CaMKII (calcio/calmodulina quinasa) y PKCs. Es posible que los receptores P2X estén implicados en el mantenimiento de la liberación sostenida de neurotransmisores a través de una ruta dependiente de la calmodulina quinasa. Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas provocando la liberación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores (Lin y cols., 1990; Leon y cols., 2006).

Además, el receptor P2X7 puede regular los niveles de transcripción de diferentes proteínas en el núcleo. En células implicadas en la respuesta inmune, como son los macrófagos y la microglía, este receptor induce un aumento de la expresión de iNOS (Gendron y cols., 2003; Aga y cols., 2004). Es posible que este aumento de la formación de NO este mediado por NF- κ B, ya que al analizar la secuencia del promotor de iNOS se ha detectado un posible elemento de unión a dicho factor de transcripción, que puede ser activado por el receptor P2X7. Otras moléculas proinflamatorias cuyos niveles de expresión también son regulados por el receptor P2X7 son IL-4, IL-6, IL-13 (Bulanova y cols., 2005).

4.3 Señalización purinérgica en el ojo.

En el ojo, controlado por el SNC y el sistema autónomo, el ATP junto con otros nucleótidos, desempeña una importante función como neurotransmisor en la regulación de relevantes procesos neurofisiológicos. La identificación de nucleótidos y la expresión de sus receptores P2 en diferentes localizaciones en el ojo y en procesos oculares como la secreción lagrimal, humor acuoso, cicatrización corneal, regulación de la PIO o la regulación de las eferencias hacia el SNC (Mitchell y cols., 1998; Pintor y cols., 2002a; Pintor y cols., 2002b; Gendron y cols., 2003; Pintor y cols., 2003; Aga y cols., 2004; Crooke y cols., 2008; Sanderson y cols., 2014) sugiere la relevante implicación de estos compuestos en el correcto funcionamiento de diferentes estructuras oculares. En este sentido, los nucleótidos y dinucleótidos sintéticos podrían actuar como agentes terapéuticos para patologías como el ojo seco, glaucoma, y desprendimiento de retina (Crooke y cols., 2008; Guzman-Aranguez y cols., 2013).

4.3.1 Receptores purinérgicos en superficie ocular.

En la **conjuntiva**, el papel de los P2, principalmente la activación del receptor P2Y₂ aumenta la secreción de iones cloruro en conejos y regulando la secreción de mucina en humano (Jumblatt y Jumblatt, 1998) posiblemente desempeñando un función de hidratación en la estructura (Li y cols., 2001; Murakami y cols., 2004) al igual que el P2Y₄ (Hosoya y cols., 1999).

En la **glándula lagrimal**, el ATP activa los receptores P2X₃ y P2X₇ aumentando el calcio intracelular y estimulando la secreción de proteína (Hodges y cols., 2009; Novak y cols., 2010; Hodges y cols., 2011). Además, la expresión de proteínas específicas en lágrima se puede modificar por nucleótidos. Uno de los procesos fisiológicos regulados por nucleótidos extracelulares es la producción de lágrima (Murakami y cols., 2000; Pintor y cols., 2002a; Pintor y cols., 2002b) posiblemente mediado por receptores P2Y₂ (Li y cols., 2001). Además, ha sido detectada la presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima humana y de conejo (Pintor y cols., 2002a; Pintor y cols., 2002b). Diversos estudios postulan la posible liberación de los nucleótidos como consecuencia del movimiento palpebral,

produciéndose una mayor liberación de los mismos en situaciones patológicas (Peral y cols., 2006; Pintor, 2007; Carracedo y cols., 2010).

Las purinas juegan un papel regulador importante en comunicación celular y en la cicatrización de heridas en la **córnea**. La activación de los receptores purinérgicos P2Y, principalmente los P2Y₂ están involucrados en procesos de reparación de lesiones corneales, mediante agonistas purinérgicos que activan la vías de las MAP quinasas, responsables del control de la tasa de migración de células epiteliales (Klepeis y cols., 2004; Pintor y cols., 2004a; Pintor y cols., 2004c). Así como en procesos de proliferación celular de las células epiteliales corneales mediados por receptores P2Y₂ y P2Y₆ (Mediero, 2010). Por otro lado, el receptor ionotrópico P2X₇, está implicado en procesos de modulación de la integridad estructural de la córnea (Mayo y cols., 2008).

4.3.2 Receptores purinérgicos en cámara anterior.

El **humor acuoso**, se produce por los procesos ciliares y es liberado a través de la malla trabecular, canal de Schlemm's y la vena episcleral (To y cols., 2002). La presencia de nucleótidos y dinucleótidos en el humor ha sido demostrada en distintas especies (Mitchell y cols., 1998; Pintor y cols., 2003). Además se han detectado niveles incrementados de ATP y Ap₄A en pacientes glaucomatosos (Castany y cols., 2011; Li y cols., 2011) sugiriendo la implicación de estos compuestos en el glaucoma.

Los receptores P2X y P2Y han sido identificados en las principales estructuras bañadas por humor acuoso (**procesos ciliares y malla trabecular**) sugiriendo la contribución de esos receptores en funciones fisiológicas llevadas a cabo por dichas estructuras, tales como el control de la PIO.

A nivel del **cuerpo ciliar**, se ha demostrado la presencia de receptores P2Y₂. La activación de dichos receptores P2Y₂ está involucrado con el efecto hipertensor inducido por distintos nucleótidos como ATP, UTP y análogos (2-metil-tio-ATP y adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato), ATPγS) (Markovskaya y cols., 2008; Peral y cols., 2009; Martin-Gil y cols., 2012), de hecho el silenciamiento de receptor P2Y₂ mediante ARN interferente podría ser un interesante recurso terapéutico en la reducción de la PIO (Martin-Gil y cols., 2012). Asimismo, la estimulación que UDP produce en otros receptores purinérgicos como el P2Y₆ presentes en los vasos sanguíneos de los procesos

ciliares, produce vasoconstricción, disminución en la producción de humor acuoso y disminución de la PIO (Markovskaya y cols., 2008). Es importante señalar que determinados nucleótidos (α , β -me ATP y β , γ -me ATP) aplicados tópicamente tienen un efecto hipotensor sobre la PIO, facilitando la salida del HA (Peral y cols., 2009) pudiendo estar mediado por receptores P2X2 presente en las terminales colinérgicas que inervan el músculo ciliar. Además, recientemente se ha demostrado que la aplicación tópica de diadenosina polifosfatos pueden producir un aumento de la PIO (diinosina pentafofato) y otros una disminución (diinosin trifosfato y diinosin tetrafofato) en conejos normotensos (Guzman-Aranguez y cols., 2012) vía P2Y₁ y P2Y₆.

Por otro lado, la activación de receptores P2Y presentes en la **mallá trabecular**, facilita la salida del humor acuoso, produciéndose un efecto hipotensor, como sucede tras la activación de los receptores P2Y₁ (Crosson y cols., 2004; Pintor y cols., 2004c; Soto y cols., 2005; Chow y cols., 2007). Del mismo modo, la activación de P2X2 desencadena la liberación de acetilcolina, produciendo ensanchamiento del ángulo iridocorneal, aumento del drenaje del humor acuoso y reducción de la PIO (Peral y cols., 2009).

Finalmente, señalar que el **crystalino**, es una estructura que contiene grandes cantidades de nucleótidos, entre ellos ATP, ADP, y nucleótidos trifosfato (Pintor, 1999). Las células epiteliales de lentes humanas movilizan Ca²⁺ intracelular frente al ATP mediante la estimulación de receptores P2Y₂. La función que desempeñan estos receptores en la lente parece estar relacionada con el control de la división celular y la diferenciación de células epiteliales (Pintor, 1999).

4.3.3 Receptores purinérgicos en la retina.

La retina es uno de los tejidos oculares donde mayor es la abundancia de receptores purinérgicos (*tabla 4*). La gran diversidad en la presencia de estos receptores, además de la presencia de enzimas encargadas de la degradación de nucleótidos y del transportador nucleotídico vesicular (Chessell y cols., 1998; Puthussery y Fletcher, 2004; Puthussery y cols., 2006; Puthussery y Fletcher, 2007), demuestran que los nucleótidos extracelulares juegan un importante papel en la retina neural como

neuromoduladores y mediadores autocrinos y paracrinos a través de receptores P2X ionotrópicos y P1-P2 metabotrópicos.

El nucleótido más representativo de la retina de los mamíferos es el ATP, que es liberado a través de las células de Müller y, que origina la adenosina por la degradación enzimática que resulta en la activación autocrina de los receptores P1 en estas células gliales (Newman, 2003). El ATP también puede activar los receptores P2 de neuronas vecinas de la retina, como fotorreceptores, células amacrinas, y las células ganglionares (Greenwood y cols., 1997; Puthussery y cols., 2006; Kaneda y cols., 2008). También ha sido detectada la co-liberación de ATP junto con acetilcolina en células amacrinas colinérgicas (Neal y Cunningham, 1994), así como el ATP también puede ser liberado de las células epiteliales pigmentadas de la retina y puede activar los receptores P2 de las membranas de los fotorreceptores (Mitchell y Reigada, 2008).

El estudio histológico de los receptores P2X con marcadores neuronales de retina ha proporcionado una valiosa información respecto a la posible implicación de los receptores purinérgicos en la señalización de la retina. Se ha demostrado la co-localización de los receptores P2X2, P2X3 y P2X7 con GABA en células amacrinas, pudiendo sugerir la implicación de los receptores P2X2 en la modulación del procesamiento de la información por dichas células (Puthussery y Fletcher, 2004; Puthussery y cols., 2006; Puthussery y Fletcher, 2007; Kaneda y cols., 2010). Así como, los receptores P2X3 y P2X7 han sido también inmunolocalizados en la capa plexiforme externa. Diferentes estudios realizados, han demostrado como la activación del receptor P2X7 mediante un agonista selectivo aumenta la amplitud de la onda a (Puthussery y Fletcher, 2004).

Además de estar implicado en la regulación de procesos fisiológicos de la retina, el receptor P2X7 media en procesos fisiopatológicos a través de diferentes vías de señalización intracelular.

RECEPTOR P2	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIAS
Fotorreceptores			
P2X2	Rata	No determinada	(Greenwood y cols., 1997)
P2X7	Ratón, rata y tití	Modulación de transmisión sináptica	(Franke y cols., 2005; Puthussery y cols., 2006; Notomi y cols., 2011)
P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆	Conejo, rata y macaco	No determinada	(Cowlen y cols., 2003; Fries y cols., 2004a; Pintor y cols., 2004c)
Células bipolares			
P2X3, P2X4, P2X5	Rata	No determinada	(Wheeler-Schilling y cols., 2000)
P2X7	Ratón y rata	Modulación de transmisión sináptica	(Vessey y Fletcher, 2012)
P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₆	Rata	No determinada	(Fries y cols., 2004b)
P2Y ₄	Rata	Modulación de transmisión sináptica	(Ward y cols., 2008)
Células horizontales (CH)			
P2X7	Ratón y rata	Modulación de transmisión sináptica	(Vessey y Fletcher, 2012)
Células amacrinas (CA)			
P2X1, P2X3, P2X4, P2X5	Ratón y rata	No determinada	(Wheeler-Schilling y cols., 2001; Yazulla y Studholme, 2004; Puthussery y Fletcher, 2007; Shigematsu y cols., 2007)
P2X2	Ratón	Inhibición de la liberación de Ach CA colinérgicas (OFF)	(Kaneda y cols., 2004; Puthussery y cols., 2006; Kaneda y cols., 2008; Kaneda y cols., 2010)
P2X7	Ratón	Transmisión sináptica	(Vessey y Fletcher, 2012)
Células ganglionares (CG)			
P2X2, P2X3, P2X4, P2X5	Rata	No determinada	(Greenwood y cols., 1997; Brandle y cols., 1998; Wheeler-Schilling y cols., 2001; Puthussery y cols., 2006)
P2X7	Ratón	Incremento de la [Ca ²⁺] _i	(Brandle y cols., 1998; Franke y cols., 2005; Zhang y cols., 2006; Reigada y cols., 2008; Mitchell y cols., 2009; Hu y cols., 2010; Vessey y Fletcher, 2012)
P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆	Conejo, rata y macaco	No determinada	(Cowlen y cols., 2003; Fries y cols., 2004a)
Astrocitos y células de Müller			
P2X7	Humano	Incremento de la síntesis de ADN	(Pannicke y cols., 2000; Bringmann y cols., 2001)
P2Y ₂	Cobaya	Incremento de la síntesis de ADN	(Moll y cols., 2002; Milenkovic y cols., 2003)

Tabla 4. Expresión de los receptores purinérgicos en la retina.

Apoptosis neuronal

Las enfermedades retinianas hereditarias causan aumento de los niveles extracelulares de ATP que pueden originar la apoptosis de los fotorreceptores. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de los receptores P2X7 en los fotorreceptores en un modelo de retinitis pigmentosa media la apoptosis de los mismos (Franke y cols., 2005). Estos resultados implican que los receptores P2X7 tienen un papel en la regulación de la función de los fotorreceptores. Por otra parte, la aplicación de inyecciones intravítreas de ATP mostraron una rápida pérdida de fotorreceptores, cuyo efecto puede ser revertido mediante co-inyección con antagonistas P2X, PPADS y BBG (Franke y cols., 2005; Puthussery y Fletcher, 2009; Notomi y cols., 2011), de modo que la expresión de los receptores P2X7 en los fotorreceptores podrían tener importantes aplicaciones de integridad de los mismos.

Además del papel del receptor P2X7 en la apoptosis selectiva de los fotorreceptores, numerosos estudios se han centrado en analizar el papel de este receptor en la apoptosis de las CGR (Zhang y cols., 2005; Zhang y cols., 2006). En estudios in vitro se ha demostrado que el ATP desencadena la apoptosis de las células ganglionares a través de la activación del receptor P2X7 (Zhang y cols., 2005). Por otra parte, la hipoxia y el aumento agudo de presión hidrostática inducen la muerte de las células ganglionares de la retina debido al aumento de ATP extracelular, que activa P2X7 (Resta y cols., 2007; Sugiyama y cols., 2010) a diferencia de lo encontrado cuando se bloquea dicho receptor con BBG (Resta y cols., 2007).

Regulación del volumen y proliferación de las células de Müller

Por otra parte, también ha sido posible demostrar las funciones que ejercen otros receptores de tipo P2Y en las células de Müller. Los receptores P2Y están involucrados en la regulación del volumen celular de las células de Müller probablemente a través de la activación de los receptores P2Y₄ y P2Y₆ (Uckermann y cols., 2006; Iandiev y cols., 2007; Wurm y cols., 2010). Así como también la señalización autocrina vía P2Y₁ contribuye a la homeostasis del volumen de espacio extracelular. Por lo tanto, estos receptores pueden ser interesantes como dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de la retina acompañada de procesos isquémicos o hipóxicos. Además, se

ha demostrado en cobaya el efecto mitogénico del ATP en las células de Müller mediante activación de receptores P2Y (Moll y cols., 2002; Milenkovic y cols., 2003).

Regulación de los pericitos de la retina

El ATP actúa como una molécula vasoactiva en la regulación de la función de los pericitos ubicados en los microvasos de la retina de rata (Kawamura y cols., 2003) y conejo (Sugiyama y cols., 2006). El ATP, mediante la activación del receptor P2X7 actúa como un vasoconstrictor disminuyendo la velocidad de la sangre del sistema vascular de la retina. Un efecto similar sucede cuando se induce la estimulación del receptor P2Y₄ mediante UTP originando contracciones de los pericitos retinianos (Kawamura y cols., 2003). Además, se ha demostrado en un modelo de retinopatía diabética que la vasotoxicidad originada por ATP podría ser mejorada mediante la inhibición mediada por el receptor P2Y₄ (Sugiyama y cols., 2005) disminuyendo la muerte de los pericitos vía activación P2X7.

Desprendimiento de retina. Epitelio pigmentado de la retina

Las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) pueden liberar ATP al espacio subretinal y actuar como una señal de autocrina o paracrina mediante la estimulación de los receptores P2 (Mitchell, 2001; Eldred y cols., 2003; Reigada y cols., 2005). Los efectos del ATP, ADP, UTP están mediados a través de diferentes receptores P2 en células del EPR. Por otra parte, ATP y UTP puede desencadenar la liberación de ATP por células del EPR, actuando así como amplificadores de señal (Mitchell, 2001; Reigada y cols., 2005). Por otro lado, se ha demostrado la expresión de ectonucleotidasas en células humanas ARPE-19 (Reigada y cols., 2005; Mitchell y Reigada, 2008). Estas enzimas están implicadas en la degradación de ATP a ADP, cuyos efectos están mediados por los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ (Reigada y cols., 2005), posiblemente implicadas en la regulación del equilibrio de los niveles de nucleótidos en el espacio subretinal.

En el desprendimiento de retina, se produce una desregulación transepitelial de nutrientes, agua e iones, acumulándose en el espacio subretiniano, La activación de P2Y₂, mediante ATP o UTP, produce regulación del flujo de fluidos en la dirección apical a la baso-lateral en monocapas de EPR en un modelo bovino (Peterson y cols.,

1997) y de rata (Maminishkis y cols., 2002). De hecho, la realización de inyecciones intravítreas con INS37217, agonista de P2Y₂, mejoran la reabsorción del fluido y la inserción de la retina en modelos degenerativos de retina con conejo y rata (Maminishkis y cols., 2002; Meyer y cols., 2002). Por lo que dicho receptor podría establecerse como una posible diana terapéutica en esta patología ocular.

El receptor P2X7 en el glaucoma

Como ya se comentó anteriormente, las CGR expresan múltiples receptores P2 y receptores de adenosina. La presencia de los receptores purinérgicos en condiciones no patológicas, pone de manifiesto la participación de éstos en funciones fisiológicas de la retina. Sin embargo, la activación de algunos de estos receptores está implicada en procesos de neurodegeneración.

La presencia del receptor P2X7 se ha demostrado en diferentes tipos neuronales de la retina en roedores y primates (Wheeler-Schilling y cols., 2001; Ishii y cols., 2003; Puthussery y Fletcher, 2004; Puthussery y cols., 2006; Vessey y Fletcher, 2012), células microgliales (Franke y cols., 2005; Vessey y Fletcher, 2012) y en los astrocitos (Vessey y Fletcher, 2012). El receptor P2X7 se expresa en diferentes capas de la retina y se ha implicado en las enfermedades neurodegenerativas incluyendo reacciones neuroinmunes y procesos neuroinflamatorios (Skaper y cols., 2010; Weisman y cols., 2012; Catanzaro y cols., 2014). Los estudios electrofisiológicos, farmacológicos e inmunológicos evidencian la presencia y el papel de los receptores P2X7 también en funciones neuronales. La estimulación de los receptores P2X7 con el agonista BzATP induce la muerte de CGR mediante un aumento de calcio intracelular y la activación de caspasas (Zhang y cols., 2005), mientras que inyecciones intravítreas de BzATP originan la muerte celular de las mismas *in vivo* (Hu y cols., 2010). En ambos casos, el antagonismo del receptor revierte la muerte neuronal. Recientemente, se demostró la muerte de las CGR mediada por el receptor P2X7 en un modelo de sección de nervio óptico (Kakurai y cols., 2013) y en explantes de retina humana (Niyadurupola y cols., 2011; Niyadurupola y cols., 2013). Además, el antagonismo de los receptores P2X7 disminuyó la muerte de CGR desencadenada por isquemia inducida (privación de oxígeno y glucosa) en un modelo de explante de retina humana (Niyadurupola y cols.,

2013). Esto sugiere que el estrés metabólico da lugar a la liberación de ATP pudiendo desencadenar la excitotoxicidad mediada por la activación del receptor P2X7.

Hay numerosos estudios que vinculan la activación de este receptor con la expresión de citoquinas inflamatorias. La aplicación de agonistas del receptor P2X7 aumentan la liberación de interleuquina IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral TNF- α , este aumento podría estar relacionado con la muerte de CGR, cuando los receptores P2X7 están incrementados por un aumento en la PIO (Sugiyama y cols., 2013).

Por otro lado, se ha demostrado como la adenosina producida por la defosforilación del ATP extracelular puede equilibrar los efectos patológicos del receptor P2X7 en CGR. La adenosina modula directamente la función de las CGR y confiere neuroprotección general a través de los receptores A1 (Hartwick y cols., 2004), a través de los receptores de adenosina A3, para prevenir el daño inducido por el receptor P2X7 (Zhang y cols., 2006).

5. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas o MAPKs) son una familia de serina-treonina quinasas altamente conservadas que se encargan de transmitir señales generadas por distintos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas o estrés. De esta forma, regulan numerosos procesos celulares como la supervivencia, proliferación, diferenciación, respuestas metabólicas y procesos celulares involucrados en la regulación de la homeostasis del organismo, entre otros (Nebreda y Porras, 2000; Cuenda y Rousseau, 2007). Sin embargo, la desregulación de la actividad de las MAP quinasas, está implicada en diferentes procesos patológicos entre los que se incluyen la inflamación, diferenciación, respuesta al estrés y apoptosis.

La activación de las MAPKs compromete una cascada de fosforilaciones que se inician por estímulos extracelulares que inciden a través de receptores específicos, y transmiten la señal a distintos tipos de mediadores intracelulares que se van activando mediante procesos de fosforilación de manera secuencial (MAPKKK \rightarrow MAPKK \rightarrow MAPK) hasta que, finalmente activan a sus dianas por

fosforilación dual en una treonina y una tirosina (Cohen y cols., 1997; English y cols., 1999). Sus sustratos son tanto sustratos citosólicos como nucleares, entre éstos últimos se incluyen importantes factores de transcripción, y de esta manera impactan en el programa genético celular y el control de decisiones.

La superfamilia de las MAPKs puede, a su vez, subdividirse en varias familias:

- ERKs (“Extracellular Signals Regulated Kinases”): activadas en respuesta a mitógenos y factores de crecimiento y otras señales extracelulares (ésteres de forbol), regulan procesos de proliferación y diferenciación. Se activan por MEK1/2 (Raman y cols., 2007).

- MAPKs de estrés, que engloban a dos familias: los estímulos de estrés y procesos inflamatorios constituye el principal desencadenante de las siguientes subfamilias que están involucradas en el balance supervivencia/apoptosis o diferenciación.

JNKs (C-Jun N-terminal Kinases”). Activadas por MKK 4/7 (Weston y Davis, 2007).

p38 MAPKs. Son activadas por MKK3/6/4 (Cuenda y Rousseau, 2007; Raman y cols., 2007).

-Familia de ERK5, juega un papel en el músculo y se activa por MEK5 en respuesta a EGF.

-Familia de las MAPK atípicas, englobaría MAPK menos conocidas: Familia ERK3/4, NLK, ERK7, ERK8 (Bogoyevitch y Court, 2004; Coulombe y Meloche, 2007).

A continuación, se detallarán dos de los miembros de la familia de las MAPK, estudiadas a lo largo del trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral.

5.1 Proteínas p38-MAPK (MAP quinasas p38).

Las p38 MAPKs (α , β , γ , δ) pueden ser activadas en respuesta a una gran variedad de estímulos de estrés (cambios en la osmolaridad, radiación UV, agentes patógenos, estrés oxidativo, hipoxia, etc) y citoquinas pro-inflamatorias. (TNF- α o

IL1). No obstante, también pueden ser activadas por otros tipos de estímulos, incluidos los factores de crecimiento.

La cascada principal de activación de las p38 MAPKs está formada por las siguientes quinasas: las MAPKKKs que incluyen la familia de las MEK quinasas principalmente la MEKK1-4, MTK1, MLK3, la quinasa reguladora de apoptosis ASK1 y la TGF- β quinasa 1 (TAK-1), cuya actividad viene determinada por los distintos tipos de estímulos, como es el caso de MTK1, que sólo podría mediar en la señalización inducida por estrés y no por citoquinas. Una vez que las MAPKKKs están activas fosforilan en residuos de serina y treonina a la MEK3 y a la MEK6 (MAPKKs), que van a ser del tipo MKK6 y MKK3. Cabe resaltar que ambas MAPKKs no ofrecen las mismas funciones atribuidas a la p38-MAPK. Por ejemplo, se ha visto que en la apoptosis de células T se requiere la actividad de MKK3 pero no así la de MKK6 (Tanaka y cols., 2002). Distintos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que aunque MKK4 activa preferentemente a la JNK, también es capaz de contribuir a la activación de p38-MAPK (Jiang y cols., 1997; Brancho y cols., 2003). Las proteínas p38-MAPK activas fosforilan a un gran número de sustratos celulares, entre ellos los factores de transcripción como *ATF-2*, *CHOP-1*, *CREB*, *MEF-2*, *p53* y *Elk1* participando de esta forma en la regulación transcripcional necesaria para llevar a cabo la respuesta celular a estímulos de estrés (Takeda y Ichijo, 2002). Además, también fosforilan proteínas quinasas MNK (MNK1 y MNK2), MSK1, PRAK, MAPKAPK-2/3/5.

La ruta de señalización de las p38 MAPKs está implicada en numerosas funciones celulares como son las repuestas al estrés, apoptosis, proliferación, diferenciación, migración y otros procesos implicados en el desarrollo (Nebreda y Porras, 2000; Ono y Han, 2000). Por otro lado, en función del tipo celular y del estímulo, estas quinasas pueden llegar a ejercer efectos opuestos, induciendo o inhibiendo la apoptosis (Liu y cols., 2001; Porras y cols., 2004).

5.2 Proteínas JNK (quinasas c-Jun N-terminal).

Esta proteína quinasa se denominó proteína quinasa activada por estrés (SAPK) debido a que se activaba por estímulos nocivos como el calor, radiación, estrés oxidativos, citoquinas, agentes que dañan ADN e inhibidores de la síntesis de proteínas,

como la anisomicina y la cicloheximida (Kyriakis y Avruch, 2001). Además también se la conoce como JNK porque fosforila el dominio N-terminal de transactivación del factor de transcripción *c-Jun* (Hibi y cols., 1993). El grupo de proteínas JNK está formado por diez o más isoformas de las que están bien caracterizadas las JNK1, 2 y 3.

Al igual que en el caso de las p38, su vía de señalización es activada iniciándose a partir de la activación de proteínas MAPKKKs, como ASK1, HPK1, MLK-3, MKKK1-4, TAK-1 y TPL-2, las cuales fosforilan a las MAPKKs denominadas MKK4 y MKK7, que son las que finalmente activan a las proteínas JNK. La ruta de las JNKs también está regulada por proteínas “*scaffold*” tales como JIP, β -arrestina y JSAP1 (McDonald y cols., 2000). Una vez activas las JNKs pueden fosforilar a diferentes proteínas nucleares y citoplasmáticas. El principal sustrato de las JNKs es el factor de transcripción inducible *c-Jun*, aunque también puede activar otros como *ATF-2*, *Elk-1*, *MEF-2c*, *p53*, *STAT3* y *c-Myc*, así como sustratos no transcripcionales, entre los que se encuentran proteínas del citoesqueleto, a Bim, a Bcl-2 y Bcl-xL y al receptor de glucocorticoides (Davis, 2000).

La ruta de señalización de las JNKs participa en muchos procesos celulares logrando mediar en funciones como proliferación celular (Zhang y Liu, 2002), supervivencia o respuesta inmune, entre otras. En el sistema nervioso, las JNKs han sido consideradas principalmente activadoras de la apoptosis dependiendo de las condiciones celulares y del tipo de estímulo. Además las JNKs pueden incrementar la fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos Tau, lo que parece ser uno de los fenómenos típicos en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Reynolds y cols., 1997). Por otro lado, las JNKs fosforilan las cadenas pesadas de neurofilamentos con el consiguiente incremento de la vulnerabilidad al estrés de las neuronas (Giasson y Mushynski, 1997).

6. MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.

A principios de los años 70, Kerr, Wyllie y Curie observaron un tipo de muerte celular morfológicamente distinta a la muerte celular por necrosis, a la que denominaron apoptosis (Kerr y cols., 1972; Wyllie y cols., 1980). La apoptosis se caracteriza por una serie de alteraciones secuenciales que tienen lugar en un periodo de tiempo más largo y,

que afecta únicamente a cada célula individual. A diferencia de la necrosis, el término apoptosis, no implica una pérdida de la integridad de la membrana celular, componentes subcelulares y nucleares, sino que se lleva a cabo a través de cambios morfológicos diferentes. Posteriormente, este tipo de muerte celular se englobó dentro de la denominada “muerte celular programada” *PCD*, proceso que implicaba la participación activa de los componentes de la célula en su muerte, sin implicar que se desencadenen todos los cambios morfológicos descritos en el proceso apoptótico.

La función principal de la apoptosis es la eliminación selectiva de una célula, evitando, el daño a las células adyacentes. Por este motivo, una de las características inherentes a este tipo de muerte celular es el mantenimiento íntegro de la membrana plasmática hasta estados avanzados de daño celular. Durante el proceso de apoptosis, se produce la condensación citoplasmática y la célula reduce su volumen celular debido a la inhibición del sistema de co-transporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (Okada y Maeno, 2001). Además, este proceso va ligado a una serie de alteraciones bioquímicas que involucran la externalización de la fosfatidilserina, presente en la cara interna de la membrana plasmática. De este modo, la célula será reconocible por los macrófagos.

Otro rasgo distintivo de la apoptosis es la condensación y posterior fragmentación nuclear del ADN en fragmentos oligonucleosomales, eliminando la posibilidad de replicación celular. Sin embargo, el evento bioquímico más relevante observado durante la apoptosis es la activación (mediante ruptura específica) de un conjunto de proteínas, la familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas. Se encargan del desmantelamiento celular y la generación de invaginaciones de la membrana plasmática dando lugar a los denominados, cuerpos apoptóticos que contienen restos citoplasmáticos. Posteriormente, serán fagocitados macrófagos impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria que dañe a las células más cercanas. Esta característica es fundamental para evitar el daño tisular que originaría la liberación al medio extracelular del contenido citoplasmático de las células que mueren durante la vida del ser humano.

La apoptosis desempeña un papel crucial durante el desarrollo embrionario, especialmente en el desarrollo del sistema nervioso produciéndose *la muerte neuronal fisiológica* de poblaciones celulares (Wyllie, 1988). En el organismo adulto, una

activación inapropiada de la apoptosis contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple o la esclerosis lateral amiotrófica, así como a varias formas de degeneración cerebelar, atrofia muscular espinal y la enfermedad de Alzheimer (Barinaga, 1993). Por el contrario una resistencia celular a la apoptosis es una de las características que contribuyen a la generación de tumores y también puede ser la causa de algunas enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, el balance entre los mecanismos de activación e inhibición de las caspasas juegan un papel importante en el desarrollo de patologías.

Existen tres rutas de inducción de la apoptosis: la vía de los receptores de muerte, la vía mitocondrial y la ruta por estrés del retículo endoplasmático, que en muchos casos convergen en la mitocondria. Los efectores (ausencia de factores de crecimiento, ligandos específicos, daños en el ADN o cambios en la concentración de calcio intra o extracelular, entre otros) actuarán en un punto específico de las distintas vías de transducción, implicando un daño celular irreparable, al que la célula responde con el inicio del proceso apoptótico.

6.1 Las caspasas.

Las caspasas (cisteín aspartato proteasas) son proteasas que producen cortes en proteínas después de un residuo aspártico, y tienen un centro activo muy conservado. Se pueden dividir en caspasas iniciadoras o efectoras. Las iniciadoras (caspasas 8 y 9) son las primeras en activarse y actúan sobre las formas inactivas de las caspasas efectoras (como la caspasa-3). Las caspasas actúan en cascada y como sustrato final tienen a proteínas que van a producir cambios morfológicos de muerte celular (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (pro-enzimas inactivos) y necesitan una activación proteolítica. Están formadas por un prodominio N-terminal seguido de una subunidad larga p20 (17-21 kDa) y otra corta p10 (10-13 kDa). La activación supone un corte entre la subunidad larga y la pequeña y la eliminación del pre-dominio, lo cual da como resultado una enzima activa heterodimérica. Esto heterodímeros se asocian para formar tetrámeros como en el caso de la caspasa-3 (Wilson y cols., 1994; Rotonda y cols., 1996). Mediante este dominio se produce la

unión de las pro-caspasas a los receptores de muerte para el ensamblaje de complejos activadores de caspasas, por tanto, este dominio regula su actividad y además sirve para la homodimerización.

Estas proteasas son responsables entre otras cosas, de la inactivación de las proteínas del citoesqueleto, la eliminación de contactos celulares, el desmantelamiento de la lámina nuclear, la inhibición de la replicación y de las señales de supervivencia o la activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del ADN.



OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

En el desarrollo de esta tesis doctoral, se han tenido en cuenta resultados de estudios previos realizados, a partir de los cuales, se establecieron objetivos específicos para poder dilucidar posibles bases moleculares implicadas en el proceso de neurodegeneración de la retina en el modelo de glaucoma del ratón DBA/2J. Schlamp (2006) y Buckingham (2008), describieron el daño axonal y, la concomitante muerte de las células ganglionares de la retina, sosteniendo un posible déficit funcional (Nagaraju y cols., 2007; Porciatti y cols., 2007; Heiduschka y cols., 2010). Por otro lado, diferentes autores (Zhang y cols., 2005; Agudo y cols., 2009) demostraron en diferentes modelos de glaucoma que la muerte celular originada en esta población neuronal se producía mediante la activación de un proceso apoptótico.

La hipótesis general llevada a cabo durante la presente tesis doctoral, consistió en determinar si el receptor P2X7 estaba involucrado en el proceso fisiológico de muerte celular de un modelo de glaucoma y, los mecanismos involucrados en el mismo. Para ello, se realizó previamente una caracterización funcional y molecular del modelo animal. Además, se evaluó si la degeneración retiniana durante el progreso de la patología podía ser atenuada por antagonismo de dicho receptor.

Para la consecución de la misma se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar funcionalmente la retina de un modelo murino de glaucoma: El ratón DBA/2J.

Inicialmente, para poder estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de muerte celular se llevará a cabo la caracterización electrofisiológica de la retina del ratón glaucomatoso. Para ello, se realizará un seguimiento de la evolución de la patología.

2. Determinar los niveles de nucleótidos en el glaucoma.

Una vez establecido el intervalo temporal en el cual se produce la disfunción retiniana, se evaluarán los niveles de ATP y Ap₄A como parte del estudio de la neurotransmisión mediada por el mismo.

3. Caracterizar a nivel molecular la retina del ratón DBA/2J.

Además de la evaluación de los niveles de nucleótidos en el modelo animal, se analizarán diferentes marcadores neuronales en las retinas glaucomatosas. Así como se caracterizarán la expresión del receptor P2X7, el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) y la ecto-fosfodiesterasa (NPP1).

4. Identificar morfológicamente la muerte de las células ganglionares de la retina.

Se analizará la población neuronal afectada por el desarrollo de la degeneración glaucomatosa y su distribución.

5. Caracterizar el proceso de muerte celular y su regulación durante la neurodegeneración retiniana en estudios “*in vivo*” e “*in vitro*”. Implicación del receptor P2X7.

Se estudiarán las posibles vías de señalización intracelular, desencadenadas por activación del receptor P2X7, involucradas en el proceso de muerte celular programada.

6. Analizar el antagonismo del receptor P2X7 sobre la degeneración de la retina “*in vivo* e “*in vitro*”.

En este punto del desarrollo experimental, se intentará vincular la implicación del receptor P2X7 como mediador de la muerte celular de las CG. Si es así, se comprobará que el antagonismo del receptor podría revertir la situación y, determinar en qué medida.

7. Realizar un estudio comparativo de un modelo de enfermedad de Alzheimer con la degeneración glaucomatosa.

Tal y como había descrito previamente Goldblum (2007), se establecerá como objetivo final analizar algunos de los puntos anteriormente estudiados en el modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer.



**MATERIAL
Y MÉTODOS**

MATERIAL

1. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.

A continuación, se muestran los reactivos utilizados, así como las casas comerciales, en base a las diferentes técnicas llevadas a cabo para la experimentación del presente trabajo.

CATEGORIA Y USO	PRODUCTO	MODELO (casa comercial)
Anestesia	Ketamina (Ketamidor [®] , 100 mg/ml) Pentobarbital sódico (Dolethal [®] , 200 mg/ml) Hidrocloruro de Xylacina (Rompun [®]) 2%	Richter pharma Vétoquinol Bayer
Actividad enzimática	Caspase-3 Fluorescence Assay	Cayman
Citometría	Muse [™] Caspase-3/7	Millipore
Cultivos	Alcohol isopropilico (2-propanol) Aminoácidos, NaHCO ₃ , DMEM, DMSO, EDTA , Glucosa, L-glutamina, MEM Vitaminas Gentamicina, Tripsina Suero de ternera	Merck Sigma-Aldrich Life Technologies Hyclone
Ensayos viabilidad	MTT	Sigma-Aldrich
ERG	Methocel 2 % Tropicamida (Colircusi tropicamidar [®] 1%)	Novartis Culircusi, Alcon Cusi
Farmacología		
Agonistas purinérgicos	ATP, AP ₄ A, BzATP, UTP	Sigma-Aldrich
Antagonistas	A438079, BBG	Sigma-Aldrich
HPLC	Acetonitrilo TCA, KCl, KOH KH ₂ PO ₄ TBA Suramina	Scharlau Panreac Merck Sigma-Aldrich Tocris
Inmunoblot (WB)		
Extracción y cuantificación	Aprotinina, leupeptina; NaF; Na ₃ VO ₄ ; pepstatina A; PSA; PMSF; SDS. Reactivo de Bradford BSA, BCA protein assay Kit, Halt Protease Inhibitor Cocktail Plus NP-40 [™]	Sigma-Aldrich Bio -Rad Thermo Scientific Fluka Bio -Rad
Electroforesis y transferencia	Acrilamida-bis-acrilamida, β-mercaptoetanol, patrones de peso molecular conocido, leche (Blotting Grade Blocker), Temed Membranas de nitrocelulosa, Reactivos de detección quimiluminiscente, películas autorradiografía Metanol, Tween-20 Persulfato amónico, azul de bromofenol, glicina; trizma base, SDS, Glicina	Amersham Merck Sigma-Aldrich

Inmunodetección (ELISA)	Kit P38 alpha (Thr180/Tyr182) In-cell	Abcam
	Kit JNK alpha (Thr183/Tyr185) In-cell	Abcam
Inmunohistoquímica	Ioduro de propidio; <i>p</i> -formaldehído, Tritón™ X-100	Sigma-Aldrich
	Medio de montaje <i>Vectashield</i>	Vector Lab
	Sacarosa	Merck
	Suero de burro; suero de cabra Tissue-Tek®. O.C.T.™ Compound	Jackson Sakura
PCR	Agarosa	BioTools
	Agua para Biología Molecular, Bromuro de Etidio	Sigma
Genotipado	Advantage®2 PCR Enzyme System	Clontech
	GenraPuregene Mouse kit	Quiagen
	Primers	Sigma
	Gen Ruler™ 100bp DNA ladder, Orange Loading Dye 6x	Fermentas, Life Sciences
Expresión mARN	RNAlater, Rnase Zap	Ambion
	Ribogreen® RNA Quantitativon reagent and kit	Molecular Probes
	Superscript™III First-Strand Syses System for RT-PCR	Invitrogen (Life Technologies)
	Total RNA and Protein Isolation Nucleospin® RNA	Macherey-Nagel
Marcaje retrógrado	Trazador neuronal fluorescente (OHSt)	Molecular Probes

Tabla I. Relación de los principales reactivos y compuesto químicos utilizados.

1.1 Soluciones generales y tampones.

Los medios de cultivo, tampones y disoluciones generales se prepararon en agua desionizada de alta calidad y pureza obtenida con un equipo de filtración Milli-Q Water Purification System de Millipore. Las soluciones o muestras que debían mantenerse a 4°C, -20° y -80° C se conservaron en frigoríficos Daewoo, Liebehrr y Bosch. A continuación, se muestra una tabla correspondiente a soluciones generales. Los tampones específicos para técnicas que requieren un mayor detalle se mostrarán a lo largo del desarrollo de las mismas (*ver secciones más adelante*).

TAMPONES	COMPOSICIÓN
PBS 10 X pH 7.3	NaCl (1.37 mM); KCl (26.8 mM); Na ₂ HPO ₄ (81 mM)
TBS 10 X pH 7.6	Trizma HCl (0.2M); NaCl (1.369 M), HCl 37%
Ringer pH 7.4	NaCl (135 mM); KCl (5 mM); MgCl ₂ (1 mM); CaCl ₂ (1 mM); HEPES (10 Mm); Glucosa (10 mM)
Locke 7.4	NaCl (140 mM); KCl (4.7 mM); CaCl ₂ (2.5 mM); MgSO ₄ (1.2 mM); KH ₂ PO ₄ (1.2 mM); HEPES (10 Mm); Glucosa (5.5 mM)
DMEM	NaHCO ₃ (27 mM), Suero de ternera (10%), aminoácidos (1%), MEM vitaminas (1%), L-glutamina (2 mM), gentamicina (0.21 mM)
CMF	NaCl (150 mM), Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O (2.25 mM), KCl (2.68 mM), KH ₂ PO ₄ (1.47 mM), NaHCO ₃ (25.95 mM)
CMF-EDTA	EDTA (0.68 mM), glucosa (5.55 mM), gentamicina (0.1mM)
PFA 4% en PB	4% PFA en PB; PB (36% Na ₂ HPO ₄ 0.2 (M); 14% NaHPO ₄ 0.2 (M)
TAE	Tris-acetato 0.04 (M); EDTA 0.001(M)
Medio montaje (Montajes a plano)	Na ₂ CO ₃ 0.1 (M) pH 9; Fenilendiamina 0.04%
Sacarosa 33%	33% Sacarosa en PBS1x

Tabla II. Soluciones y tampones generales.

2. INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPAMIENTO.

2.1 General.

A continuación, se muestran la instrumentación necesaria y/o equipamiento especificados dentro de cada una de las metodologías empleadas a lo largo del trabajo de investigación llevado a cabo.

CATEGORÍA Y USO	INSTRUMENTACIÓN	MODELO (CASA COMERCIAL)
Instrumentación general	Agitador de balanceo	Sky Line S-4 (Biogen)
	Balanza de precisión	A5100 (Mettler)
	Calentador termobloque	Labnet
	Centrífugas mesa	Heraeus Biofuge
	Centrífuga refrigerada	Kubota 6500 (Kubota)
	Estereomicroscopio	CL 1500 ECO (Zeiss)
	Lámpara de hendidura Topcon	SL-8Z (Topcon)
	Lector de Placas	Power Wave XS2 (Biotek)
	Microfuga	Labnet
	pHmetro	GLP-21 (Crison)
	Pipetas automáticas	Eppendorf/Gilson
	Tonómetro de rebote Tonolab	Tiolat Oy
	Sonicador ultrasónico	Selecta
	Vórtex	Heidolph
Citometría	Muse™ Cell Analyzer	Millipore
Cultivos celulares	Autoclave	Trade Raypa
	Baño termostatzado	Bunsen
	Botellas F25-75	Cultek
	Cámara Neubauer	Brand GMBH (Nessler)
	Campana flujo laminar horiz	Heraeus
	Contenedor congelación celulas	Nalgene
	Filtros Acrocap 0.20 um	Pall Corporation
	Incubador	Heracell (Heraeus)
	Jeringas esteriles	BD Plastipak
	Pipetas de aspiración	Cultek
	Placas 1,6,24, 96 pocillos	ThermoFisher Scientific
ERG	Amplificador	CPS11 AC (Grass Instruments)
	Electrodo de registro Burién-Allen	Hansen Ophthalmic Development
	Fuente alimentación	CIBERTEC
	Fotómetro Mavo Monitor USB	Gossen
	LEDs	RS-Amidata
	Manta calefactora	Phelton Shepherd
Expresión génica	Cubeta	Horizontal Mini Enduro 96-11 (Biogen)
	Fuente	PowerPac (Biogen)
	Lector de placas fluorescencia	Fluoroskan Ascent FL (Thermo)
HPLC	Termociclador	Mastercycler (Eppendor)
	Bomba flujo isocrático	1515 (Waters)
	Columna C18 (5 µm)	Hyperchrome (Scharlau)
	Cubreobjetos	Marienfeld GmbH&Co
	Espectrofotómetro UV-VIS	2487 (Waters)
	Jeringas Hamilton	SGE Analytical Science
	Precolumna (5 µm)	Kromaphase (Scharlau)
Microfluorimetría	Cámara perfusión	RC-20H (Warner Instruments)
	Cámara ORCA-ER	C47 42-80 Hamatmasu
	Microscopio epifluorescencia	TE-200 Nikon

Técnicas inmunológicas

Inmunofluorescencia	Cámara Criostato Microscopio de fluorescencia	Axiocam ICc1 (Zeiss) CM1850 (Leica) Zeiss Axiovert 200M LSM 5 Pascal (Zeiss)
	Portas y cubreobjetos	Thermo Scientific/Menzel- Gläser
Inmunotrasferencia	Pellet Pestle Sistema de electroforesis Sistema de transferencia	Motor Cordless (Kimble Chase) Mini protean [®] 3 Cell (Bio-Rad) Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell
	Equipo densitometrado	Gel Logic 200 ImaginG System (Kodak)
	Marcaje retrógrado	Fresadora Bomba de vacío Esponja de gelatina Microscopio quirúrgico Microscopio de fluorescencia

Tabla III. Relación de instrumentación y equipamiento general utilizado.**2.2 Electrofisiología.**

Los experimentos de registro para la detección de la actividad funcional de la retina se realizaron mediante la técnica de Electrorretinograma de campo completo (*ver apartado 6 de Métodos*). Dicha técnica proporciona el registro gráfico de la respuesta eléctrica generada por diferentes tipos neuronales de la retina ante un estímulo luminoso. El equipo utilizado reúne las indicaciones especificadas de la Sociedad Internacional para la Electrofisiología Clínica de la Visión (*International for Clinical Electrophysiology of Vision, ISCEV*) para la realización de las medidas electrorretinográficas.

2.2.1. Equipo de estimulación.

El equipo de estimulación consta de las diferentes fuentes de iluminación que se detallan más adelante y del propio sistema de adquisición de los datos funcionales.

2.2.1.1. Fuentes de iluminación.

Diodo de emisión de luz (LED)

Los LEDs son dispositivos electrónicos que emiten una cantidad de luz proporcional a la corriente eléctrica que circula por sus polos. Debido al pequeño tamaño del ojo de ratón, la utilización de LEDs permite establecer condiciones iso-luminantes de toda la retina (Viswanathan y cols., 2001). Se emplearon LEDs, cuya intensidad fue controlada mediante una fuente de alimentación diseñada por la casa CIBERTEC S.A. La iluminación proporcionada por el LED fue medida por un fotómetro y ajustada a las necesidades de cada protocolo experimental.

Campana Ganzfeld

La campana Ganzfeld, de estructura esférica, garantiza que la luz se distribuya de forma homogénea por todo su interior, mediante múltiples reflexiones de la luz generada por diodos emisores de luz (LED). Éstos, proporcionan una amplia gama de intensidades lumínicas.

Electrodos

Se utilizaron tres tipos de electrodos para poder llevar a cabo la obtención de la respuesta electrofisiológica. Un electrodo de tierra conectado a una aguja subcutánea situado en la cola del animal. Un electrodo de referencia; una placa de oro dentro de la boca del animal y un electrodo de registro Burian-Allen.

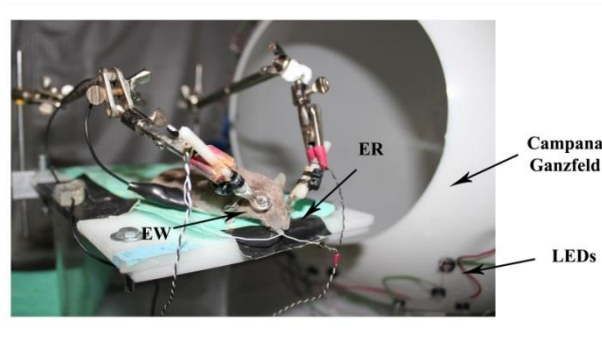


Figura 1. Montaje del sistema de registro electroretinográfico. En el dibujo, se muestra la colocación de cada uno de los electrodos en el ratón; EW (electrodo de trabajo o registro), ER (electrodo de referencia) junto a la campana Ganzfeld antes de comenzar el protocolo de estimulación.

2.2.2. Sistema de adquisición de datos.

Los destellos de estimulación son proporcionados a través de la campana Ganzfeld. Las señales eléctricas generadas en la retina fueron amplificadas (x1000) y la banda se filtró entre 0.3 y 1000 Hz mediante un amplificador. La señal fue digitalizada a 20 kHz con una tarjeta de adquisición de datos PowerLab (AD Instruments, Chalgrove, Reino Unido). La señal finalmente fue representada en la pantalla de un ordenador compatible y un software comercial Scope v6.4 de PowerLab. Los estímulos de luz fueron calibrados periódicamente con un fotómetro como ya se ha comentado previamente.

2.3 Cromatografía.

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla de sustancias (analitos) en función de las diferentes interacciones químicas de los mismos por una fase móvil sometida a elevada presión y una fase estacionaria (columna cromatográfica).

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleado para la determinación de los niveles de ATP constaba de una bomba isocrática, una válvula de inyección manual Rheodyne[®] (con un “bucle externo” de 10-250 μ l) y un detector UV/VIS. La columna empleada fue una columna en fase reversa C18 de par iónico (5 μ m tamaño partícula, 150 mm longitud, 4 mm de diámetro interno) tal y como se muestra en la figura 2. Para la inyección manual de las muestras en el sistema cromatográfico se utilizaron jeringas Hamilton. Se equilibró el sistema cromatográfico, y se establecieron, para cada experimento, una fase móvil y un caudal de flujo. La técnica utilizada fue la de par iónico. El control y procesamiento de los datos se realizó utilizando el software correspondiente (*tabla IV*).

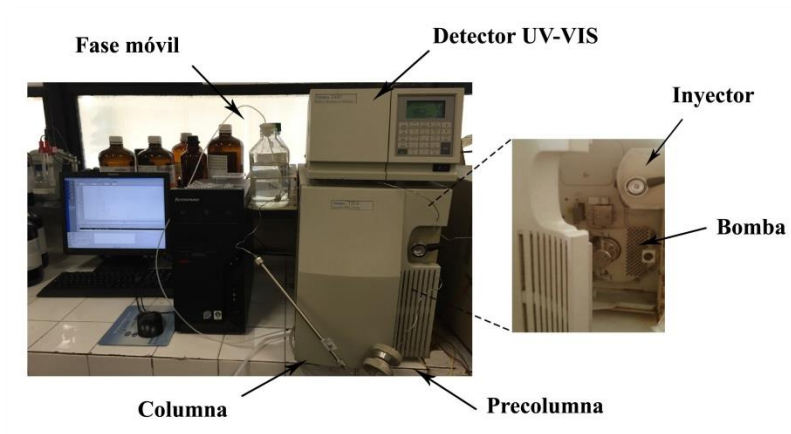


Figura 2. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

2.4 Microfluorimetría.

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de calcio intracelular en células individuales se utilizaron técnicas fluorimétricas basadas en la utilización de sondas fluorescentes permeables a las células. Las determinaciones fluorimétricas para las medidas de Ca^{2+} citosólico en la línea celular R28 se realizaron en un microscopio de epifluorescencia acoplado a una cámara ORCA-ER C47 42-80. Los cultivos celulares se visualizaron con un objetivo Nikon Plan Fluor 20X con plano de apertura fija 0.5. Las preparaciones se excitaron con longitudes de onda de 340 y 380 nm seleccionadas con una rueda de filtros Lambda 10-2 de Sutter Instrument Co. Todo el equipo se controló por medio del software Metafluor 6.2r & PC software (Universal Imaging Corp, Cambridge, UK).

3. SOFTWARE, BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.

En la siguiente tabla se detallan los principales programas y bases de datos utilizados durante el procesamiento de datos del trabajo experimental.

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
BLAST (NCBI)	Bases de datos
Breeze Software	Cromatografía (HPLC)
GraphPad Instat[®] 3	Estadística
Image J (v.1.37, NIH, EE.UU.) Adobe Photoshop[®] CS 8.0.1 (Adobe Systems)	Programa de procesamiento de imágenes
Image Pro Plus (IPP, Media Cybernetics)	Cuantificación automática de CGR con inmunofluorescencia positiva en retinas a plano (número total de CGR y densidad de CGR/mm ²)
Imagnet 2000Topcon	Evaluación de la salud ocular <i>in vivo</i>
Kodak Molecular Imaging (Kodak)	Western-Blot
Kodak GL200 Imaging System (Kodak)	Reacción en cadena de la polimerasa
Metafluor 6.2r&PC Software	Microfluorimetría
Microcal Origin 7.0 Office (Microsoft[®] Office Excel 2010)	Hoja de cálculo y gráficos
Muse[®] Cell Analyzer	Citometría de flujo
Pubmed	Base de datos bibliográfica
SigmaPlot[®] 9.0 for Windows[®] (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU). Scope v6.4 Powerlab	Representación gráfica de mapas de isodensidad Registro electrorretinográfico
Software Kodak Molecular Imaging (Kodak)	Densitometrado de bandas (WB)
Software LSM 5 Pascal	Microscopía confocal

Tabla IV. Relación de programas y herramientas informáticas.

MÉTODOS

4. MODELOS EXPERIMENTALES.

4.1 Animales de experimentación.

En la presente Tesis Doctoral se pretende estudiar la implicación funcional del receptor P2X7 en la retina de un modelo de glaucoma. Así como establecer un estudio comparativo con un modelo de neurodegeneración bien establecido de enfermedad de Alzheimer. Para ello, la especie animal empleada ha sido el ratón (*Mus musculus*, L. 1758).

4.1.1. Modelos animales y anestesia.

Los distintos procedimientos experimentales se llevaron a cabo utilizando cuatro modelos murinos. Un modelo de degeneración glaucomatosa y un modelo de enfermedad de Alzheimer, con sus respectivas cepas control. Todo el mantenimiento, procedimientos experimentales y sacrificio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación oftalmológica y de visión ("*ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*") y según la normativa establecida en la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y en la legislación Española (Ley 32/2007, RD 1201/2005 y RD 53/2013 vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio).

Modelo de degeneración glaucomatosa: El ratón DBA/2J.

Los experimentos se realizaron en ratones hembra control C57BL/6J y DBA/2J obtenidos del distribuidor europeo de Jackson Laboratories *Charles Rivers*. Los animales se mantuvieron a temperatura y luz controlada, con un fotoperiodo artificial de 12 horas de luz/oscuridad. A todos los animales se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron en hembras C57 y DBA, ya que las hembras mutantes desarrollan antes las manifestaciones fenotípicas que los machos, entre ellas, el aumento de PIO (Libby y cols., 2005).

En este estudio se emplearon aproximadamente 200 animales mutantes y 200 controles divididos en grupos correspondientes a diferentes estadios 3, 6, 9, 12, 15 y 23 meses que fueron objeto de estudio. Se dividieron en grupos en función de las necesidades requeridas por cada una de las técnicas empleadas (ver en el capítulo de *Resultados* n empleado para cada experimento).

Modelo de enfermedad de Alzheimer

Los experimentos se realizaron en ratones hembra y macho transgénicos B6C3-Tg (A β PP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax (Tg(APP, PSEN1)) y sus respectivos controles B3C3F1 obtenidos de Jackson Laboratories. Los animales se mantuvieron a temperatura y luz controlada, con un fotoperiodo artificial de 12 horas de luz/oscuridad. A todos los animales se les proporcionó comida y agua *ad libitum*.

A lo largo del presente trabajo, se emplearon aproximadamente 200 animales mutantes y 200 controles divididos en grupos correspondientes a diferentes estadios 3-5, 14 y 17 meses que fueron objeto de estudio.

Inducción anestésica y condiciones de mantenimiento de los ratones

En las cepas a las que se realizaron medidas de PIO y ERG, los ratones fueron pesados y anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i.p) de una mezcla de Ketamina (95 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) diluídos en solución salina (NaCl 0.9% en agua destilada).

Todas las manipulaciones quirúrgicas se efectuaron bajo anestesia general, obtenida por (i.p.) de una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) en 0.1 ml de suero salino al 0.9%. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado. En el postoperatorio, se les aplicó a los animales por vía tópica en la córnea, un ungüento oftalmológico con tobramicina (Tobrex®, Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación y lesión corneal. Los animales fueron devueltos a sus jaulas y colocados

bajo una fuente de luz emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente fueron enviados al animalario, donde permanecieron hasta su sacrificio.

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis i.p. de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal Vetoquinol[®] Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, España), de la misma manera que para llevar a cabo la perfusión de los ratones con el fin de realizar estudios histológicos.

4.1.2 Genotipado de los animales.

Modelo del ratón DBA/2J

Los ratones DBA/2J tienen dos fenotipos oculares, la atrofia del estroma del iris (ISA) y la dispersión del pigmento del iris (IPD) (Chang y cols., 1999; Anderson y cols., 2002) causadas por las mutaciones en los genes *Tyrp1* y *Gpnmb*, respectivamente.

El genotipado de los animales se llevó a cabo para confirmar la presencia de dichas mutaciones y asegurar la manifestación fenotípica correspondiente.

Tyrp1 (*proteína relacionada con tirosinasa1*), tiene dos mutaciones sin sentido, una de las cuales (nt1151 del RNAm del ratón; GI:13654240) elimina un sitio de restricción. Para identificar esta mutación se aisló el ADN genómico a partir de la cola del ratón para ser amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de la PCR (244 pb) se digiere con *BbsI* (New England BioLabs, Beverly, MA).

Gpnmb (*glicoproteína transmembrana NMB*), el gen responsable del fenotipo IPD, tiene una mutación puntual (C→T) y nt 547 del RNAm (GI: 315429906) que crea un codón prematuro de parada insertando un nuevo sitio de restricción. El ADN genómico fue usado para amplificar por PCR la región de 483 pb que contiene la mutación. La presencia de la mutación se indica por la existencia de dos bandas de 250 pb y 233 pb productos de la digestión con *PvuII* (New England BioLabs).

Procedimiento experimental

Los ratones DBA/2J utilizados en este estudio fueron genotipados para garantizar la existencia de ambas mutaciones en los genes *Tyrp1* y *Gpnmb* responsables de la ISA e IPD, respectivamente (figura 3). La mutación originada en *Tyrp1* elimina un sitio de restricción, por lo que, los productos de la PCR no digeridos son detectados en ratones DBA/2J (figura 3A). Por el contrario, la mutación en el gen *Gpnmb* en ratones DBA/2J corresponde a una inserción de un sitio de restricción detectando dos productos en la PCR obtenidos por la digestión con la correspondiente enzima de restricción (figura 3B).

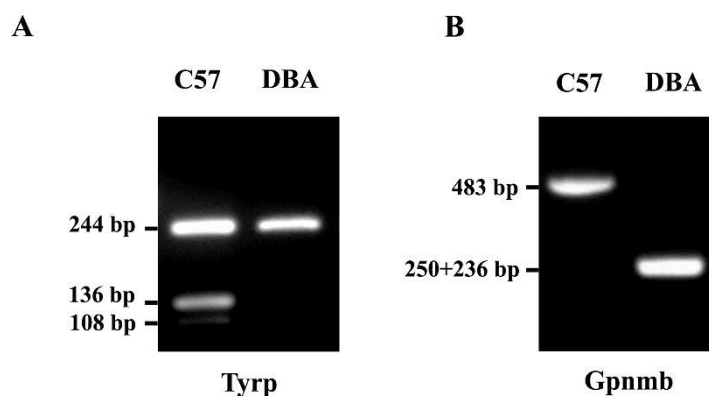


Figura 3. Resultados representativos del genotipado de ratones C57BL/6J y DBA/2J. (A) La secuencia amplificada para el gen *Tyrp*, después de la digestión con *BbsI*, muestra dos bandas en el ratón control C57BL/6J. La mutación para *Tyrp1* elimina un sitio de restricción, obteniéndose tras la PCR una sola banda no digerida detectada en los ratones DBA/2J. (B) La digestión de la secuencia de *Gpnmb* amplificada con *PvuII* genera una banda para el ratón control y dos bandas en el ratón DBA/2J por la generación de un nuevo sitio de restricción.

4.1.2.1 Extracción del ADN y cuantificación.

El ADN genómico fue aislado en los ratones DBA/2J siguiendo el protocolo de extracción de DBA a partir de la cola del animal mediante el kit comercial Genra Puregene Mouse Tail Kit.

Recogida de muestra y lisis tisular: Mediante material quirúrgico estéril se seccionó una porción de cola de cada animal y se llevó a cabo la disgregación de las muestras añadiendo 300 μ l de tampón y adicionando 1.5 μ l de Proteinasa K. A continuación, se incubaron en el termobloque a 55°C durante toda la noche.

Centrifugación a 16060 g durante 5 minutos.

Añadir 1.5 µl de RNase A y mantener durante 30 minutos a 37°C.

Precipitación de las proteínas: Añadir 100 µl de solución de precipitación y centrifugar durante 3 minutos a 16060 x g.

Precipitación y purificación del ADN: Adicionar 300 µl de isopropanol, mezclar por inversión y centrifugar durante 3 minutos a 16060 g. Añadir 300 µl de etanol al 70% en frío. Centrifugar durante 3 minutos a 16060 x g.

Resuspender el precipitado: se añaden 50 µl de solución de hidratación de ADN y se incuban a 65°C durante 1 hora en el termobloque. Incubar a temperatura ambiente toda la noche en agitación.

Cuantificación del ADN

Las concentraciones de ADN obtenidas se midieron empleando el NanoDrop® ND-1000 UV-Vis espectrofotómetro (NanoDrop Technologies). Las muestras se mantienen a -20°C hasta el momento de la PCR.

4.1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez obtenido el ADN de cada uno de los ratones, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) partiendo de 10 ng de ADN de partida para cada una de las muestras, mediante el siguiente protocolo:

Preparar la mezcla de reacción (tabla V). En el control negativo, se sustituye el volumen de ADN por un volumen igual de H₂O para biología molecular.

Componente	Mezcla
10x PCR Buffer	5 µl
50x dNTP Mix	1 µl
Forward primer (Tyrrp1/Gpnmb) 10 uM	1 µl
Reverse primer (Tyrrp1/Gpnmb) 10 uM	1 µl
PCR water	1 µl
TITANUM™ Taq DNA polymerase	1 µl

Tabla V. Componentes de la mezcla de reacción.

A continuación se muestran las secuencias correspondientes a cada uno de los cebadores (*primers*) utilizados para ambos genes;

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>
<i>F-tyrp1</i>	forward 5'-GCATTGCTCAGACCTATAGATATTC-3'
<i>R-tyrp1</i>	reverse 5'-CAAAACACCAATTTTGTCTTACTTGC-3'
<i>F-gpmb</i>	forward 5'-CGGATACACTGGAATGCATCA-3'
<i>R-gpmb</i>	reverse 5'-ATGGCGAGCTTAGCCAGGATT-3'

Tabla VI. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados.

Reacción de amplificación: Se adicionan 50 µl de la mezcla de reacción a cada una de las muestras. Las condiciones de temperatura establecidas para *Tyrp 1* fueron 40 ciclos a 94°C de 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. La amplificación para *Gpmb* se realizó a 94°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos. Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler de Eppendorf. El producto de PCR se mantuvo a -20°C.

4.1.2.3 Digestión de fragmentos de PCR y electroforesis.

La digestión mediante las enzimas de restricción se llevó a cabo a partir de 10 µl de producto de PCR, 1 µl de enzima de restricción, 0.5 µl de BSA, y 2 µl de buffer 10x a 37°C durante 3 horas. Las enzimas de restricción utilizadas para llevar a cabo la digestión de los respectivos productos de PCR fueron *PvuII* (R0151S) y *BbSI* (R0539S) de *New England BioLabs Inc* (*Qiagen Izasa*).

Para la detección de los fragmentos generados tras la digestión, las muestras se prepararon tomando 10 µl de cada una de ellas y adicionando a cada una de ellas 2 µl de 6x Orange Loading Dye Solution. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2-3 % en presencia de bromuro de etidio (1µg/mL) a 100 V. Como marcador de peso molecular conocido se utilizó el patrón de ADN comercial PCR GeneRuler™ Low Range DNA ladder. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Kodak GL 200 Imaging (Kodak, Rochester, NY, USA).

Modelo del ratón Tg (APP/PSEN9)

El genotipado de los ratones de enfermedad de Alzheimer se realizó en el Servicio de Secuenciación y Diagnóstico Genético de Secugen S.L.

Se analizaron los ratones transgénicos para el gen de la proteína precursora amiloide (APP). El transgen se identificó a través de la amplificación de un fragmento de ADN de 377 pb y, mediante la amplificación de un fragmento de ADN de 324 pb, como control interno positivo, según la referencia de *The Jackson Laboratory* para la línea de ratones B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85 Dbo/Mmjax). Del mismo modo, se genotiparon los ratones para el gen de la presenilina 1 (PSEN1), a través de la amplificación de un fragmento de ADN de 608 pb, de la presencia del transgen de la presenilina 1 (PSEN1) y, mediante la amplificación de un fragmento de ADN 324 pb, como control interno positivo, según referencia de *The Jackson Laboratory* para la línea de ratones B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85 Dbo/Mmjax).

4.1.3 Tratamiento: Inyección intraperitoneal de BBG.

Las inyecciones intraperitoneales de BBG se realizaron bajo anestesia intraperitoneal (apartado 4.1.1). Para evitar la desecación del ojo durante el tratamiento, se depositó sobre la córnea una gota de metilcelulosa (Methocel 2%; Novartis Laboratories CIBA Vision, Annonay, France). El tratamiento consistió en una disolución de BBG de 5 mg/ml en 0.2% DMSO-PBS1x. Las inyecciones se realizaron con una aguja 23 G (Becton Dickinson) con un volumen de 300 µl correspondiente a una dosis de 45.5 mg/kg.

Inicialmente, se realizaron registros electroretinográficos a los 11 meses de edad en ratones DBA/2J (n=20) para tener los valores referencia de cada uno de los ratones antes del comienzo del tratamiento. Se dividieron en dos grupos (grupo control n=10, tratados con vehículo) y grupo tratado (n=10, sometidos a inyección con BBG). Ambos grupos fueron inyectados con los respectivos tratamientos durante 4 meses (una vez cada 48 horas), momento en el cual se evaluaba la respuesta electroretinográfica (ERG) para comprobar el estado de la función visual.

A continuación, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron las retinas para su procesamiento por Western Blot (*ver apartado 8.2*).

4.2 Modelo celular de células precursoras de retina de rata.

La línea establecida de células progenitoras de retina de rata (denominada R28), cedidas generosamente por el Dr. Nicolás Cuenca (cedidas a su vez por el Dr. Gail M. Seigel, PhD) fueron empleadas para llevar a cabo la experimentación “in vitro” del presente trabajo de investigación). Estas células se desarrollaron a partir de 3 pases de la línea precursora R28 E1A-NR.3. Esta línea parental se estableció por inmortalización de un cultivo de tejido neuroretiniano de embriones de rata Sprague-Dawley de 6 días con el virus psi2 E1, un retrovirus incompetente para la replicación y que contiene el gen del adenovirus *I2S E1A* (Seigel, 1996). Este gen se seleccionó por su capacidad para estimular el crecimiento de células de roedores sin inducir tumorigénesis (Cone y cols., 1988). Las células expresando el gen se seleccionaron mediante incubación con el antibiótico geneticina (G418) ya que el vector conteniendo el gen *I2S E1A* expresa además resistencia a dicho antibiótico. La presencia de E1A fue confirmada mediante *western blot* e inmunocitoquímica en las células resistentes al antibiótico obtenidas. La línea celular generada se caracteriza porque expresa marcadores de células gliales y neuronales indicativos de una célula precursora de retina (Seigel y cols., 2004; Seigel, 2014).

4.2.1 Descongelación del cultivo celular.

Las células fueron descongeladas sumergiendo el vial con el contenido celular (conservado a -80°C) en un baño de agua a 37°C. Se trasvasó a un falcon que contenía 10 ml de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con suero de ternera al 10 % (*tabla I*). Posteriormente, las células se centrifugaron a 25°C a 200 g durante 5 minutos y, se resuspendieron en medio DMEM a la densidad celular requerida para su siembra en las botellas (F-75), comprobando a continuación su refringencia y estado en el microscopio. Las células se mantuvieron en el incubador bajo una atmósfera de flujo controlado de 5% de CO₂/95% aire saturado de humedad (95%) a temperatura constante de 37°C.

4.2.2 Mantenimiento del cultivo celular y subcultivos.

Toda la manipulación llevada a cabo con la línea celular se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical. Todos los medios de cultivo y disoluciones fueron filtrados usando membranas estériles de 0.20 μm de tamaño de poro con ayuda de una jeringa estéril de 60 ml. Las células fueron sembradas en placas estériles de 6, 24 y 96 pocillos y cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro. Se comprobó diariamente el estado y la evolución de las células mediante observación por microscopía. La generación de subcultivos celulares se llevó a cabo tras alcanzar el estado de confluencia, cada dos o tres días, en función de la densidad celular de partida.

Para la realización de dichos subcultivos, las células fueron lavadas con CMF-EDTA (*tabla II*) y se levantaron de las botellas de mantenimiento mediante la utilización de una solución de tripsina al 0.25%. El cultivo celular se mantuvo durante 7 minutos a 37°C en el incubador, controlándose el proceso de liberación de las células de la superficie de cultivo por observación al microscopio. Se inactivó la tripsina mediante la adición de medio de cultivo suplementado y la suspensión celular se centrifugó a 200g durante 7 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de cultivo completo. A continuación, se determinó el número de células utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases. Las células se sembraron de nuevo en frascos de cultivo para su mantenimiento y/o se sembraron en placas de cultivo para los distintos procedimientos experimentales a realizar.

Para los ensayos de viabilidad celular, señalización intracelular y citometría de flujo las células fueron cultivadas en medio DMEM completo, para a continuación, ser incubadas 24 horas con medio DMEM sin suero. Una vez finalizado el proceso de privación se reemplazó el medio en su totalidad (grupo control) o conteniendo los diferentes agentes a estudiar (grupos experimentales) en un intervalo de incubación entre 5-120 minutos en el caso de experimentos de activación de rutas o de 48 horas en el caso de evaluación de la citotoxicidad y apoptosis.

Para los ensayos de microfluorimetría, las células fueron cultivadas en medio DMEM completo, y fueron incubadas con el indicador fluorescente fura-2 (ver más adelante, apartado 11).

4.2.3 Conservación de la línea celular.

Para la conservación del cultivo, las células se tripsinizan y se recogen por centrifugación, como se ha descrito previamente. Las células se resuspenden en medio DMEM suplementado con suero de ternera al 10% (v/v) y DMSO al 10% (v/v) como agente criopreservante. La suspensión se transfiere a viales estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad para proceder a su congelación. Para conseguir que la temperatura descienda a una velocidad de 1°C/min, los viales se introducen en un recipiente de plástico con alcohol isopropílico (Nalgene) guardándose inmediatamente a -80°C.

4.2.4 Tratamiento de las células R28 con distintos agentes.

Las células R28 fueron sembradas y mantenidas hasta la confluencia en diferentes placas 24 y 96 pocillos, cubreobjetos o en botellas F25 en función de los estudios a realizar. En algunos experimentos, se expusieron a una incubación de medio DMEM sin suero suplementado (deprivación) de 24 horas (*ver más adelante*). Posteriormente, se incubaron con concentraciones crecientes de BzATP [100 hasta 2000] μM (*ver resultados de cada técnica*) en medio sin suero durante 48 horas en los ensayos de viabilidad celular y citometría o hasta 1 hora para los estudios de señalización intracelular. Transcurrido ese tiempo, las células fueron destinadas a diferentes procedimientos experimentales (*ver apartados: inmunodetección por ELISA (8.3), microfluorimetría (11), viabilidad celular (12) y citometría de flujo (13.2.1)*).

Además de llevar a cabo la activación del receptor P2X7 mediante BzATP, las células se sometieron a la incubación con dos de los antagonistas selectivos de dicho receptor, BBG y A438079. Para estos ensayos, las células se pre-incubaron durante 30 minutos con BBG o A438079 a concentraciones entre 1 μM para, proceder a continuación en presencia de dicho inhibidor, a realizar el tratamiento de 48 horas para experimentos de viabilidad y citometría o hasta una hora del agonista BzATP entre

[100-500] μM para experimentos de citometría y ELISA, tal y como ha sido descrito previamente, y detallará más adelante.

5. MEDIDAS DE PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO).

Las medidas de PIO fueron tomadas mediante un tonómetro de rebote no invasivo en los animales anestesiados (Danas y cols., 2003; Wang y cols., 2005; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Vidal-Sanz y cols., 2012). El tonómetro se sitúa en una posición fija y el sensor se alinea con el eje óptico del ojo entre 1-4 mm de distancia. Se midieron ambos ojos de cada animal inmediatamente después de la aplicación de la anestesia (Ding y cols., 2011) a las edades de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. La medida se realizó a la misma hora para evitar fluctuaciones debido al ritmo circadiano (Aihara y cols., 2003; Drouyer y cols., 2008). Con el objetivo de minimizar el error en la medida, cada valor de PIO corresponde a la media de 3 medidas que a su vez fueron obtenidas tras seis lecturas automáticas por el tonómetro.

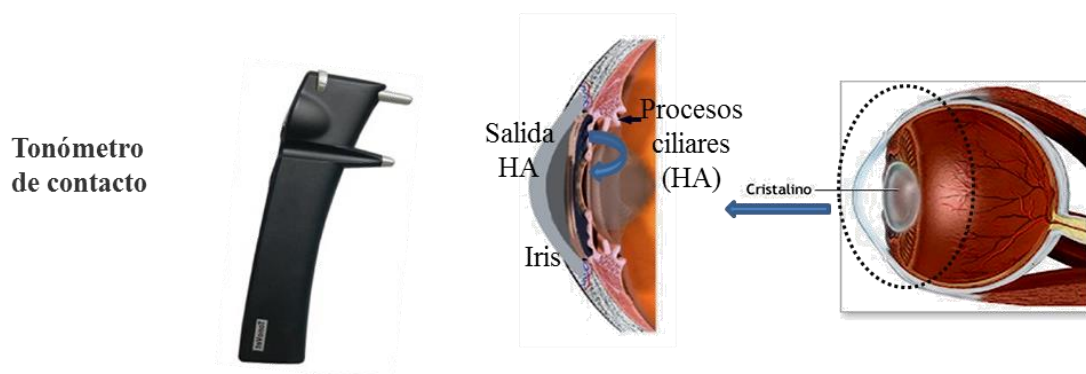


Figura 4. Esquema representativo de la medición de la PIO. La PIO es la medida de la presión obtenida del volumen de humor acuoso (HA) que constituye la cámara anterior del ojo. Se origina una presión resultado del equilibrio entre la producción de HA por el cuerpo ciliar y el drenaje del mismo a través de la malla trabecular.

6. REGISTROS ELECTRORETINOGRÁFICOS.

Para poder realizar un seguimiento de la actividad funcional de la retina se utilizó la técnica de registro electroretinográfico de campo completo. En el ERG de campo completo se requiere una iluminación homogénea de toda la retina del animal. El estímulo luminoso, es un flash de luz blanca y la 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 y cols., 2009) y (Lam, 2005). Para la obtención del ERG se dispone de un electrodo de registro situado próximo a la superficie corneal (Lam, 2005), un electrodo de referencia en la boca y un tercer electrodo, denominado “tierra” en la cola. Se trata, por lo tanto, de una técnica no invasiva.

En cada registro, debe medirse la amplitud máxima de cada onda y el tiempo que transcurre desde la aplicación del estímulo luminoso hasta el pico máximo de cada onda analizada (valor mínimo en *onda a* o máximo en *onda b*), esta medida recibe el nombre de tiempo implícito.

6.1 Procedimiento de preparación del animal.

Los animales se mantuvieron mínimo 24 horas en condiciones de adaptación a la oscuridad. Toda la manipulación animal y procedimiento experimental de registro se llevó a cabo en condiciones de oscuridad o con luz roja ($\lambda > 600$ nm). Los ratones fueron anestesiados (*ver apartado 4.1.1*) y se mantuvieron a una temperatura corpórea de 37°C mediante una almohadilla térmica. Antes de realizar el registro se aplicó 1 gota de tropicamida al 1% en el ojo a registrar. Antes de colocar el electrodo corneal se administró tópicamente MethocelTM al 2% en cada ojo para optimizar el registro electrofisiológico y preservar la superficie corneal de la desecación.

Colocación de los electrodos: En cada uno de los registros, se procedió a la colocación de tres electrodos. El electrodo de tierra: conectado a una aguja de 30G insertada de forma subcutánea en la base de la cola del animal, el electrodo de referencia: placa de oro en forma de lengüeta, ubicada dentro de la boca del animal y electrodo corneal o de

trabajo. Este último electrodo consiste en una lente de metacrilato transparente y oro, se coloca en el eje visual y localizado aproximadamente a 2 mm de la córnea.

Colocación del animal: El animal anestesiado se dispone sobre una manta térmica de agua recirculante con los electrodos correspondientes y se sitúa dentro de la campana Ganzfeld, que a su vez se encuentra dentro de una caja de Faraday. De esta manera, quedarán eliminadas las posibles interferencias debidas a campos electromagnéticos externos.

En la figura 5 se muestra de forma esquemática el equipamiento utilizado para la realización de los registros electroretinográficos.

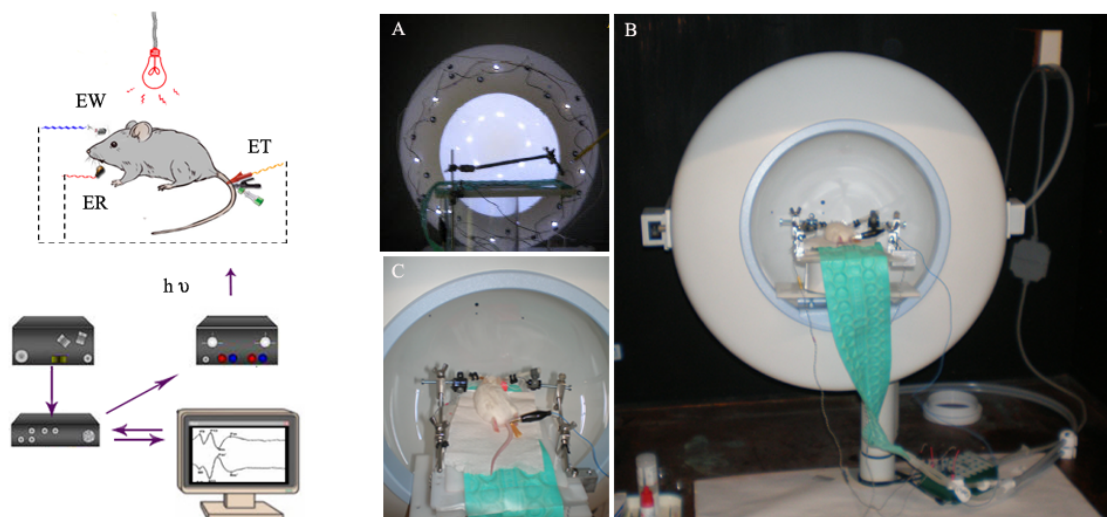


Figura 5. Sistema de registro electroretinográfico. En el dibujo de la izquierda, se muestra la colocación de cada uno de los electrodos en el ratón; EW (electrodo de trabajo o registro), ER (electrodo de referencia) y ET (electrodo de tierra). (A) Campana Ganzfeld durante una estimulación fotópica. (B) Campana Ganzfeld sin activar los LEDs. (C) Dispositivo de colocación del ratón en la entrada de la campana Ganzfeld.

6.2 Protocolo de estimulación.

Los protocolos de estimulación se realizaron según la normativa establecida para los registros electrorretinográficos en pacientes (McCulloch y cols., 2015). De esta manera, se pudieron obtener las 5 respuestas electrorretinográficas estándar, es decir, la respuesta de bastones, mixta, potenciales oscilatorios, respuesta de conos y flicker. Además, una vez establecida las condiciones lumínicas óptimas para los animales de estudio, se registró el componente STR del ERG.

6.2.1. Respuesta escotópica umbral y respuesta escotópica.

Los STR se registraron utilizando una pantalla Ganzfeld. Se aplicaron estímulos luminosos en cada ojo derecho de cada uno de los animales ensayados en un intervalo de intensidades que varían entre 10^{-4} y 10^{-2} $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$ (ver apartado 2 de Resultados). 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. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz. Se promediaron un total de 100 respuestas con un intervalo entre estímulos de entre 3 y 10 segundos.

Para cada intensidad de la luz, se promediaron una serie de respuestas, y el intervalo entre destellos de luz se ajustó para asegurar un intervalo que permitiera la recuperación de la respuesta (10 s para las intensidades más débiles de estímulo). El STR se analizó para cada uno de los estímulos, la respuesta positiva umbral escotópica (pSTR) se midió desde el inicio hasta la parte superior del máximo de la deflexión positiva, aproximadamente a 120 ms desde el inicio del flash, así como, el nSTR medido desde el inicio al primer mínimo obtenido después de pSTR, a 220 ms a partir de la aparición del flash.

En este estudio, se compararon las respuestas obtenidas en las retinas de los ojos derechos y/o izquierdos de los animales glaucomatosos con las respectivas retinas control en el intervalo temporal definido empleando una intensidad lumínica de -3.69 $\log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ o a -3.79 y -5 $\log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ en el caso de los ratones de Alzheimer.

7. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES

Para identificar y cuantificar las células ganglionares de la retina (CGR) se utilizó la técnica de marcaje neuronal retrógrado de la población de las células ganglionares de la retina (CGR) supervivientes, a lo largo de la evolución de la patología en el animal glaucomatoso frente al animal control.

Se utilizó el trazador neuronal fluorescente OHSt (un análogo del trazador Fluorogold®), aplicado en ambos colículos superiores (CS) una semana antes del procesamiento de los animales (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Perez y cols., 1988; Marco-Gomariz y cols., 2006; Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009c). El OHSt es captado por los terminales axónicos de las CGR en el CS y transportado activamente (Schmued y Fallon, 1986; Schmued y cols., 1989; Wessendorf, 1991) y retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumula, no difundiendo transcelularmente (Schmued y Fallon, 1986). El OHSt acumulado en el soma de las CGR se puede observar en el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz adecuado y permite diferenciar las CGR de otros tipos de neuronas que están presentes en la misma capa de la retina y que no se trazan con OHSt, como las células amacrinas desplazadas, que suponen el 50% de las células de la capa de las CGR en la rata adulta (Drager y Olsen, 1981; Perry, 1981; Jeon y cols., 1998).

7.1. Aplicación del trazador.

La aplicación del trazador neuronal se realizó de acuerdo con técnicas previamente establecidas y descritas en trabajos previos, tanto en rata como en ratón (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Perez y cols., 1993; Vidal-Sanz y cols., 2000; Vidal-Sanz y cols., 2001; Lafuente Lopez-Herrera y cols., 2002; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009c).

Se anestesia al animal (*ver apartado 4.1.1*). Se rasura la parte dorsal de la cabeza del animal y se realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo. Se prosigue con una craneotomía parietal bilateral con ayuda de una fresadora. Se retiran las meninges que recubren el cerebro y, con ayuda de una micropipeta conectada

a un sistema de aspiración acoplado a una bomba de vacío, se succiona la porción necesaria de encéfalo e hipocampo para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos CS. Se aplica sobre ellos una pequeña porción esponja de fibrina (Espongostan[®] Film, Ferrosan A/S, Dinamarca) previamente embebida en una solución de OHSt disuelto al 10% en dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10% en suero salino al 0,9%. Por último, se cubre la craneotomía con esponja de fibrina, se sutura la piel del animal con seda de 5/0 (Lorca Marín, Murcia, España).

El marcaje retrogrado se realizó en 8 ratones DBA/2J de 15 meses de edad junto con sus respectivos controles. Tras la aplicación de OHSt los animales se mantuvieron durante 7 días para poder visualizar el trazador transportado y acumulado en el soma de las CGR.

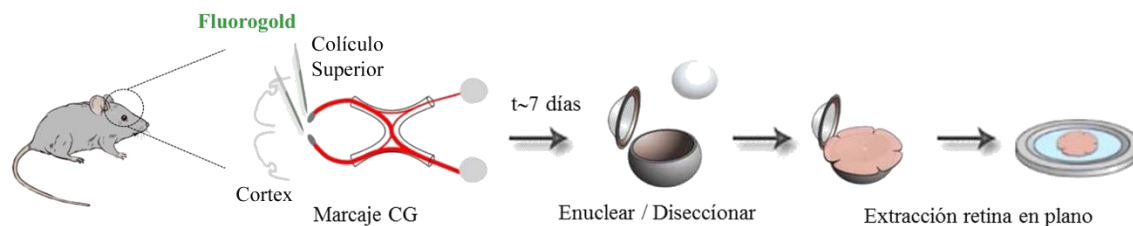


Figura 6. Esquema representativo de la aplicación del trazador (FG) y procesamiento histológico. Se aplica en marcador neuronal en CS y tras siete días se enuclea el globo ocular. Se extrae la retina, se monta a plano y se analiza con microscopía de fluorescencia.

8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES DE INMUNODETECCIÓN.

El uso de las técnicas moleculares, fue de gran utilidad para poder caracterizar la distribución y la expresión de las diferentes proteínas objeto de estudio en este trabajo. Así como para establecer diferentes cambios en la regulación de las mismas pudiendo dilucidar su posible implicación en la muerte celular de procesos de neurodegeneración retiniana.

8.1 Inmunohistoquímica.

Con el objetivo de proceder al estudio morfológico y morfométrico de las poblaciones neuronales así como de las secciones transversales se llevó a cabo el siguiente procedimiento histológico para la inmunodetección.

8.1.1 Perfusión de los animales.

Tras inducir la anestesia profunda mediante eutanización por vía i.p. (*ver apartado 4.1.1*) y comprobar que el animal ha alcanzado el plano quirúrgico de anestesia, se procedió a la perfusión intracardiaca de los animales. Se realizó una incisión central a través del tegumento (pelo rasurado y piel) y de la pared abdominal a la altura de la caja torácica. Se secciona el diafragma y las costillas hacia la clavícula evitando el daño en la cavidad pleural. Mediante un fórceps se pinza y retrae el peto costal dejando al descubierto la cavidad torácica, proporcionando una visión clara de los vasos. A continuación, se pinza la aorta abdominal y se realiza una pequeña incisión en la aurícula derecha dejando que la sangre salga durante unos segundos. Se introduce una cánula en el ventrículo izquierdo hasta la aorta ascendente y, se perfunde una disolución salina (PBS1X), para drenar la sangre del torrente circulatorio superior. A continuación, se perfunde con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M (*tabla II*) mantenida a 4°C.

Una vez perfundidos los animales, el procesamiento de los tejidos fue diferente, dependiendo de si las retinas se procesaban las copas ópticas para la realización de secciones histológicas transversales (*ver apartado 8.1.2.1*) o si se disecaban completas, para hacer montajes globales a plano de las retinas “*in toto*” (*apartado 8.1.2.2*).

8.1.2 Disección y procesado histológico de las retinas.

8.1.2.1 Secciones transversales (fijación, inclusión y corte).

Disección y fijación

Tras la perfusión del animal se llevó a cabo la enucleación de ambos ojos mediante la ayuda de tijeras finas y pinzas curvas retirando el tejido conectivo y muscular, evitando realizar presión en el globo ocular para el mantenimiento correcto de

todas las estructuras. Utilizando un microbisturí se realizó una pequeña incisión en la zona perilimbar y se mantuvieron en PFA 4 % durante 15-30 minutos a 4°C. A continuación, con ayuda de unas microtijeras y pinzas, se realizó una sección circular a nivel del limbo esclero-corneal y se retiraron la córnea, el iris junto al cuerpo ciliar. El cristalino fue eliminado ejerciendo una ligera presión del globo ocular. Se finalizó con la postfijación del tejido en PFA al 4% durante 1 hora en la solución de PFA al 4% para asegurar el proceso de fijación. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS1X en agitación constante.

Crioprotección

El siguiente paso consistió en la crioprotección de las copas ópticas mediante la incubación de las muestras en concentraciones crecientes de sacarosa. Inicialmente, los ojos fueron sumergidos en una solución de sacarosa al 11% en tampón fosfato salino (PBS) durante mínimo de 12 horas a 4°C; para, a continuación, ser trasvasados a una solución de sacarosa al 33% durante toda la noche a 4°C y en agitación. De este modo, preservamos el tejido del deterioro ocasionado por la formación de cristales de agua durante el proceso de congelación.

Inclusión

Una vez completada la crioprotección, se llevó a cabo la inclusión del tejido en un medio apropiado para su congelación, manteniendo la orientación adecuada teniendo en cuenta el plano de corte deseado. Se congelaron rápidamente a -60°C en nitrógeno líquido. Todo el material biológico incluido se conservó a -20°C.

Realización de secciones histológicas transversales

Los bloques fueron introducidos en la cámara del criostato durante aproximadamente 1 hora para que alcanzasen la temperatura óptima de corte (aproximadamente -27°C). Se obtuvieron secciones seriadas de 10 µm de grosor utilizando un criostato. Las secciones se adhirieron a portaobjetos (pre-tratados con poli-L-lisina) y fueron conservadas a -20°C hasta su posterior utilización.

8.1.2.2 Montajes globales a plano de retinas “*in toto*”.

Tras la perfusión del animal se marcó el polo superior con ayuda de un punto de sutura en la conjuntiva perilímbica; también se usaron como referencias la carúncula y la inserción escleral del músculo recto superior, para conocer y mantener la orientación de la retina. A continuación, se realizó la enucleación de ambos los ojos y se continúa la fijación en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a 4°C. Se eliminó el paraformaldehído mediante lavados consecutivos de los ojos en PBS 0,1 M, se disecaron todas las estructuras del polo anterior (*ver apartado 8.1.2.1*) y se realizaron cuatro cortes radiales, equidistantes entre sí en la copa óptica, orientados hacia nervio óptico y tomando como referencia el polo superior, que se identificó mediante un corte más profundo. De esta manera quedan delimitados los diferentes cuadrantes: temporal superior, temporal inferior, nasal superior y nasal inferior. A continuación se disecó la retina de coroides y esclera con ayuda de unas pinzas finas y se diseccionó del nervio óptico a nivel de la lámina cribosa con unas tijeras de microcirugía. La retina se extiende con la cara vítrea hacia arriba en un portaobjetos y se le adhiere papel de filtro Whatman[®] número 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) y se post-fija en paraformaldehído al 4% durante una hora a 4°C, se retira el papel de filtro y se hacen lavados en PBS. Se coloca la retina en un portaobjetos y se limpian los restos de vítreo con un pincel y unas pinzas finas.

8.1.3 Estudio inmunohistoquímico.

Los diferentes marcadores celulares observados mediante esta técnica, fueron reconocidos gracias al uso de anticuerpos con inmunorreactividad frente a proteínas específicas y características del tipo neuronal. En las tablas VII y VIII se muestra la relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el estudio inmunohistoquímico de las muestras mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

<i>Anticuerpo 1°</i>	<i>Tipo</i>	<i>Donador</i>	<i>Dilución</i>	<i>Referencia</i>
Anti-P2X7 receptor	Policlonal	Conejo	1:200	Alomone APR-004
Anti-Brn3a(C-20)	Policlonal	Cabra	1:500	Sc 31984
Anti-sinaptofisina (clone SVP 38)	Monoclonal	Ratón	1:200	Sigma S5768
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Monoclonal	Ratón	1:200	Sigma G3893
Anti-solute carrier family 17 member 9 (VNUT)	Policlonal	Conejo	1:1000	Millipore ABN110
Anti-pNFH (anti Rat Neurofilament 200 kDa; Clone RT97)	Monoclonal	Ratón	1:500	Serotec MCA1321GA
Anti-Amyloid β, clone W0-2	Monoclonal	Ratón	1:500	Milipore MABN10

Tabla VII. Relación de anticuerpos primarios utilizados.

<i>Anticuerpo 2°</i>	<i>Donador</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Emisión</i>	<i>Referencia</i>
Anti-IgG de conejo-FITC	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch	518	711-095-152
Anti-IgG de cabra-Dylight	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch	518	705-485-147
Anti-IgG de conejo -Cy3	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch	570	711-165-152
Anti-IgG de ratón -FITC	Cabra	1:200	Jackson Immunoresearch	518	115-095-071

Tabla VIII. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.

8.1.3.1 Inmunofluorescencia en secciones transversales.

Las secciones se descongelaron a temperatura ambiente durante una hora. A continuación se siguió el siguiente procedimiento experimental:

Hidratación: Las secciones se mantienen en PBS durante 10 minutos.

Permeabilización: Las membranas celulares son permeabilizadas con una solución de PBS Tritón X-100 (0.25%) durante durante 30 minutos.

Bloqueo: Con el fin de eliminar uniones inespecíficas, las secciones fueron incubadas en una solución de PBS 1X-Tritón X-100 al 0.1%, y suero normal del animal del que procede el anticuerpo secundario (suero de cabra, *Normal Goat Serum*, NGS o suero normal de burro *Normal Donkey Serum*, NDS) al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Incubación en anticuerpo primario (Ac 1°): Las secciones se incubaron en una solución de anticuerpo 1° (ver concentración en *Tabla VII*), Tritón X-100 al 0.1% y suero normal (según especie donadora del anticuerpo secundario) al 1% durante toda la noche a 4°C. En el caso de realizar doble marcaje se prosigue hasta la incubación con el anticuerpo secundario, se realizan los lavados y se comienza de nuevo con el bloqueo correspondiente.

Lavado: Para eliminar el exceso de anticuerpo 1° se lavaron las secciones en PBS 1X-Tritón X-100 al 0.1%, tres veces durante 10 minutos.

Incubación en anticuerpo secundario (Ac 2°): Las secciones, se incubaron con un anticuerpo 2° diluído en PBS Tritón X-100 (0.1%) en oscuridad durante una hora. La tabla VIII muestra la relación de anticuerpos secundarios utilizados así como la concentración y fluorocromo asociado.

Lavado: Tres veces durante 10 minutos en PBS Tritón X-100 al 0.1% con agitación.

Tinción nuclear: Se llevó a cabo el marcaje de los núcleos de los diferentes tipos neuronales mediante la incubación con la molécula 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o con yoduro de propidio (IPr) en PBS a las concentraciones especificadas en la tabla IX en PBS, en oscuridad durante 10 minutos.

Lavado: Tres veces durante 10 minutos en PBS con agitación.

Montaje: Para el montaje se utilizó un medio con propiedades protectoras de la fluorescencia *Vectashield Fluoromount* (Vector Laboratories), se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C hasta su estudio por microscopía confocal.

Compuesto	Dilución	Absorción (nm)	Emisión (nm)
DAPI	1:10.000	350	470
IPr	1:500	536	623

Tabla IX. Marcadores nucleares.

8.1.3.2 Inmunofluorescencia en montaje global.

Para la caracterización del modelo y marcaje de algunas de las proteínas objeto de estudio, se realizaron extracciones a plano de las retinas y se llevó a cabo su estudio por inmunofluorescencia. De esta manera, se pudo analizar el marcaje de las capas de fibras y CGR principalmente, pudiendo tener una visión concreta de la distribución del marcador y de los posibles cambios de expresión proteica; así como una visualización global de la posible pérdida neuronal en la capa analizada.

Para caracterizar la degeneración de las CGR se utilizó, además del marcaje con el trazador neuronal OHSt, un anticuerpo frente al factor de transcripción Brn3a que se expresa específicamente en CGR (Nadal-Nicolas y cols., 2009). El estudio de las posibles modificaciones en las subunidades fosforiladas pesadas de neurofilamentos de la capa de fibras nerviosas, se visualizó mediante el anticuerpo RT97. Mientras que la detección de depósitos y placas de β -amiloide se detectó mediante el uso de anticuerpos frente a la proteína β -amiloide. También, se realizó la inmunodetección del receptor P2X7 frente a los residuos de aminoácidos 576-595, determinando la presencia del mismo en este tipo neuronal.

El protocolo general de inmunotinción se muestra a continuación:

Permeabilización: Inicialmente las retinas aisladas a plano se lavaron con PBS a temperatura ambiente. Las retinas se permeabilizaron con una disolución de Triton X-100 al 0.5% en PBS durante 10 min a -70°C . Posteriormente se dejaron atemperar durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS. Este paso se realizó en el caso de la detección de la proteína β -amiloide y Brn3a, para las inmunotinciones con RT97 y P2X7 no se permeabilizaron las retinas.

Bloqueo: Las retinas se incubaron en una disolución de bloqueo con Tritón X-100 al 2% y suero normal (de la especie donadora del anticuerpo secundario) al 2% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Incubación de anticuerpos primarios (Ac 1°): A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario a la dilución adecuada (*tabla VII*) en disolución de bloqueo.

Lavado: Las retinas se lavaron cuatro veces en PBS-Tritón al 0.1% durante 20 minutos a temperatura ambiente (en agitación lenta continua).

Incubación del anticuerpo secundario (Ac 2°): Posteriormente, se llevó a cabo la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente (*tabla VIII*).

Lavado: Tras finalizar la incubación, las retinas se lavaron en PBS-Tritón 0.1% a temperatura ambiente cuatro veces durante 20 minutos en agitación continua lenta.

Montaje: Finalmente, la retina se montó “*in toto*” orientando la cara vítrea hacia arriba en el portaobjetos, cubriéndola con medio de montaje para fluorescencia (*antifading*) consistente en (3:1) glicerol en tampón carbonato sódico 0.1 M (pH 9) que contenía un 0.04% de p-fenilendiamina y un cubreobjetos. Las preparaciones se examinaron con un microscopio de fluorescencia.

8.1.4 Análisis morfológico y morfométrico de las retinas.

8.1.4.1 Procesado de imágenes.

Secciones transversales de retina

Las secciones transversales de las retinas fueron observadas y fotografiadas mediante un microscopio confocal equipado con 2 filtros: el de fluoresceína (BP 505-530) para la observación de anticuerpos conjugados con FITC y Alexa Fluor[®] 488 y, el de rodamina (LP560) para observar la fluorescencia roja de los anticuerpos conjugados con Cy3[®]. El microscopio integraba también una cámara digital de alta resolución, todo el equipo estaba monitorizado a través de programa LSM Pascal de Zeiss. La realización y fotomontaje de las secciones se realizaron usando un objetivo de 20x (Plan

Neofluar, 20x/0.5; Zeiss, Jena, Alemania) en todos los casos exceptuando en las fotos correspondientes al marcaje del transportador vesicular nucleotídico en las que se utilizó un objetivo 40x (Plan Neofluar, 40x/1.30; Zeiss, Jena, Alemania).

Montajes globales a plano de retinas

Las retinas fueron examinadas y microfotografiadas con un microscopio de fluorescencia. Para visualizar el marcaje de las CGR y de los somas, se excitó con una lámpara de mercurio y la fluorescencia de emisión se recogió a través de tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de la fluorescencia blanca dorada del OHSt, el de rodamina (BP 546/12, LP590) filtro que permite la observación de la fluorescencia roja de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor[®] 594 y el de fluoresceína (BP 450/490, LP 515-565) que permite la observación de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor[®] 488. El microscopio estaba equipado con una cámara digital de alta resolución (ProgResTM C10, Jenoptik, Jena, Alemania) y una platina motorizada (ProScanTM H128 de la serie; anteriores Scientific Instruments, Cambridge, Reino Unido) conectada a un sistema de análisis de imagen que permite capturar y grabar las imágenes (Image-Pro Plus 5.1 para Windows[®]) con un módulo de control de microscopio controlado por ordenador (Scope-Pro[®] 5.0 para Windows[®]) que permite capturar y grabar las imágenes.

La reconstrucción y fotomontaje de las retinas montadas a plano, se realizó mediante la adquisición secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos, siguiendo un patrón de muestreo en matriz de celdas regulares con área total de muestreo pre-establecida que cubría la superficie de la retina, usando un objetivo de 20x (Plan-Neofluar, 20x/0.5; Mikroskopie Zeiss, Jena, Alemania) siguiendo métodos descritos previamente (Marco-Gomariz y cols., 2006; Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009c). Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente dentro del programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 5.1 for Windows[®]. Dependiendo del tamaño y la orientación de cada retina en el portaobjetos se establecía un área de escaneo que cubriese completamente el área de interés. Este área consistía en una matriz de m campos microscópicos verticales y n horizontales (m x n). El tamaño de cada campo de

captura fue de 0.217 mm^2 y, normalmente se tomaban 140 imágenes que cubrían la totalidad de cada retina.

Todas las imágenes que componían una retina se guardaron en un archivo como imágenes de color de 24 bit. Usando el programa de análisis de imagen estas imágenes podían ser combinadas automáticamente mediante el fotomontaje en una sola imagen de alta resolución de la totalidad de la retina a plano para un posterior estudio y/o análisis de la imagen.

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

8.1.4.1.1 Cuantificación de las células ganglionares de la retina.

Los fotomontajes de cada una de las retinas fueron procesadas individualmente por medio de una subrutina informática específica para realizar el conteo de CGR marcadas con OHSt o Brn3a previamente desarrollada (Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011). Se aplicó una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada microfotografía pudiendo separar cada CGR, usando una subrutina informática que automatiza tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros IPBasic del programa de análisis de imagen Image-Pro[®] Plus. Así aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen archivada podemos contar las células resultantes con inmunorreacción positiva frente a OHSt o Brn3a, exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) para su posterior análisis.

8.1.4.2 Mapas de isodensidad.

Para estudiar el patrón de distribución de las CGR sobre toda la retina, los datos de densidad celular obtenidos para cada microfotografía se representaron gráficamente como mapas de isodensidad (*ver apartado 4.4.3 resultados*)

Los datos de densidad celular se obtuvieron de los fotomontajes de retinas a plano procesados automáticamente, usando una rutina informática previamente desarrollada al efecto en el programa de análisis de imagen IPP (Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009c; Galindo-Romero y cols., 2011; Vidal-Sanz y cols., 2012). La subrutina principal de procesado, consistió en la división de todos los campos microfotografiados de la retina en áreas de interés rectangulares conocidas de igual tamaño, el número de estas áreas fue de 36. La adquisición de los múltiples campos microscópicos se realizó siguiendo un patrón de muestreo en mapa de bits, capturados de forma contigua, lado a lado, sin espaciado o solapamiento entre ellos. Los mapas de isodensidad, tanto las marcadas con OHSt como las inmunodetectadas con Brn3a, se representaron como una gráfica de curvas de isodensidad coloreada que se generó asignando a cada una de las 36 divisiones de cada campo microscópico un código de color de acuerdo con su valor de densidad celular (CGR/mm²) siguiendo una escala de color de 38 rangos desde 0 (azul oscuro) hasta 4.750 ó más CGR/mm² (rojo).

Los datos de densidad de las CGR fueron exportados y guardados de forma secuencial y ordenada en una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003). Finalmente, estos datos fueron representados como un mapa de isodensidad usando el programa de representación gráfica (SigmaPlot[®] 9.0 for Windows[®]; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU), usando una escala de 38 pasos diferentes (cada una de 125) entre 0 y 4.750 células/mm².

El error en el cálculo de la densidad de las CGR, debido a campos microscópicos ocupados sólo parcialmente por tejido retiniano en el contorno de las retinas a plano, se minimizó por el alto número de áreas de interés con tamaño relativamente pequeño y la ausencia de CGR en la retina periférica (Salinas-Navarro y cols., 2009c).

8.2 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot.

La técnica de inmunotransferencia fue utilizada para analizar el nivel de expresión de proteínas integrales de las células retinianas así como de proteínas quinasas y proteasas que participan en procesos de señalización celular.

8.2.1. Lisado y extracción de proteínas totales.

In vitro

Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 4200 células/ cm² y se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia. Se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS en frío y se adicionaron a cada uno de los pocillos 100 µl de tampón de lisis RIPA (*tabla X*), suplementando con inhibidores de proteasas y fosfatasas (*Halt Protease inhibitor cocktail plus*) en dilución (1:1000). A continuación, las células fueron levantadas con un rascador de plástico y se recogieron en un tubo eppendorf, manteniéndolas a 4°C y se agitaron durante 10 segundos con un agitador *Pellet Pestle* para asegurar la lisis celular, después se centrifugaron a 4°C a 20627 x g durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante, desechando el sedimento con restos de membranas celulares. El material se conservó a -20°C hasta su utilización.

In vivo

Las retinas fueron recogidas tal y como se ha descrito anteriormente, retirando el polo anterior y, a continuación, con ayuda de unas pinzas finas disecando la retina de coroides y esclera. Se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA (*tabla X*), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas, (PMSF (1 mM), Leupeptina (10 µg/ml), Pepstatina (5 µg/ml), Aprotinina (10 µg/ml), NaF (1 mM), Na₃VO₄ (2 mM) a una relación 1:5 (p/v) a 4°C, en hielo. Las retinas se trocearon manualmente con el uso de unas tijeras durante aproximadamente 15 minutos cada muestra, seguidamente se hicieron pasar los homogeneizados 30 veces a través de una pipeta, dejándose 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C y 20627 g durante 15 minutos. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes, se hicieron alícuotas de 10 µl y se guardaron a -20°C.

Tampón de lisis RIPA		
	In vivo	In vitro
Composición	Concentración	Concentración
Tris HCl pH=8	50 mM	25 Mm
NaCl	150 mM	150 mM
NP-40	1%	1%
Na deoxicolato	0.5%	1 %
SDS	0.1%	0.1%

Tabla X. Composición del tampón de lisis utilizado in vivo-in vitro.

8.2.2. Determinación de la cantidad de proteína.

In vitro

La valoración de la concentración de proteínas presente en los extractos celulares, se realizó mediante el kit comercial (*Pierce BCA Protein Assay kit*), basado en la reacción de iones cobre del ácido bicinconínico con las proteínas de la muestra biológica. Este kit permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 20 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. En este ensayo las muestras de proteína cuya concentración se pretendía valorar se diluyeron (1:10) y se aplicaron por triplicado a una placa de 96 pocillos. Para conocer la concentración de proteína se generó una recta de calibrado realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina. A continuación, se añadió el compuesto WR proporcionado con el kit, el cual contiene iones de cobre que forman complejos coloreados con las proteínas a valorar. Transcurridos 30 minutos de incubación a 37°C se midió la absorbancia de los compuestos coloreados obtenidos en un lector de placas (Power Wave XS2, Biotek) a una longitud de onda de 562 nm.

In vivo

La cantidad de proteína total presente en las retinas de ratón, se cuantificó mediante el método descrito por *Bradford* (1976). Este método se basa en la interacción de un colorante, el tinte Azul Brillante de Coomassie G-250, con las proteínas formando un complejo coloreado con absorción a 595 nm.

Las muestras de lisado de retina fueron diluídas (1:1000), se adicionó 1 ml de reactivo de Bradford y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas.

Tanto para la determinación de proteína en los extractos celulares como en la muestra tisular se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como patrón, de la que se prepararon diluciones que contenían en un rango de entre [25-2000] µg/ml de proteína en extractos celulares y, de [0-25] µg/ml en el caso de la recta de calibrado para las muestras de tejido. En cada uno de los casos, se ajustaron las muestras problemas a los volúmenes de los respectivos patrones.

En ambos casos, se prepararon triplicados de cada una de las muestras y se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

8.2.3 Preparación de las muestras.

In vitro

Los extractos fueron descongelados y se centrifugaron a 9167 x g a 4°C durante 5 minutos. Las muestras se prepararon adicionando tampón de carga Laemmli 3X (*tabla XI*). Se desnaturalizaron calentando las muestras a 95°C durante 5 minutos, se dejaron enfriar y se centrifugaron antes de ser cargadas en el gel de electroforesis.

In vivo

Las retinas lisadas y cuantificadas se descongelaron y se prepararon las muestras cuantificadas previamente por Bradford diluyéndolas en relación 1:1 con tampón Laemmli 2X (*tabla XI*). Previamente, se ajustó la cantidad de muestra total a cargar en el gel necesaria para detectar la proteína objeto de estudio. Las condiciones experimentales para cada proteína se detallan más adelante (*apartado 8.2.4.*).

Tampón Laemmli		
Composición	<i>In vivo</i> 3x	<i>In vitro</i> 2x
Tris HCl (pH 7.6)	195 mM pH 6.8	125 mM
Glicerol	30% (v/v)	20%
SDS	9% (p/v)	4%
Azul de bromofenol	0.02% (p/v)	0.02%
B-mercaptoetanol	15% (v/v)	10%
EDTA	-	15 mM

Tabla XI. Composición de los tampones de carga para la preparación de las muestras.

8.2.4 Electroforesis, transferencia y revelado de proteínas.

Las proteínas de los extractos celulares se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE. El porcentaje de poliacrilamida del gel separador (10-15%) y el volumen de los lisados empleados en la electroforesis se determinaron en función de la proteína a estudiar y se ajustaron previamente (*tabla XIV*). En todos los casos, la composición del gel concentrador (4%) fue la misma.

Electroforesis en gel de acrilamida

La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (*tabla XII*) a temperatura ambiente en el sistema mini-protean 3 (Bio Rad) a potencial constante (100-120 V), determinado por el grosor y porcentaje de poliacrilamida del gel durante aproximadamente 2 horas. Uno de los pocillos del gel se reservó para la mezcla control de patrones coloreados de pesos moleculares conocidos.

Transferencia electroforética

Las proteínas fueron transferidas según el procedimiento descrito por Towbin y cols., (1979) utilizando un equipo de transferencia húmeda, aplicándose una intensidad constante de 150 mA 80 minutos hasta conseguir la transferencia total de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.

<i>Tampones Western-Blot</i>			
Electroforesis 5X PH 8.3		Transferencia 10x	
Glicina	0.96 M	Glicina	192 mM
SDS	0.50%	SDS	-
Tris	0.125 M	Tris	25 mM
-		Metanol	20%

Tabla XII. Tampones desarrollo procedimiento Western Blot.

Immunodetección

Bloqueo

Tras finalizar la transferencia, la membrana se incubó 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, compuesta por TBS con Tween-20 al 0.1% (v/v) en el que se había disuelto leche desnatada en polvo al 5% o BSA al 3% (p/v) dependiendo de la proteína estudiada.

Incubación de anticuerpo primario y lavados

Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (*tabla XIII*) diluido en solución de bloqueo, en agitación. Seguidamente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos cada vez alternando TBS con Tween-20 al 0.1%, para eliminar el exceso de anticuerpo.

<i>Anticuerpos 1°</i>	<i>Tipo</i>	<i>Donador</i>	<i>Dilución</i>	<i>Referencia</i>
Anti P-JNK1,2 (Thr183/Tyr 185)	Policlonal	Conejo	1:500	11504 Signalway Antibody (SAB)
Anti SAPK/JNK	Policlonal	Conejo	1:500	9252 Cell Signaling
Anti P-p38 (Thr180/Tyr182)	Policlonal	Conejo	1:1000	9211 Cell Signaling
Anti NPP1	Monoclonal	Ratón	1:100	SC 166649
Anti-amyloid β (clone W0-2)	Monoclonal	Ratón	1:2000	Milipore MABN10
Anti-P2X7 receptor	Policlonal	Conejo	1:1000	Alomone APR-004
Anti solute carrier family 17 member 9 (VNUT)	Policlonal	Conejo	1:500	ABN110 millipore
Anti P38 MAPK	Policlonal	Conejo	1:1000	9212 Cell Signaling
Anti-Glial Fibrillary Acidic	Monoclonal	Ratón	1:400	Sigma G3893

Protein (GFAP)				
Anti-sinaptofisina (clone SVP.38)	Monoclonal	Ratón	1:2000	Sigma S5768
Anti Brn3a(C-20)	Policlonal	Cabra	1:200	SantaCruz sc 31984
Anti cleaved caspase-3 (Asp175)	Policlonal	Conejo	1:1000	9661 Cell Signaling
Anti GAPDH (H-12)	Monoclonal	Ratón	1:500	SantaCruz sc 166574

Tabla XIII. Relación de anticuerpos primarios utilizados para experimentos de inmunotransferencia.

Incubación de anticuerpo secundario y lavados

A continuación, se realizó la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario ligado a peroxidasa en TBS1X-Tween 20 (0.1%) con leche 0.25% (ver anticuerpos, (tabla XIV) a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados como los realizados después de la incubación con el anticuerpo primario.

<i>Anticuerpos 2°</i>	<i>Donador</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Referencia</i>
Anti-IgG de ratón-HRP	cabra	1:10.000	Jackson Immunoresearch	115-035-008
Anti-IgG de conejo-HRP	cabra	1:10.000	Jackson Immunoresearch	111-035-046
Anti-IgG de cabra-HRP	conejo	1:10.000	Jackson Immunoresearch	305-035-008

Tabla XIV. Relación de anticuerpos secundarios utilizados para experimentos de inmunotransferencia.

Detección de la proteína

Finalmente, la membrana se reveló empleando el reactivo ECLTM Western Blotting Detection Reagent o con ECL con mayor límite de detección Super Signal® West Pico Chemiluminiscent Substrate que contiene un sustrato de la peroxidasa quimiluminiscente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reutilización de la membrana (Stripping)

Las membranas fueron re-utilizadas empleando anticuerpos frente a la gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (proteína que permanece invariable en el modelo de estudio durante los diferentes tratamientos que se llevaron a cabo) o frente a JNK, p38 (para las membranas previamente incubadas con la forma fosforilada de dichas proteínas). Para ello, se mantuvieron las membranas a 55°C durante 15-30 minutos con agitación en la solución detallada en la tabla XV.

Solución Stripping	
Composición	Concentración
Tris HCl pH 6.7	62.5 mM
SDS	2% (p/v)
B-mercaptoetanol	100 mM

Tabla XV. Composición de la disolución de stripping.

Posteriormente, se lavaron con TBS 1X-Tween 20 al 0.1 % durante 30 minutos y se continuó con el protocolo de detección con anticuerpos a partir del bloqueo de la membrana.

Densitometría de las películas

La densidad del marcaje inmunoreactivo se analizó empleando el programa Kodak Molecular Imaging. Los datos se normalizaron con respecto a la intensidad de la banda del control de carga correspondiente para cada condición experimental.

8.2.5. Condiciones experimentales para experimentos de distintas condiciones.

Para la detección de cada una de las proteínas estudiadas a lo largo del presente trabajo, se utilizaron diferentes condiciones experimentales en función de las características intrínsecas a la proteína o al anticuerpo seleccionado. Las diluciones de los anticuerpos empleadas se muestran en la tabla XVI.

Proteína	Carga (µg)	% Gel Separador
P2X7	30	10
GFAP	30	10
Brn3a	40	10
Syp	20	10
P-JNK	20	10
P-p38	40	10
JNK	30	10
p38	40	10
VNUT	60	10
NPP1	70	10
GAPDH	30	10
Caspasa-3	130	15%
β-amiloide	60	[7-15] %

Tabla XVI. Condiciones experimentales detalladas en función de la proteína a detectar.

Las condiciones experimentales óptimas para cada una de las proteínas a analizar se muestran en la tabla XVI, la solución de bloqueo se realizó generalmente en leche y/o BSA para proteínas fosforiladas.

8.3 Ensayos de inmunodetección por ELISA.

Se realizaron experimentos de inmunodetección por ELISA para la cuantificación de la expresión de las proteínas P-JNK y P-p38 presente en la línea celular tras la estimulación con BzATP.

Las células R28 se sembraron (3×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos, se privaron 24 horas antes y se incubaron a diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 minutos) con medio o con cada una de las concentraciones de BzATP ensayadas (100, 250 y 500) µM. Además, se pre-incubaron a la concentración de 1 µM, tanto BBG como A438079, durante 30 minutos y se sometieron a exposiciones de BzATP a las concentraciones detalladas anteriormente junto con la presencia de cada uno de los antagonistas en los tiempos establecidos.

Procedimiento experimental de la técnica

A continuación, se detalla el procedimiento llevado a cabo descrito en el kit de ELISA *p38 alpha (Thr180/Tyr182)* y *JNK alpha (Thr183/Tyr185) In-cell*.

Fijación: Se adicionaron 100 µl de solución de fijación durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación y se realizaron varios lavados.

Se adicionaron 200 µl de *Quenching Buffer*, durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavados.

Bloqueo: mediante 200 µl de Solución de Bloqueo, durante 1 hora a 37°C y lavados.

Incubación de anticuerpos: A continuación, se adicionaron 50 µl de los respectivos anticuerpos primarios (Mouse anti-phospho-JNK y Mouse anti-phospho-p38) en dilución (1:1000) durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron varios lavados. Se incubaron con el anticuerpo secundario HRP conjugado Anti-Mouse IgG, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se adicionaron 100 µl del *sustrato TMB*, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, y en oscuridad. Se finalizó la reacción por adición de *solución de parada*. La medida colorimétrica se llevó a cabo en un lector de placas a 450 nm.

9. RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

9.1 Extracción del ARN y cuantificación.

El ARN fue aislado en los ratones C57BL/6J y DBA/2J siguiendo el protocolo de extracción de ARN a partir de muestras de retina mediante el kit comercial Nucleospin[®] RNA/ Protein Kit.

Recogida de muestra y lisis tisular: Tal y como se describió en las sección de Western Blot se extrajeron las retinas y se llevó a cabo el lisado de las mismas añadiendo 350 µl de tampón RP1 y mediante la disgregación mecánica pasando todo el volumen por una jeringa con aguja de 20G aproximadamente 30 veces.

Filtración y centrifugación a 10953 x g durante 1 minuto.

Adición de 350 µl de EtOH 70%, filtrado y centrifugación a 10953 x g durante 30 segundos.

Eliminación de las sales: se añadió 350 µl de MDB y centrifugó durante 1 minuto a 10953 x g.

Digestión de ADN y lavados: Se adicionaron 95 µl de rDNase (preparada 1:10), se incubó a temperatura ambiente 15 minutos y se realizaron lavados con los tampones proporcionados por el kit.

Elución del ARN: Se adicionaron 60 µl de RNase-free y centrifugó a 10953 x g durante 1 minuto.

Cuantificación del ARN

La concentración de ARN en las muestras extraídas se determinó mediante un método fluorimétrico de gran sensibilidad utilizando el reactivo Ribogreen. Para llevar a cabo la cuantificación del ARN se realizó una recta patrón con estándares *Ribosomal ARN* de rango [0.05-1] µg/ml del kit de Ribogreen® RNA Quantitation Reagent and Kit y se midió la emisión de fluorescencia a 538 nm. Las muestras se mantienen a -80°C hasta el momento de la retrotranscripción.

Retrotranscripción

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó por RT-PCR a partir del ARN total de tejido usando el kit “Superscript III first-strand synthesis system” con oligo dT como oligonucleótido de amplificación. Para la primera reacción de preincubación, se mezclaron 200-300 ng de RNA, 1 µl de oligo dT, 1 µl de 10 mM dNTPs y agua DEPC en un volumen final de 10 µl y se incubó durante 5 minutos a 65°C e inmediatamente después 5 minutos en hielo. A continuación, se añadió a cada tubo la mezcla de síntesis de ADNc que contiene 1 µl de tampón 10x RT, 1 µl de 0.1 M DTT, 2 µl de 25 mM MgCl₂, 1 µl de RNasaOUT y 1 µl de Superscript III RT. La

mezcla se incubó a 50°C durante 50 min y se paró a 85°C durante 5 min. Por último, se añadió 1 µl de RNasa H y se incubó durante 30 min a 37° C.

9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl empleando 2 µl del ADNc obtenido y la mezcla de reacción indicada en la tabla XVII:

Preparar la mezcla de reacción (tabla XVII). En el control negativo, se sustituyó el volumen de ADN por un volumen igual de H₂O para biología molecular.

Componente	Mezcla
10x PCR Buffer	5 ul
50x dNTP Mix	1
Forward primer (P2X7E) 10 uM	1
Reverse primer (P2X7E) 10 uM	1
PCR water	
TITANUM™ Taq DNA polymerase	1

Tabla XVII. Componentes de mezcla de reacción para PCR.

Primers	Secuencia	Casa comercial
<i>F-P2X7I</i>	forward 5'- GCACGAATTATGGCACCGTC-3'	Sigma
<i>R-P2X7I</i>	reverse 5'- ACACCTGCCAGTCTGGATTCCT-3'	
<i>F-GAPDH</i>	forward 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'	Sigma
<i>R-GAPDH</i>	reverse 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

Tabla XVIII. Secuencia de los primers utilizados en la PCR.

Reacción de amplificación: Las condiciones de temperatura establecidas para la amplificación de P2X7 fueron 95°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 1 minuto y 68°C durante 1 minuto hasta continuar finalmente a 72°C durante 3 minutos. Las condiciones para la amplificación de GAPDH fueron 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos,

72°C durante 2 minutos y 72°C durante 7 minutos. Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler de Eppendorf. El producto de PCR se mantuvo a -20°C para su conservación.

9.3 Electroforesis.

Las muestras se prepararon tomando 10 µl de cada una de ellas y adicionando a cada una de ellas 2 µl de 6X Orange Loading Dye Solution. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 %, en presencia de bromuro de etidio (1µg/mL). Como marcador de peso molecular conocido se utilizó el patrón de ADN comercial PCR GeneRuler™ Low Range DNA ladder. Los fragmentos de PCR obtenidos se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Kodak GL 200 Imaging System (Kodak, Rochester, NY, USA).

10. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Los nucleótidos presentes en el sobrenadante se determinaron mediante el método cromatográfico de par iónico. Este método consiste en un intercambio selectivo de iones de la muestra y un reactivo de carga contraria que se añade al eluyente, el tetrabutilamonio (TBA), permanentemente unidos a una matriz polimérica. La muestra es retenida porque reemplaza los contraiones de la fase estacionaria con sus propios iones. La muestra es eluída de la columna en función del pH, la fuerza iónica de la fase móvil, haciendo que ésta desplace los iones de la muestra de la fase estacionaria. La retención, por tanto, está directamente relacionada con el número de fosfatos que presente el nucleótido, cuanto mayor sea éste mayor será la retención y más tarde eluirá el compuesto (Ramos-Salazar y Baines, 1985).

10.3.1 Aislamiento de la retina para el análisis por HPLC.

Se analizaron ratones C57BL/6J y ratones DBA/2J para cada uno de los diferentes estadios objeto de estudio: 3, 9, 15 y 23 meses de edad. Así como ratones B6C3F1 y ratones B6C3F1-Tg (APP, PSEN1) a 3, 14 y 17 meses de edad. Ambos ojos fueron enucleados mediante unas tijeras estériles curvadas para poder seccionar el

nervio óptico. Todo el procedimiento se realizó con extremo cuidado para evitar dañar el tejido nervioso. Los globos oculares se mantuvieron en solución Ringer estéril y fueron diseccionados bajo un microscopio estereoscópico. Se disecó la córnea con una tijera de disección en ángulo y la ayuda de una pinza de 0.8 mm. Se retiró el iris y el cuerpo ciliar y, mediante una ligera presión se retiró el cristalino. Se separó la retina de la esclerótica y se limpió retina de coroides, epitelio pigmentario y vítreo.

10.3.1.1 Determinación de los niveles de ATP y Ap₄A tras la estimulación retiniana.

La determinación de los niveles de ATP en retinas estimuladas se llevó a cabo en el modelo glaucomatoso y en el modelo de enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, solo en el primer modelo se realizaron medidas para la determinación del Ap₄A.

Procesamiento del tejido

Las retinas aisladas fueron divididas en dos grupos, las retinas control y las retinas estimuladas. Las retinas control se mantuvieron en solución de Ringer (tabla II) a 37°C durante 1 minuto y las retinas estimuladas fueron incubadas en una solución de cloruro de potasio (KCl) 59 mM en Ringer durante 1 min. Los sobrenadantes (1000 µl) se recogieron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo durante 5 min. A continuación, se procesaron las muestras según el protocolo descrito por Lazarowski (2010). Los tubos se calentaron en un termobloque a 98°C durante 2 minutos se mantuvieron en hielo durante 10 min. Para precipitar las proteínas, se centrifugó cada uno de los tubos a 15493 g durante 10 minutos a 4°C. Las concentraciones de ATP liberado se midieron utilizando una HPLC de fase reversa y detección UV/VIS.

Medida de la concentración de ATP en las retinas estimuladas.

Se descongelaron las muestras y se agitaron durante aproximadamente 30 segundos. Los niveles de ATP liberado tras la estimulación a la que fueron sometidas las retinas, fueron analizados en 250 µl de los sobrenadantes recogidos. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para realizar las medidas cromatográficas modificando ligeramente el porcentaje de acetonitrilo empleado (20%) en función del paso del tiempo de la columna cromatográfica.

10.3.1.2 Determinación de los niveles de ATP total.

Procesamiento del tejido

Las muestras de tejido de ratones glaucomatosos se homogeneizaron con ayuda de unas tijeras de disección y se llevó a cabo una lisis mecánica en 10 vols. de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml. A continuación, se centrifugaron a 22000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos eppendorf y se neutralizaron con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 2.5% ajustado a un valor de pH de 7.5 aproximadamente. Las muestras se congelaron hasta su análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Medida de la concentración ATP en las retinas lisadas

Se descongelaron las muestras y se agitaron durante aproximadamente 30 segundos. Los niveles de ATP, fueron analizados en muestras de aproximadamente 20 µl de los extractos de tejido en ácido tricloroacético.

Se equilibró el sistema cromatográfico con una fase móvil, tamponada a pH 7.5 con KOH (5M), apropiada para poder visualizar los picos del nucleótido correspondiente con claridad y separados del frente del cromatograma. La solución se desgasificó mediante un sonicador de baño durante 15-20 minutos. La velocidad de flujo establecida a lo largo de los ciclos cromatográficos fue de 2 ml/min.

Fase móvil _{ATP total}	
Composición	Concentración (g/l)
KH₂PO₄	1.36
TBA	0.679
CH₃CN	17%-20%

Tabla XIX. Composición fase móvil.

Para la obtención de un patrón que nos sirva de referencia para las mediciones posteriores, se llevaron a cabo inyecciones de 10 µl de los estándares (10 µl de ATP 100

μM y 10 μl de Ap_4A 100 μM) de una mezcla de los estándares (5 μl de ATP 100 μM y 5 μl de Ap_4A 100 μM). Se obtuvieron sus respectivos cromatogramas con un área y a un tiempo de retención determinado, con los que se pudo llevar a cabo la calibración del experimento con cada uno de los nucleótidos a estudiar. A continuación, se realizaron inyecciones de entre 10 y 20 μl de cada una de las muestras y se analizaron los correspondientes cromatogramas. La medida de ATP fue realizada a una longitud de onda de 254 nm y las mediciones obtenidas se dieron en picomoles/mg retina.

10.3.2 Extracción de humor acuoso para el análisis por HPLC.

La extracción de humor acuoso de los ratones control y glaucomatosos, se llevó a cabo bajo anestesia general mediante una i.p de una mezcla de ketamina-xilacina (*ver apartado 4.1.1*). Se inmovilizó el globo ocular con ayuda de unas pinzas curvas y forceps, extrayéndose aproximadamente 2 μl de humor acuoso de cada ojo utilizando una jeringa con una aguja de 30 G. Todo el procedimiento se realizó bajo un estereomicroscopio. Posteriormente, la muestra de humor acuoso se diluyó hasta un volumen final de 10 μl . A continuación, se procesaron las muestras, para la eliminación de la parte proteica, tal y como se ha descrito en la sección anterior (*apartado 10.3.1.1*).

Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas en las determinaciones anteriores.

11. MICROFLUORIMETRÍA. DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

La determinación fluorimétrica de calcio en la línea celular R28 fue llevada a cabo empleando la técnica descrita por (Grynkiewicz y cols., 1985), basada en el empleo de la sonda fluorescente Fura-2 AM. El indicador Fura-2, es un compuesto polianiónico hidrofílico que une Ca^{2+} de forma específica. En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster, Fura-2 AM, capaz de atravesar la membrana plasmática de las células. Una vez en el citosol, el enlace éster es hidrolizado por esterasas inespecíficas de modo que el Fura-2 se libera y queda confinado en el citosol, donde puede unirse al calcio libre. La formación de este complejo da lugar a la emisión de fluorescencia con

un máximo a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose al tiempo que se produce el desplazamiento del espectro de excitación de 380 a 340 nm (figura 7).

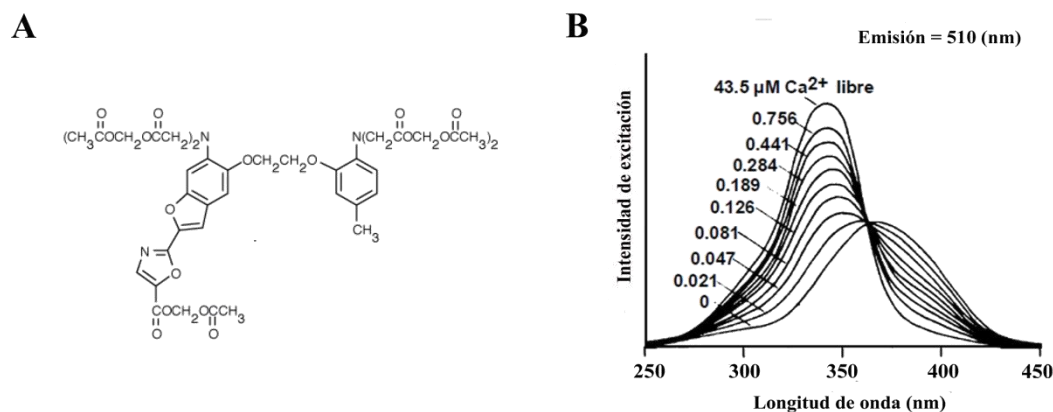


Figura 7. (A) Estructura de la sonda fluorescente Fura-2. (B) Espectros de excitación de la sonda fluorescente para el Ca^{2+} Fura-2

Determinación microfluorimétrica de calcio libre intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en células R28.

Las células se sembraron un día antes de la realización de la medida de calcio, en cubreobjetos redondos de vidrio de 15 mm de diámetro a una densidad de 40.000 células/ cm^2 . Para llevar a cabo la entrada de la sonda fluorescente, los cubres se incubaron con una solución 5 μM de Fura-2AM en medio Locke (tabla II) en oscuridad, durante 45 minutos a 37°C. A continuación, los cubres se incubaron en una solución salina Locke normal para detener la carga de la sonda.

En el momento de realizar los ensayos los cubreobjetos se pegaron con grasa de vacío (hidrófoba) a la parte inferior de una cámara de perfusión de metacrilato. Esta cámara se situó sobre la platina de un microscopio de epifluorescencia y se conectaron a la cámara tubos de silicona de entrada y salida para las soluciones de perfusión. Las soluciones de entrada se manipularon mediante un controlador de válvulas y se mantuvo mediante un termostatizador a 37°C, y éste sistema a su vez, a una altura suficiente para que el flujo se mantuviese constante a 1.5 ml/min por diferencia de presión hidrostática. Tras llegar a la cámara el medio de perfusión se aspiró de forma continua mediante una bomba de vacío. Este sistema de perfusión continua que se

acumule cualquier metabolito que pueda salir de las células durante la perfusión, o bien, cualquier producto de hidrólisis de los fármacos aplicados. Todos los agonistas (ATP, BzATP y UTP 100 μM) y/o antagonistas utilizados (A438079, 5 μM y suramina 100 μM) se disolvieron en medio Locke. Los agonistas se aplicaron durante 30 segundos y los ensayos con antagonistas se incubaron durante 5 minutos antes y durante la aplicación del agonista.

Una vez montada la cámara sobre el microscopio, las células se iluminaron alternativamente con luz de 340 y 380 nm, modificando filtros por control del obturador. La selección de longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de Fura-2 saturadas de calcio (340) y Fura-2 libre de calcio (380). Del mismo modo, se comprobó que el punto isobéptico del Fura-2 (360 nm) coincidía con el descrito por (Castro y cols., 1994) (*figura 7*).

La luz fue reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicroico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2, de 510 nm, atraviesa el espejo dicroico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER, después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda centrado a 510 nm. Para hacer las medidas de fluorescencia se usó un objetivo NIKON 20x. Los registros de fluorescencia que se muestran en el presente trabajo corresponden a la variación temporal de fluorescencia de una región elíptica situada sobre las neuronas. Estos registros se muestran como la relación existente entre la fluorescencia a 340 y 380 nm (F_{340}/F_{380}) en función del tiempo. Antes de calcular la razón entre ambas longitudes de onda, se sustrajeron los valores de fluorescencia basal de cada una de las imágenes recogidas para cada longitud de onda (*figura 7*). Todo el equipo estuvo controlado por un ordenador con un software MetaFluor 6.3r6 PC.

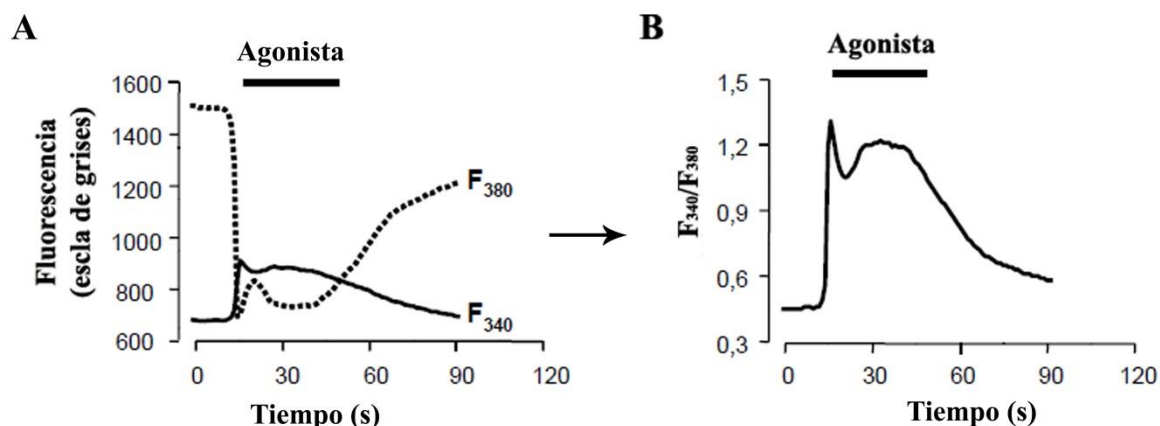


Figura 8. Cálculo de la relación de fluorescencia a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm. (A) Intensidad de fluorescencia a las dos longitudes de onda de excitación registradas. (B) Los registros temporales obtenidos se dividen entre si para obtener el ratio de fluorescencia F340/F380.

12. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR.

El estudio de supervivencia o viabilidad celular frente al tratamiento con BzATP se llevó a cabo en neuronas R28 utilizando el compuesto Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Este ensayo colorimétrico cuantifica las células metabólicamente activas capaces de llevar a cabo la reducción del reactivo MTT (soluble y de color amarillo) a un compuesto insoluble de color azul-púrpura (formazán). Esta reducción es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa pudiendo determinar la funcionalidad de las mismas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado pudiendo determinar la actividad reductora midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm, a la que se sitúa el máximo de absorbancia del formazán (Mosmann, 1983; Denizot y Lang, 1986).

Las células se incubaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 20.000 células/ml en presencia de concentraciones crecientes de BzATP (previa privación) [100-2000 μ M] durante 24 horas. Se ensayaron también concentraciones de 100 y 250 μ M BzATP en presencia de los respectivos antagonistas BBG y A43 a concentraciones

de 1 μM . Transcurridos los tiempos de incubación, se retiró el sobrenadante de cada uno de los pocillos y se adicionaron 400 μl de la solución de MTT (0.5 mg/ml) y se agitó, dejando incubar durante 2 horas a 37°C y en oscuridad. Al finalizar el periodo de incubación, se lisaron las células añadiendo a cada pocillo 350 μl de DMSO. Se trasvasaron 250 μl de cada uno de los pocillos a una placa de 96 pocillos y, finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm con un sistema lector de placas. Se incluyó un blanco de medida y además se restó para cada pocillo el valor de la absorbancia *background* (absorbancia intrínseca del plástico de la placa) de medida a 690 nm. Los valores numéricos obtenidos de los experimentos de MTT se expresaron como porcentaje de la viabilidad celular con respecto a las células control (no tratadas). El efecto de cada dosis del agonista así como de los correspondientes antagonistas se estudió por triplicado.

13. DETECCIÓN DE APOPTOSIS CELULAR.

13.1 Detección morfológica de la muerte celular.

Mediante microscopía confocal, se realizó un seguimiento morfológico de la evolución de las células sometidas al tratamiento con BzATP. Para ello, se trataron con diferentes concentraciones de BzATP (100-2000) μM y se estableció cualitativamente el avance del proceso apoptótico. Las células fueron cultivadas en placas multiwell de 24 pocillos y se observaron a diferentes concentraciones de agonista. La figura 9A muestra las R28 que se observan normalmente en cultivo, la mayoría presentan una forma fusiforme y, tras la observación detallada se diferencian algunos tipos celulares con forma estrellada. Tras la estimulación de las células con concentraciones crecientes de BzATP (*figura 9B-F*), se observaron como muchas de las células comenzaban a sufrir una reducción citoplasmática, además de observar la apariencia vesiculada hasta llegar a la desintegración total del cuerpo celular.

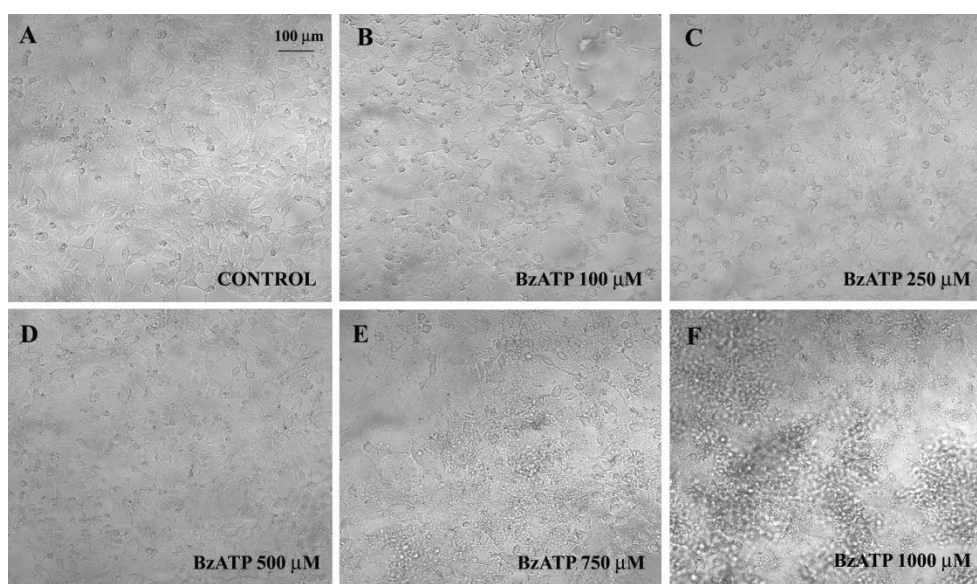


Figura 9. Evolución de la línea R28 E1A-NR.3 cultivadas en medio DMEM tras la exposición a concentraciones crecientes de BzATP [100-1000] μM .

13.2 Cuantificación de apoptosis mediante caspasa-3.

Dentro del estudio de los procesos de muerte celular programada, hay multitud de métodos disponibles para poder evaluar la pérdida celular. Muchos de ellos están basados en actividad metabólica o cambios en la expresión proteica. Llevamos a cabo el estudio de la misma, por citometría de flujo, de modo que pudiera ser posible discriminar poblaciones celulares en procesos de necrosis y en apoptosis.

Procedimiento experimental

Las células se incubaron en botellas F25 a una concentración de 12.000 células/cm² en presencia de concentraciones crecientes de BzATP (previa deprivación durante 24 horas) [100-2000 μM] durante 48 horas. Se ensayaron también concentraciones de 250 y 500 μM BzATP en presencia de los respectivos antagonistas BBG y A438079 a concentraciones de 1 μM . Transcurridos los tiempos de incubación, se analizó la activación del marcador de apoptosis caspasa-3/7 por citometría de flujo empleando el kit comercial MuseTM Caspase-3/7. Los cultivos celulares sometidos a los distintos tratamientos, se tripsinizaron y tras realizar el conteo de las células se preparó

una suspensión celular a la densidad adecuada (1.5×10^6 células/ml) en un tampón suministrado con el kit. Para la detección de la actividad de caspasa-3/7 se incubaron alícuotas de 50 μ l de la suspensión celular con el agente MuseTM caspasa-3/7 NucView^{TM4} proporcionado por el kit durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad. El agente contiene una sonda de unión al ADN asociada al péptido sustrato DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), tras el corte por caspasa 3/7 activa, la sonda se libera y se une al ADN generando la emisión de fluorescencia. A continuación, las células se incubaron durante 5 minutos con el marcador de muerte celular 7-AAD empleado como indicador de integridad de la membrana y muerte celular. El incremento en fluorescencia de las células se determinó mediante el citómetro de flujo Muse[®] Cell Analyzer. La emisión de luz de excitación se realizó a 488 nm con un láser de fluorescencia verde class IIIb, registrándose la emisión de fluorescencia a 515 nm (actividad de caspasa 3/7) y a 647 nm (7-AAD).

13.2.1 Análisis de las muestras mediante citometría de flujo.

Este kit permitió determinar el porcentaje celular en varios estadios de apoptosis mediante caspasa 3/7. Además el marcador celular 7-AAD se utilizó como indicador de integridad de la membrana y muerte celular. De este modo, se pudieron distinguir diferentes estados de muerte celular en función de la diferente tinción frente a los dos marcadores: células vivas: caspasa 3/7 (-) y 7-AAD (-); células apoptóticas: caspasa 3/7 (+) y 7-AAD (-); células en apoptosis tardía-necrosis: caspasa 3/7 (+) y 7-AAD (+) y células en necrosis: caspasa 3/7 (-) y 7-AAD (+).

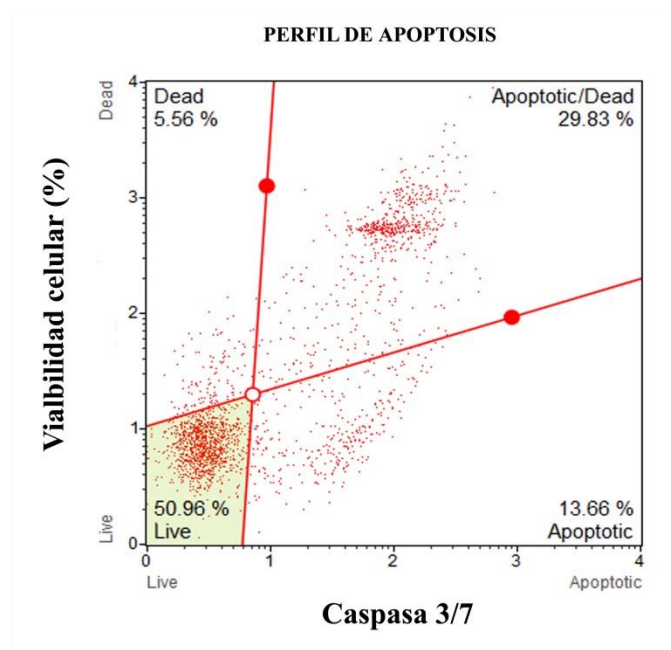


Figura 10. Representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con caspasa-3/7 y 7-ADD.

El gráfico que se obtiene representa el porcentaje de células vivas, en apoptosis, en apoptosis tardía y necrosis pudiendo establecerse una división del mismo en cuatro cuadrantes: En el cuadrante inferior izquierdo aparecen células viables, en el inferior derecho aparecen las células en apoptosis temprana, en el superior derecho apoptosis tardía y en el superior izquierdo necrosis.

13.2.2 Obtención de lisados celulares y determinación de la actividad de la caspasa-3.

La actividad de la caspasa-3 se determinó mediante el Kit de Caspase-3 Fluorescence Assay.

Las retinas de los ratones control y glaucomatosos, se extrajeron tal y se lavaron con PBS. A continuación, fueron homogeneizadas en un tampón de lisis (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 10 mM DTT, and 100 mM EDTA, 10 µg de leupeptina, 2 µg/ml de

pepstatina, 2 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF, and 0.03% digitonina) en dilución (1:5) a 4°C durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y, tras ser valorado, mediante el uso del reactivo de Protein Assay Reagent Bradford, se conservaron a -20°C hasta su uso.

Procedimiento medida actividad:

Se descongelan las muestras y se centrifugaron a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a pocillos individuales en una placa de 96. Los lisados fueron testados a diferentes diluciones y curva de calibrado y fueron incubados con 100 µl de sustrato de caspasa-3 (caspase-3 substrate, N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110 (Ac-DEVD-N'-MC-R110). Se evaluó la caspasa-3 mediante la medida de la ruptura del sustrato fluorogénico y se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 535 nm de emisión en el lector de placas de fluorescencia.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética \pm la desviación estándar de la media (SD). Los resultados realizados en los modelos animales mostrados en este trabajo, corresponden a un mínimo de 4 ratones. Así como los experimentos realizados en cultivos celulares corresponden a un mínimo de tres experimentos, realizados con tres cultivos R28 diferentes. La comparación entre medias se realizó con un análisis de t de student. Los niveles de significación establecidos fueron: $p < 0.001$, diferencia extremadamente significativa (***) ; $p < 0.01$, diferencia muy significativa (**) y $p < 0.05$, diferencia significativa (*). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InStat3 (GraphPad InStat[®] 3 para Windows[®], La Jolla, CA). Los niveles superiores a 0.05 se han tomado como no significativos.

El análisis de los registros electroretinográficos se realizó con los criterios establecidos para la normalización de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV) para las medidas de amplitud y tiempo implícito de las

ondas estudiadas. Se calculó la estadística descriptiva; la normalidad de la distribución de los datos se examinó con (Prueba *t* de Student desapareada o independiente con corrección de Welch) para la comparación entre la respuesta media de amplitud de los ojos derechos, a medida que progresaba la patología, en las condiciones lumínicas de $-3.69 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Como un intento de estimar una posible interrelación entre las progresiones de la respuesta a lo largo de los tiempos estudiados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre los grupos de animales diferentes así como t-test en los casos necesarios. La significancia estadística fue colocada en una $p < 0.001$ para todas las pruebas.

Para el análisis estadístico del contaje de CGR de las retinas en plano se utilizó el programa SigmaStat[®] 3.1 for Windows[®]). La significación estadística se situó en $p < 0.05$ para todos los test estadísticos. Para comparar los datos cuantitativos de número total de CGR, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos y el test de Mann-Whitney para comparar los datos de dos grupos.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN LA DEGENERACION GLAUCOMATOSA.

Para caracterizar el modelo animal de glaucoma en lo que se refiere a la PIO se realizó un análisis tonométrico en cada uno de los animales a lo largo del tiempo. Los estudios de PIO se llevaron a cabo en los ojos derecho e izquierdo de ratones DBA/2J entre 3 y 15 meses y su respectivo grupo control.

Se encontraron numerosas dificultades técnicas en el procedimiento experimental debido a la presencia de calcificaciones y úlceras en las córneas de los animales glaucomatosos (John y cols., 1998). Este hallazgo se ve incrementado con la evolución de la patología. Además se detectaron heterogeneidades en la córnea debido al aumento de grosor previamente descrito en estos ratones (Inman y cols., 2006).

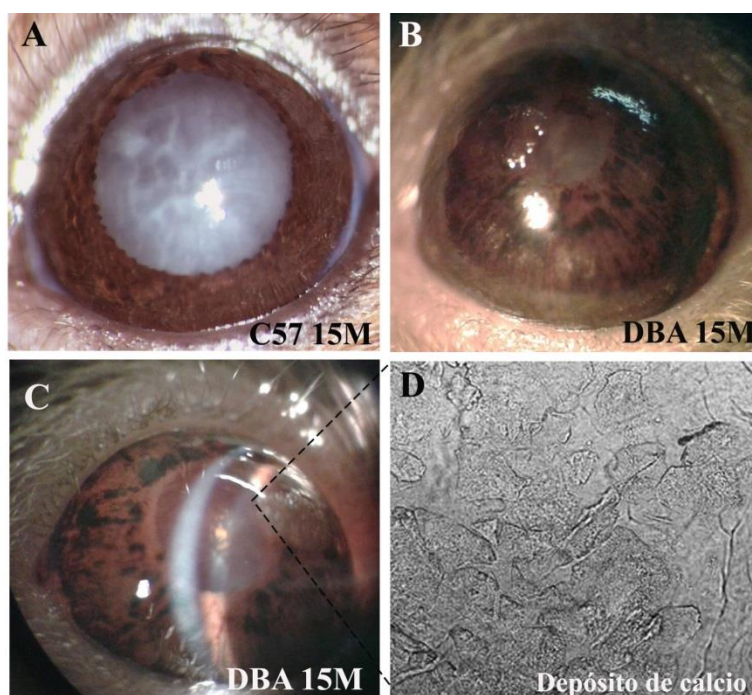


Figura 1. Evaluación de la superficie corneal en el ratón C57BL/6J (A) y DBA/2J (C-D) a los 15 meses de edad mediante lámpara de hendidura. Se observa un incremento del deterioro del pigmento del iris propio de la patología con respecto al ratón control (A-B, C). Sección transversal en la que se muestra un depósito de sales de calcio en la córnea del modelo de ratón glaucomatoso (C). Fotografía por microscopia confocal de un depósito de calcio representativo (D).

Los animales se dividieron en diferentes grupos en función de las edades establecidas y definidas en la metodología de esta tesis: 3, 6, 9, 12 y 15 meses y formados por 8 ratones enfermos y, sus respectivos controles. Se midieron ambos ojos en todos los ratones objeto de estudio. A los 3 meses, se realizaron las mediciones de la PIO en los ratones control, C57BL/6J, como garantía de que el seguimiento tonométrico era correcto. En la figura 2, se muestran los valores promedio de PIO de cada uno de los ojos. Se observa cómo, a partir de los 9 meses, los valores de PIO del modelo animal DBA/2J se incrementan, encontrándose aproximadamente un 51% de los mismos por encima de los valores basales detectados a los 3 meses incrementándose hasta los 12 meses de edad.

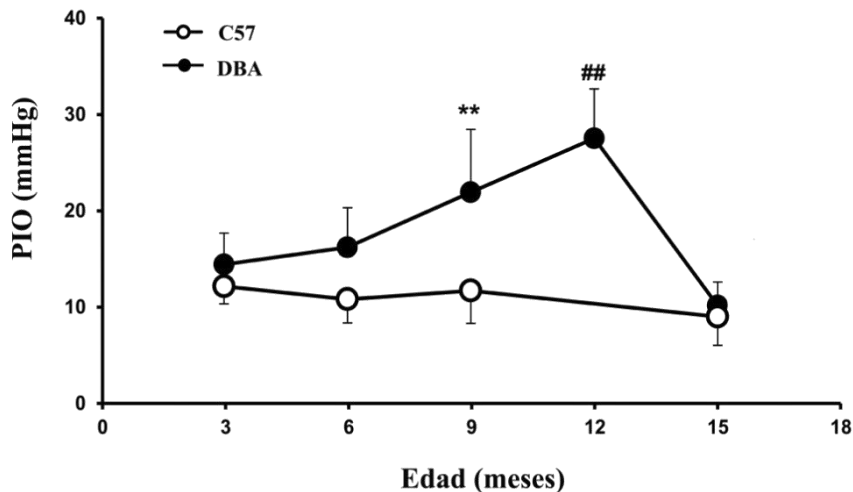


Figura 2. Evolución de las medidas de PIO en ambos ojos de ratones C57BL/6J y DBA/2J (n=8) en función de la edad. Se muestra cómo se produce el incremento de los valores de presión intraocular a partir de los 9 meses. Los círculos negros corresponden a medidas en DBA/2J y los círculos blancos corresponden a valores de C57BL/6J. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de mediciones de cuatro camadas de ratones. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores del control en cada caso, y con # cuando se comparó con la evolución de la patología (** $p < 0.01$).

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL MODELO GLAUCOMATOSO.

Para realizar un seguimiento de la función visual del modelo múdo de degeneración glaucomatosa se evaluó la respuesta electroretinográfica de la retina. Los

registros ERG se realizaron en los ojos derechos de ratones C57BL/6J y DBA/2J en diferentes estadios de tiempo con el objetivo de analizar la respuesta electrofisiológica en cada caso. Para estudiar la evolución del desarrollo del glaucoma, los ratones DBA/2J fueron procesados en grupos de ocho y con sus correspondientes controles a los 3, 6, 9 y 15 meses y se evaluó la STR y las 5 respuestas ISCEV (datos no mostrados).

Los registros STR se realizaron bajo estímulos luminosos (-5.00 a -4.09 $\log \text{cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$). Se observó como a medida que aumenta la intensidad del estímulo luminoso la amplitud del pSTR y nSTR aumentaba de forma exponencial, tanto en ratones control como glaucomatosos (*figura 3*). No se detectó *onda a* para intensidades de luz inferiores a -2.94 $\log \text{cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$. La *onda b* también aumentó de manera exponencial, alcanzando su máximo con estímulos de -2.94 $\log \text{cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$. La respuesta fotópica del ERG se obtuvo para la intensidad de la luz de -1.34 $\log \text{cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ después de 5 minutos de adaptación a la luz, pero no se observaron cambios significativos (datos no presentados).

Para cada edad se compararon los valores absolutos de amplitud de respuesta para cada componente del ERG estudiado en ratones glaucomatosos con respecto a los valores absolutos de ratones control y, a continuación, se realizó el seguimiento de la amplitud de respuesta en función de la progresión de la degeneración glaucomatosa.

2.1 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 3 meses.

Los ERG de los ratones control ($n=8$) mostraron una respuesta del componente pSTR inferior cuando se comparaban con los ratones DBA/2J, sin existir una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los porcentajes de respuesta de los ratones C57BL/6J, tal y como se muestra en la *figura 3*.

Se observó un incremento de las amplitudes de respuesta de los ratones glaucomatosos con respecto a los respectivos controles, que podría estar indicando la diferencia “basal” intrínseca a cada cepa y sugerir una discusión en torno al establecimiento del modelo C57BL/6J como control del ratón DBA/2J. De esta manera, se debería establecer como control aquel estadio donde aún no se han producido manifestaciones fenotípicas de la patología, es decir, a los 3 meses de edad.

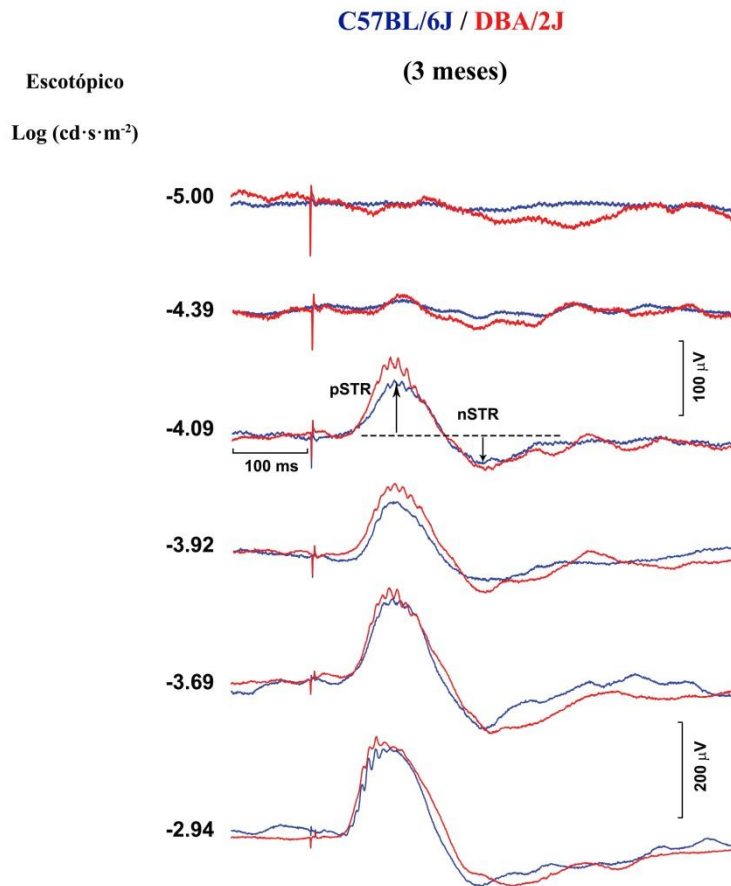


Figura 3. Registros electroretinográficos escotópicos de ratones C57BL/6J y DBA/2J a los 3 meses. Ejemplos de registros ERG representativos en un ratón control (trazo azul) y en un ratón glaucomatoso (trazo rojo). La intensidad del estímulo luminoso está indicado a la izquierda de los registros ERG en log cd·s·m⁻².

2.1.2 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 9 meses.

A los 9 meses de edad, en la respuesta pSTR, se apreciaron diferencias significativas entre los ratones control y los ratones glaucomatosos. Los registros electroretinográficos de animales representativos mostraron una reducción de aproximadamente un 15.90 % (t-test, $p < 0.01$) con respecto al control a intensidades luminosas de -3.69 log cd·s·m⁻².

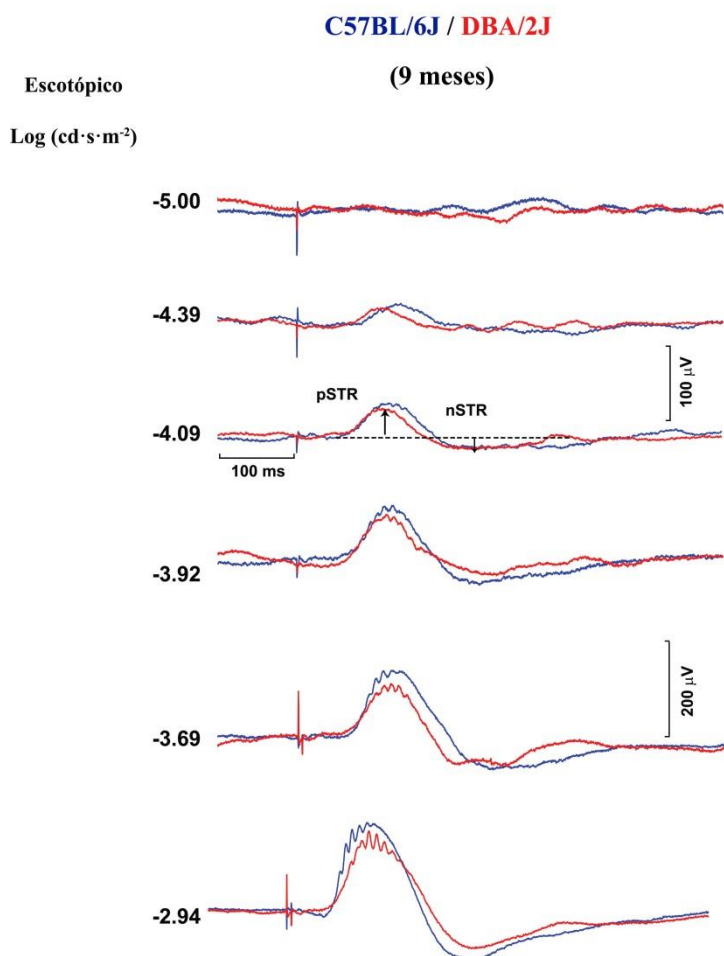


Figura 4. Registros electroretinográficos escotópicos de ratones C57BL/6J y DBA/2J a los 9 meses. Ejemplos representativos de registros ERG representativos en un ratón control (trazo azul) y en un ratón glaucomatoso (trazo rojo). La intensidad del estímulo luminoso está indicado a la izquierda de los registros ERG en log cd·s·m⁻².

2.3 Estudio comparativo C57BL/6J y DBA/2J a los 15 meses.

A los 15 meses de edad, la respuesta pSTR se vio reducida en un 35 % a intensidades luminosas de -3.69 log cd·s·m⁻² con respecto a los ojos control, existiendo una diferencia significativa (t-test; $p < 0.001$). En este estadio, los registros ERG escotópicos (intensidades de -2.94 log cd·s·m⁻²) registrados en los ojos enfermos también mostraron diferencias significativas, encontrándose las amplitudes de la onda b un 26 % por debajo de los valores basales en el correspondiente control (t-test; *** $p < 0.001$).

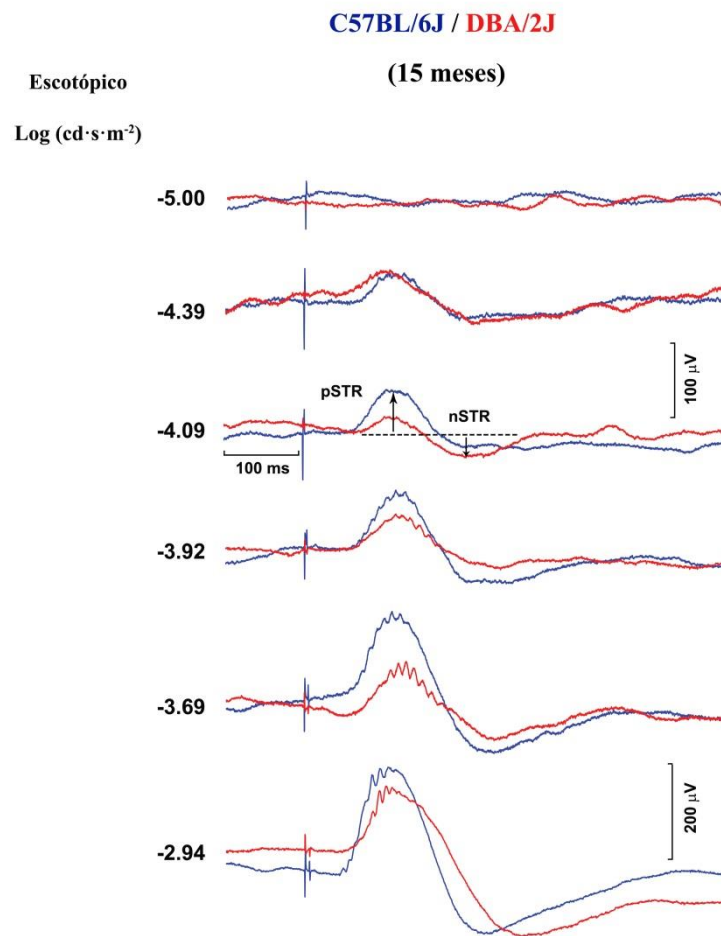


Figura 5. Registros electroretinográficos escotópicos de ratones C57BL/6J y DBA/2J a los 15 meses. Ejemplos de registros ERG en un ratón control (trazo azul) y en un ratón glaucomatoso (trazo rojo). La intensidad del estímulo luminoso está indicado a la izquierda de los registros ERG en log cd·s·m⁻². Existe una clara reducción en las respuestas pSTR y nSTR de los ojos glaucomatosos respecto a los ojos control.

Los valores absolutos de la amplitud de respuesta de la STR a los 15 meses en los ratones DBA/2J muestra una reducción estadísticamente significativa para la mayoría de los estímulos presentados respecto a los ratones control (*figura 5*), adquiriendo valores similares al control cuando se aplicaban intensidades luminosas mayores, es decir, cuando se aplicaban intensidades de luz cercanas a la necesaria para obtener la respuesta correspondiente a los bastones.

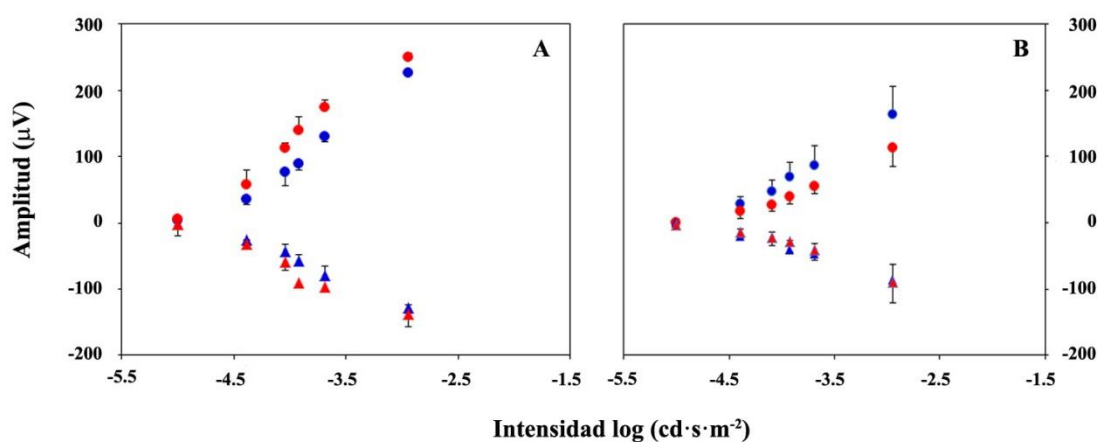


Figura 6. Representación gráfica de las amplitudes promediadas versus intensidad de estímulo en los ojos derechos de ratones C57BL/6J (puntos azules) y DBA/2J (puntos rojos) a 3 (A; n=8 para cada cepa de ratón) y 15 meses (B; n=8 para cada cepa de ratón). Los datos corresponden a nSTR (círculos azules y rojos) y a pSTR (triángulos azules y rojos). La reducción significativa de las amplitudes de pSTR en DBA/2J de los 3 a 15 meses se ve acusada en ambas respuestas ($p < 0.001$).

2.4 Evolución temporal de la degeneración glaucomatosa entre 3 y 15 meses.

Tal y como se ha mostrado en los apartados anteriores, se analizaron los registros STR en C57BL/6J y DBA/2J considerando las diferencias significativas entre ambas cepas en cada uno de los estadios.

Además, se compararon las amplitudes de cada una de las cepas con respecto a la edad para poder evaluar la posible influencia del envejecimiento en cada grupo de animales. Las amplitudes de respuesta en los animales disminuyeron con el aumento de la edad, el STR de los controles no mostró diferencias significativas con respecto a las diferentes etapas de tiempo estudiado. Sin embargo, la disminución fue notable en ratones DBA/2J, confirmando, de esta manera, que la pérdida funcional era originada por el desarrollo de la patología.

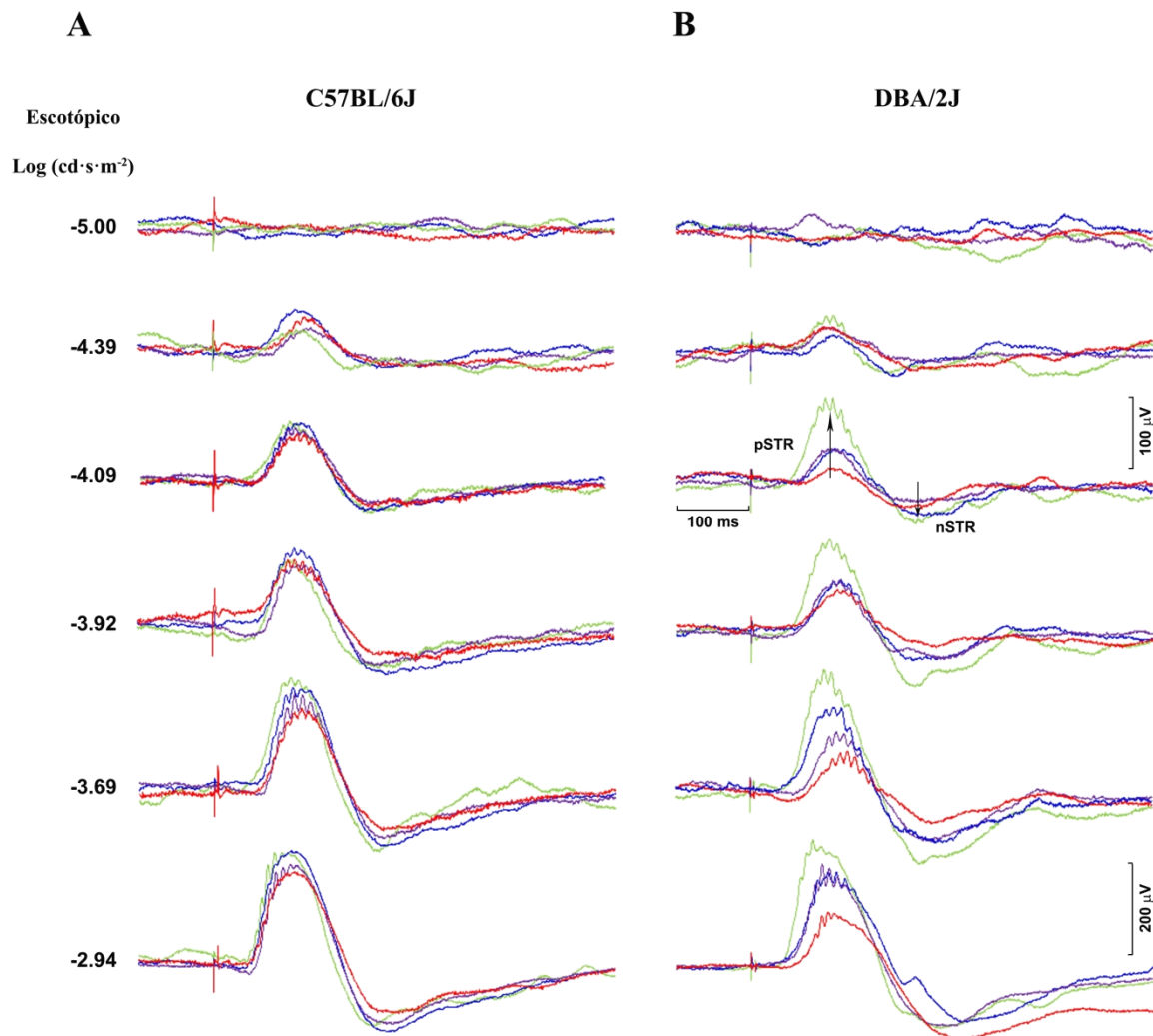


Figura 7. Evolución temporal de los registros electroretinográficos escotópicos (STR) entre los 3 y los 15 meses de edad en C57BL/6J (A) y DBA/2J (B). La respuesta de la retina interna fue registrada bajo condiciones de adaptación a la oscuridad. Al aumentar la intensidad del impulso lumínico, cada respuesta STR (amplitud) se incrementó, estableciéndose un rango de intensidad entre -5 y -2.94 log $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ registrados. Se muestran los registros obtenidos para 3 (trazo verde), 6 (trazo azul), 9 (trazo morado) y 15 (trazo rojo) de meses de edad.

La figura 7 muestra la evolución de la amplitud de los registros STR en ratones C57BL/6J y ratones DBA/2J en el tiempo y su diferente comportamiento. Se analizaron los resultados de los diferentes estadios en los ratones DBA/2J. Los registros STR en ratones DBA/2J ($n = 8$) se compararon a los 3 y 6 meses y mostraron una reducción en la respuesta pSTR del aproximadamente 49 % (t-test, $p < 0.001$). De tres a nueve meses de edad: se observaron diferencias en las amplitudes de las ondas del ERG,

encontrándose una reducción de la respuesta pSTR en un 40 % con respecto a 3 meses (t-test, $p < 0.001$). De tres a quince meses de edad: La diferencia entre la media de amplitud pSTR en ratones DBA/2J de 15 y 3 meses fue del 68% (t-test, $p < 0.001$) (figura 7).

Existe una ligera disminución dependiente de la edad en las amplitudes obtenidas de 3 a 15 meses de edad tanto en los ratones C57BL/6J como en los DBA/2J. Este descenso se ve incrementado en los ratones glaucomatosos como consecuencia de la evolución de la patología.

Las amplitudes de las ondas se calcularon para cada grupo de animales, así como, la diferencia porcentual entre los ojos de DBA/2J y los ojos control.

3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE NUCLEÓTIDOS EN EL GLAUCOMA.

Los nucleótidos juegan un papel clave en la neurotransmisión y neuromodulación del sistema nervioso central. El ATP es sintetizado, almacenado en vesículas y liberado al medio extracelular cuando le llega un potencial de acción o a través de otros sistemas de membrana. Una vez en el medio extracelular, los receptores de nucleótidos denominados P2, serán susceptibles de ser activados por la presencia del ATP iniciándose la cascada de señalización intracelular implicada, que varía según el subtipo de receptor purinérgico. A continuación, se analizarán los niveles de dos de los nucleótidos vinculados a la degeneración glaucomatosa, el ATP y el Ap₄A.

3.1 Determinación de los niveles de ATP y Ap₄A extracelular en retinas estimuladas.

La determinación de los niveles de ATP y Ap₄A en condiciones normales (de “no estimulación”) y tras la estimulación con KCl 59 (mM) fueron llevadas a cabo mediante HPLC (*apartado 10.3.1.1 de material y métodos*) dando lugar a resultados reseñables.

3.1.1 Determinación de los niveles de ATP extracelular.

La evolución de la concentración de ATP de los ratones C57BL/6J en los diferentes intervalos de tiempo establecidos, mostró una disminución gradual en la liberación extracelular basal (condiciones de “ausencia de estimulación”) y estimulada (figura 8). Por el contrario, cuando se analizó la misma progresión en los ratones DBA/2J, no se encontraron cambios significativos en los niveles basales de ATP manteniéndose constante en valores en torno a los encontrados a los 15 meses (1.05 ± 0.50 pmol/mg retina) hasta los 23 meses de edad en los que se detectó un incremento obteniéndose valores en torno a 8.13 ± 0.57 pmol/mg retina (figura 9).

La liberación de ATP de las retinas glaucomatosas cuando eran estimuladas con 59 mM de KCl aumentó significativamente a los 9 meses (1.13 ± 0.31 pmol/retina) en comparación con los 15 meses de edad (2.62 ± 0.45 pmol/retina), hasta alcanzar valores de 8.99 ± 0.57 pmol/retina a los 23 meses (figura 9).

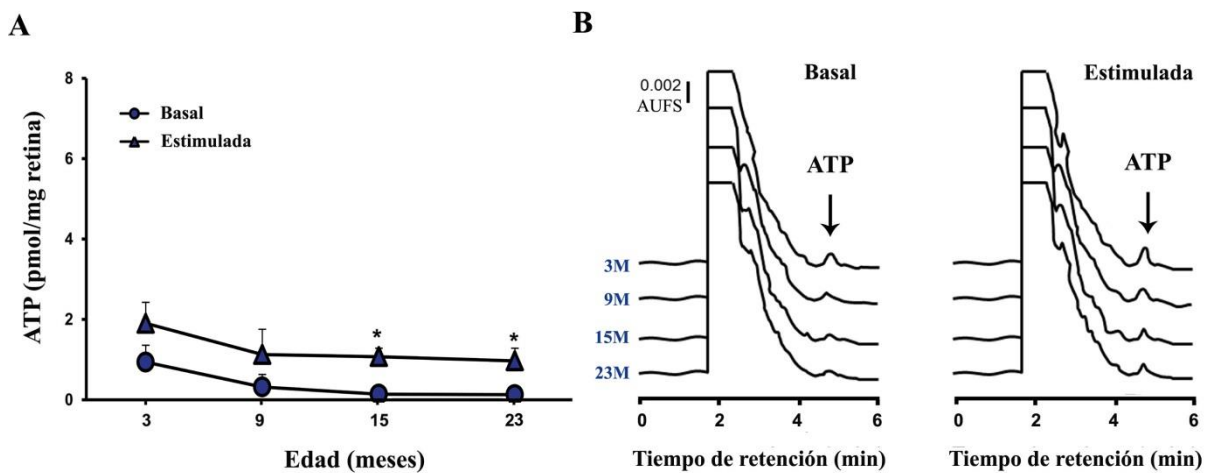


Figura 8. Estudio de la liberación de ATP en ratones control (C57BL/6J) en función de la edad. (A) Liberación de ATP en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas control. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS (n=4 ratones). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha). La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores de las retinas no estimuladas. (*p < 0.05).

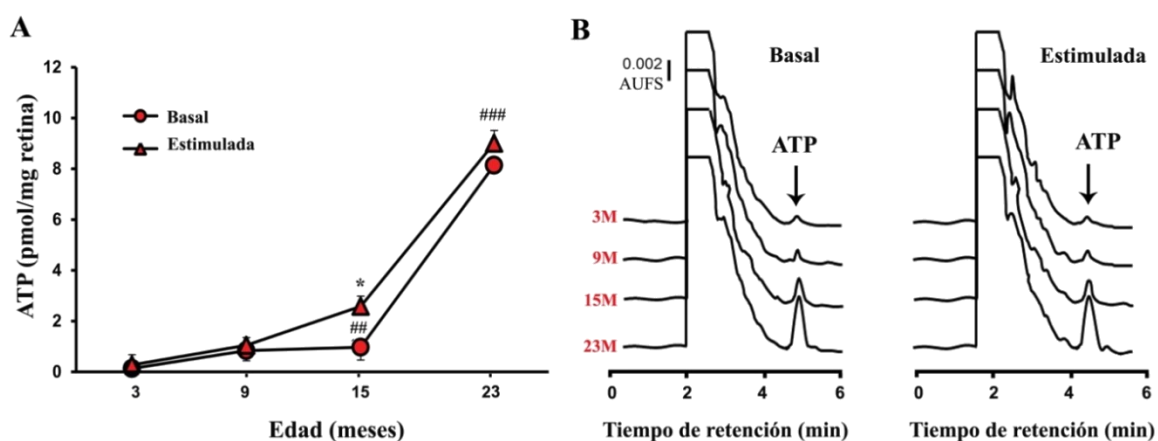


Figura 9. Estudio de la liberación de ATP en ratones glaucomatosos (DBA/2J) en función de la edad. (A) Liberación de ATP en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas glaucomatosas. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS (n=4 ratones). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha). La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia la situación de la retina en condiciones basales y mediante # cuando se comparó con respecto a los 3 meses en condiciones de estimulación (* $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$; ### $p < 0.01$).

Una vez analizados los niveles de ATP en las diferentes condiciones experimentales fue de gran ayuda, para poder dilucidar los posibles mecanismos involucrados en el proceso de degeneración, calcular la liberación neta de ATP de cada una de las cepas estudiadas. Se observó un aumento de los niveles liberados a los 3 meses (0.32 ± 0.04) con respecto a los 15 meses (1.10 ± 0.06 pmol/mg retina) en los ratones DBA/2J mientras que a 23 meses, la concentración de ATP disminuyó considerablemente (0.86 ± 0.08 pmol/mg retina). Cuando se analizó la liberación total de ATP en los ratones control los niveles se mantuvieron aproximadamente constantes durante el periodo de tiempo analizado (figura 10).

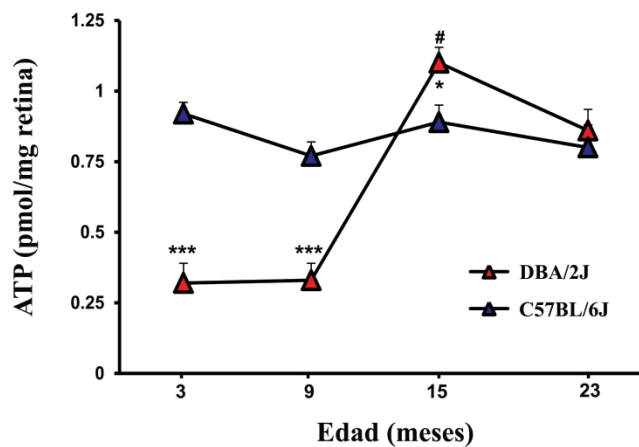


Figura 10. Liberación total de ATP en las retinas de ratones control (trazo azul) y glaucomatosos (trazo rojo) a diferentes edades (n= 3 para cada estadio). Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia el ratón control y mediante # cuando se comparó el ratón DBA/2J con respecto a los 3 meses (#p < 0.05; * p < 0.05; *** p < 0.001).

3.1.2 Determinación de los niveles de Ap₄A.

La concentración de Ap₄A de los ratones C57BL/6J en los diferentes estadios establecidos, mostró un ligero descenso en condiciones basales (“sin estimulación”) y cuando eran sometidas a estimulación mediante incubación con KCl (*figura 11*). Por el contrario, el perfil de respuesta en la liberación del nucleótido encontrado en el modelo glaucomatoso, mostró un marcado incremento de la concentración del mismo desde los 3 meses (1.57 ± 0.17 pmol/mg retina) a los 23 meses de edad llegando a alcanzar valores de Ap₄A de aproximadamente 3.15 ± 0.23 pmol/mg retina. Así como se encontraron diferencias significativas entre la situación basal y estimulada a los 3 meses de edad (*figura 12*).

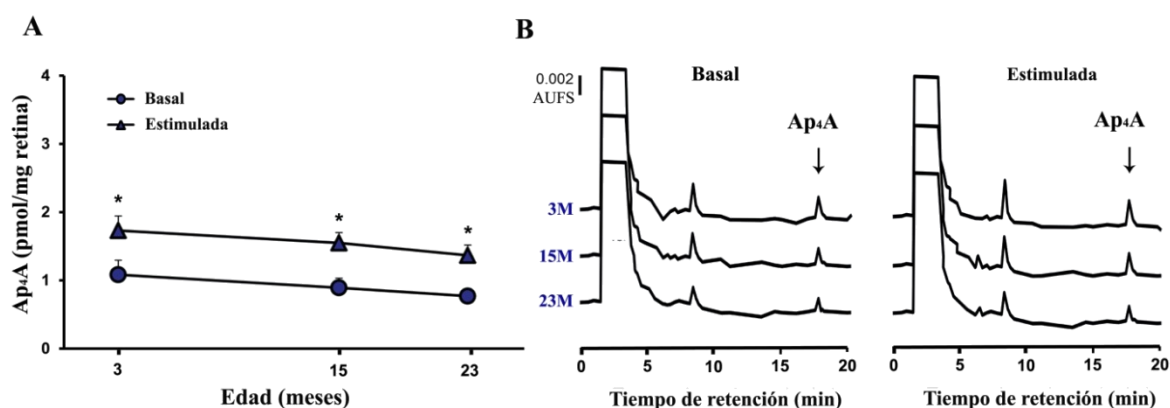


Figura 11. Estudio de la liberación de Ap_4A en ratones control (C57BL/6J) en función de la edad. (A) Liberación de Ap_4A en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas control. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS ($n=4$, * $p < 0.05$). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha).

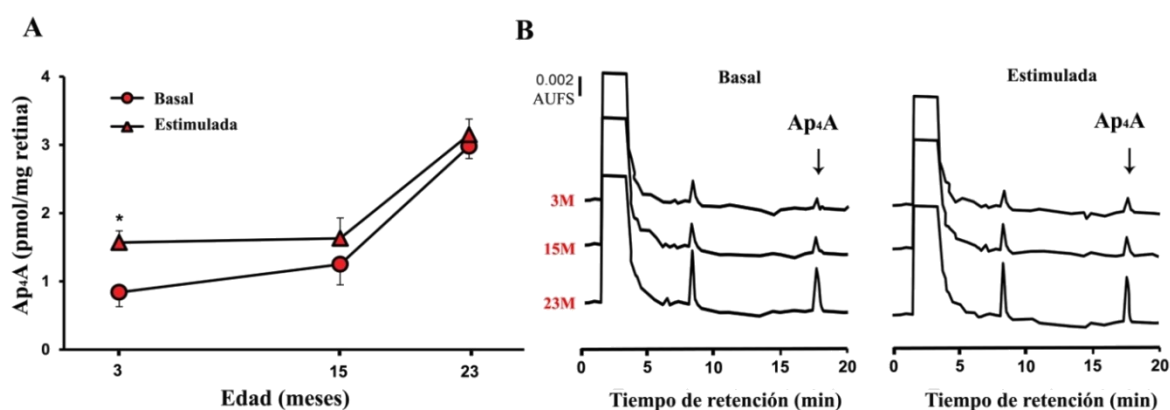


Figura 12. Estudio de la liberación de Ap_4A en ratones glaucomatosos (DBA/2J) en función de la edad. (A) Liberación de Ap_4A en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas glaucomatosas. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS ($n=4$). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha). La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia la situación de la retina en condiciones basales y mediante # cuando se comparó con respecto a los 3 meses en condiciones de estimulación (* $p < 0.05$ y $^{##}p < 0.01$).

Cuando se representó la sustracción de los niveles del nucleótido en condiciones de estimulación con respecto a los basales en ambas cepas, se observó una disminución de la concentración de Ap_4A neta en el ratón DBA/2J. A los 3 meses de edad los valores oscilaban en torno a 0.73 ± 0.04 disminuyendo significativamente a los 23 meses 0.170

± 0.05 pmol/mg retina (*figura 13*). Así como, se obtuvieron diferencias significativas cuando se comparó con el ratón control a 15 y 23 meses de edad.

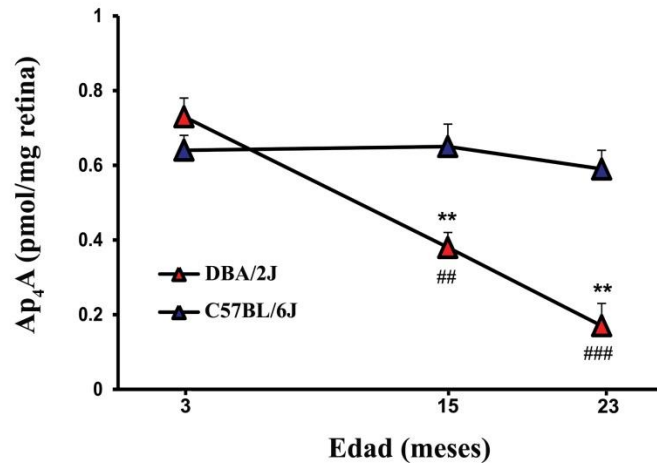


Figura 13. Liberación total de Ap₄A en las retinas de ratones control (azul) y glaucomatosos (rojo) a diferentes edades (n= 3). Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia el ratón control y mediante # cuando se comparó el ratón DBA/2J con respecto a los 3 meses (* p < 0.01 y ## p < 0.01; ### p < 0.001).

3.2 Determinación de los niveles de ATP total.

Se analizaron los niveles de ATP total presentes en las retinas de los ratones control y glaucomatosos en el intervalo temporal establecido. Se observó un aumento significativo en el caso de los ratones DBA/2J, encontrando valores 106.96 ± 15.15 (pmol/mg retina) a los 9 meses de edad y 208.64 ± 23.64 (pmol/mg retina) a los 23 meses, comparado con los niveles basales encontrados a los 3 meses (94.13 ± 21.56 pmol/mg retina) (*figura 14*). Los niveles de ATP en el ratón control aumentaron desde 50.32 ± 31.57 (pmol/mg retina) a los 3 meses hasta valores de 110.21 ± 21 (pmol/mg retina) a los 23 meses, no siendo dicho incremento estadísticamente significativo.

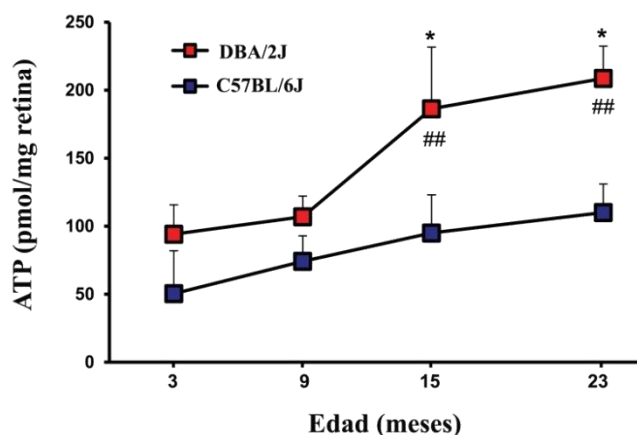


Figura 14. Contenido de ATP total en las retinas lisadas de ratones control (azul) y glaucomatosos (rojo) a diferentes edades (n=3 para cada estadio). Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia el ratón control y mediante # cuando se comparó el ratón DBA/2J con respecto a los 3 meses (* $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$).

También se analizó, la diferencia entre los niveles basales de ATP total en el ratón control con respecto al glaucomatoso. Se observó un aumento significativo en el ratón DBA/2J (186.64 ± 45.23 pmol/mg retina) con respecto al control (95 ± 28 pmol/mg retina) a los 15 meses de edad.

3.3 Determinación de los niveles de ATP en el humor acuoso.

Además de estudiar los niveles de nucleótidos presentes tras la estimulación de las retinas y, del contenido total de los mismos en dicho tejido, se determinaron los niveles de ATP y Ap₄A en muestras de humor acuoso en ratones control y glaucomatosos. Como ya se comentó en la *Introducción*, el balance entre la producción y drenaje del humor acuoso condiciona la presión intraocular, contribuyendo al daño glaucomatoso, por lo que nos resultó de gran interés realizar un estudio comparativo entre los niveles de nucleótidos en ambos polos del ojo deteriorado por la patología.

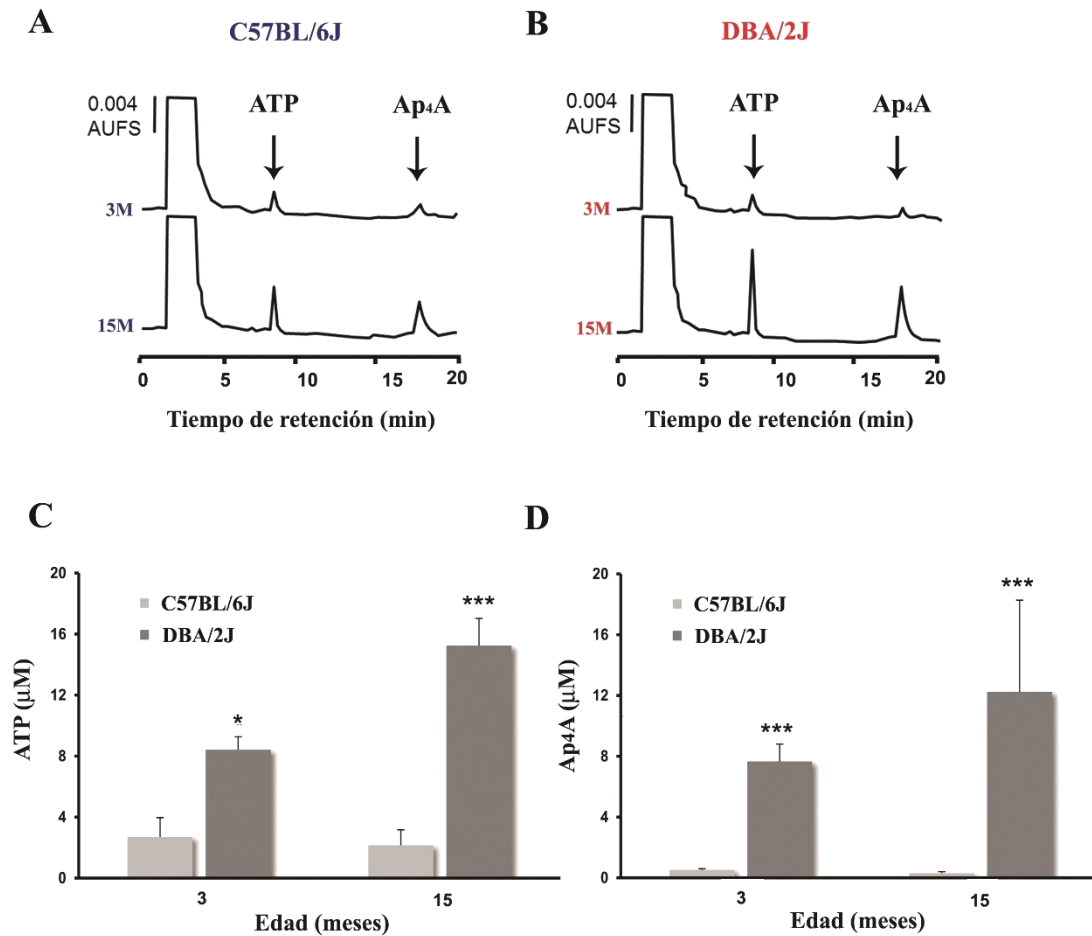


Figura 15. Análisis de los niveles de nucleótidos presentes en humor acuoso de los ratones control, C57BL/6J y glaucomatosos, DBA/2J a los 3 y 15 meses. (A, B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en los ratones control (izquierda) y glaucomatosos (derecha). (C) Concentración de ATP a los 3 y 15 meses en ambas cepas objeto de estudio (D) Concentración de Ap₄A a los 3 y 15 meses en ambas cepas objeto de estudio. Los valores mostrados en las gráficas corresponden a la media ± DS (n=3 ratones, * p < 0.05; *** p < 0.001).

Se analizaron los humores acuosos de ratones C57BL/6J y DBA/2J a los 3 (n=3) y 15 meses (n=3) de edad tal y como se muestra en la figura 15. Se detectaron concentraciones de ATP de $8.42 \pm 0.84 \mu\text{M}$ en los ratones DBA/2J a los 3 meses llegando a alcanzar niveles de $15.25 \pm 1.78 \mu\text{M}$ con la evolución de la patología a los 15 meses. Sin embargo, los valores de ATP en el humor acuoso de ratones control se mantuvieron estables en ambos estadios (figura 15), al igual que los niveles de Ap₄A. Las concentraciones de Ap₄A fueron analizadas en los ratones DBA/2J encontrándose

un incremento significativo de 7.65 ± 1.15 a 12.25 ± 6.02 de los 3 a los 15 meses de edad.

4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RETINA DEL RATÓN DBA/2J

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de investigación se basaba, tal y como se comentó en el capítulo de *Hipótesis y objetivos*, en la caracterización molecular de la retina de un modelo murino de degeneración glaucomatosa. Para ello, se seleccionaron diferentes marcadores generales y se analizaron a los 3 meses, momento en el que la patología no se ha desarrollado y, a los 15 meses de edad, cuando el deterioro en la retina se evidencia notablemente. En algunos casos, se estudiaron edades intermedias y un estadio tardío, 23 meses, momento en el cual se produciría posiblemente la pérdida neuronal masiva.

Para simplificar parte de los resultados, en los paneles de las figuras correspondientes a inmunofluorescencia en secciones transversales, no se mostraron las imágenes del ratón control de 15 meses, debido a no encontrar diferencias con respecto a la situación basal (3 meses de edad) en los marcadores estudiados. Todo el estudio inmunohistoquímico se realizó en varias secciones transversales de diferentes ratones control y enfermos evaluando sus respectivos ojos (n=4) para cada uno de los marcadores, para cada una de las edades.

Así pues, para el análisis mediante técnicas de Western Blot como de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el número de animales empleado fue como mínimo de 3 ratones para cada una de las cepas en los estadios analizados.

4.1 Caracterización del sistema purinérgico.

Los receptores ionotrópicos P2X, como ya se detalló en el capítulo de Introducción, se activan por la unión del ATP extracelular. La modulación de la entrada de iones al interior celular, les convierte en un elemento de control clave en la secreción de neurotransmisores y transmisión de la señal. Dentro de la gran familia de receptores P2X, el receptor P2X7 se encuentra asociado con la inducción de la respuesta inmune y muerte de neuronas ante un posible daño (North, 2002). Por lo que, quisimos analizar la presencia y distribución del receptor en el modelo glaucomatoso.

4.1.1 Caracterización del receptor P2X7.

Se analizó la presencia de dicho receptor y su distribución a lo largo de la retina de ratones control y glaucomatosos. De esta manera, poder dilucidar en la medida que nos permite el modelo animal, posibles implicaciones del receptor en el proceso de neurodegeneración retiniano.

4.1.1.1 Inmunorreactividad para el receptor P2X7.

La inmunorreactividad de la presencia del receptor P2X7 se evaluó en secciones transversales en las retinas de ratones control (C57BL/6J) y glaucomatosos (DBA/2J). Como se muestra en la figura 17A (ratón control), se observó marcaje para P2X7 en diferentes capas de la retina tal y como describieron otros autores (Brandle y cols., 1998; Wheeler-Schilling y cols., 2001; Ishii y cols., 2003; Puthussery y Fletcher, 2004). Se detectó inmunorreactividad en la capa plexiforme externa e interna (CPE y CPI), en la capa nuclear externa e interna (CNE y CNI) y capa de células ganglionares (CCG). La distribución del patrón de marcaje de P2X7 observada fue similar en los ratones control y glaucomatosos a los tres meses de edad, sin embargo, los ratones DBA/2J mostraron un aumento significativo de la presencia del receptor a los 15 meses en las capas CPE, CPI y CG (*figura 16C*). Se analizó exhaustivamente el marcaje en la capa de CGR en diferentes secciones de diferentes animales para demostrar el aumento del receptor en dichas neuronas. Se observó cómo dependiendo de la sección no se observaba marcaje por la pérdida de las CGR (*figura 16*) o, por el contrario, el marcaje presentado por las CGR remanentes estaba incrementado significativamente (*ver más adelante, figura 28*). Por este motivo, se llevó a cabo el estudio de las CG en retinas en plano de modo que, se pudiera apreciar el intenso marcaje para P2X7 en las CGR preservadas y la pérdida “física” de la proteína originada por la muerte celular de las mismas. También era concordante con la pérdida parcheada de las CGRs del modelo glaucomatoso (*ver apartado 4.4.3*), de acuerdo con estudios preliminares (Fernandez-Sanchez y cols., 2014).

En las retinas de los ratones control, la distribución fue la misma que la observada en los ratones DBA/2J y, no se observaron diferencias significativas con respecto a la edad.

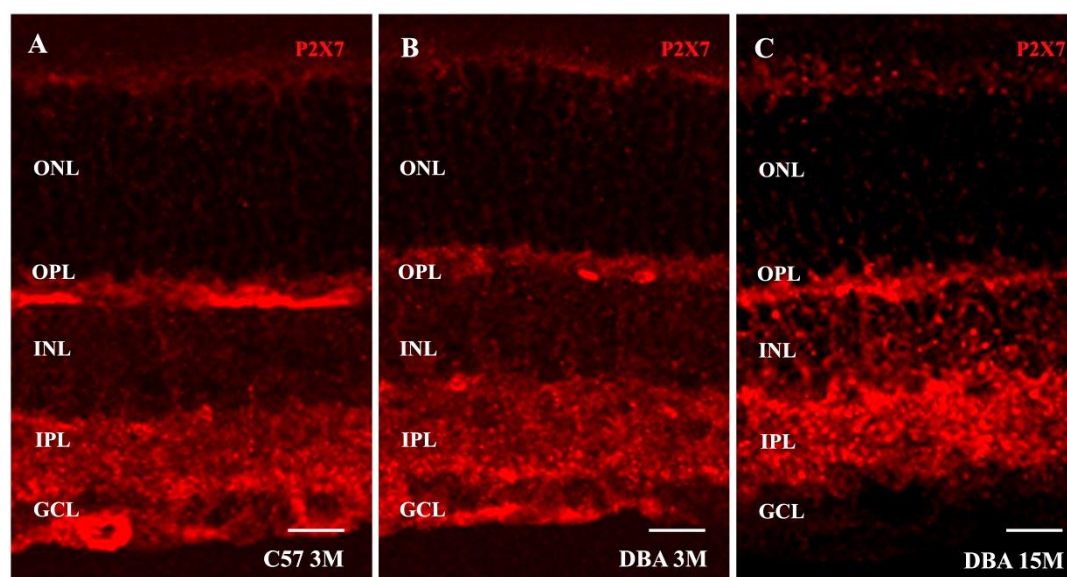


Figura 16. Marcaje inmunohistoquímico para P2X7 en retinas de ratones C57BL/6J y DBA/2J. Secciones verticales a 3 y 15 meses de ratones glaucomatosos (B y C) y ratones control a los 3 meses de edad. (A). El marcaje del receptor purinérgico (P2X7) de las retinas se muestra en fluorescencia roja. Escala: 20 μ m.

4.1.1.2 Niveles de expresión del receptor P2X7 por Western Blot.

El análisis de inmunodetección permitió localizar la distribución del receptor P2X7 en la retina de un ratón control, así como de la retina glaucomatosa, pudiendo encontrar una mayor presencia del receptor en determinadas capas de la retina. Esta alteración proteica pudo cuantificarse mediante el estudio por inmunotransferencia. La determinación del aumento de P2X7 se realizó en el contenido total de la retina lisada por lo que fue de gran utilidad poder localizar mediante el estudio inmunohistoquímico en qué regiones de la retina se producía principalmente la sobreexpresión del receptor.

Se estudió la presencia de dicho receptor en ambas cepas a los 3 y 15 meses de edad pudiendo evaluar, de esta manera, las posibles variaciones en la expresión de la proteína en función de la edad y durante el progreso de la degeneración glaucomatosa. Los resultados mostraron una mayor expresión basal del receptor P2X7 en los ratones DBA/2J con respecto a los ratones C57BL/6J a los 3 meses de edad. A los 15 meses se observó un aumento de la proteína del 78%, estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en el ratón glaucomatoso en comparación con el ratón control. Además, analizando los

niveles del receptor a medida que avanza la patología se detectó una sobreexpresión de P2X7 del 36% ($p < 0.001$) con respecto al ratón DBA/2J a los 3 meses, no encontrada cuando se analizaba la evolución temporal de la misma en los ratones control.

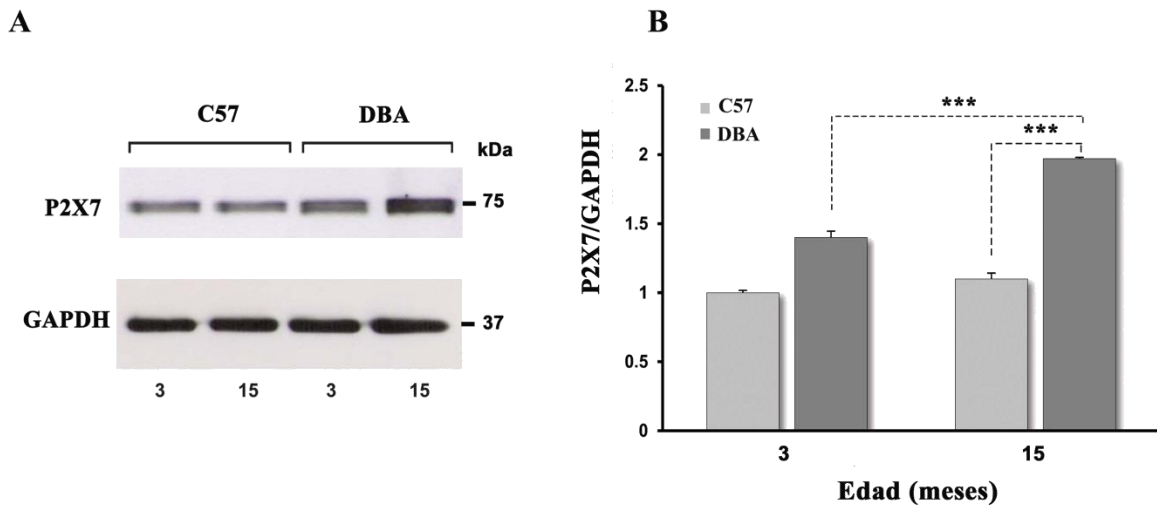


Figura 17. Cuantificación de la expresión del receptor P2X7 en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) La representación gráfica en columnas muestra la expresión del receptor P2X7 a los 3 y 15 meses de edad en los ratones C57BL/6J y DBA/2J. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de tres o más ratones. Los datos se consideraron significativos estadísticamente a $***p < 0.001$.

4.1.1.3 Niveles de expresión del ARN_m del receptor P2X7.

Fue de gran utilidad realizar el análisis de ARN_m para el receptor P2X7 debido a que inicialmente había cierta discrepancia entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y por Western Blot. Como ya se ha comentado en la sección 4.1.1.1, en la retina de los ratones glaucomatosos a los 15 meses, se encuentran zonas en las que el marcaje de P2X7 ha desaparecido casi totalmente y, áreas en las que se conservan las CGR con un intenso marcaje para dicho receptor. Sin embargo, siempre que se analizaban por Western Blot las retinas glaucomatosas se obtenía un claro aumento de la expresión de dicho receptor. Por lo que se decidió determinar los valores de ARNm para verificar el resultado obtenido en el estudio de la proteína.

La expresión del nivel de ARN_m para P2X7 de los ratones control y glaucomatosos fue analizada por PCR. Se evaluaron los posibles cambios en los niveles de ARN_m en ratones C57BL/6J y DBA/2J a los 3 y 15 meses de edad. Los resultados muestran una mayor expresión basal de los niveles de ARN_m para P2X7 en los ratones DBA/2J con respecto a los ratones C57BL/6J a los 3 meses de edad. A los 15 meses se detectó un incremento de estos niveles de aproximadamente un 70%, estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en el ratón glaucomatoso en comparación con el ratón control. Este resultado dilucidó la posible controversia establecida entre alguno de los estudios por inmunohistoquímica y Western Blot.

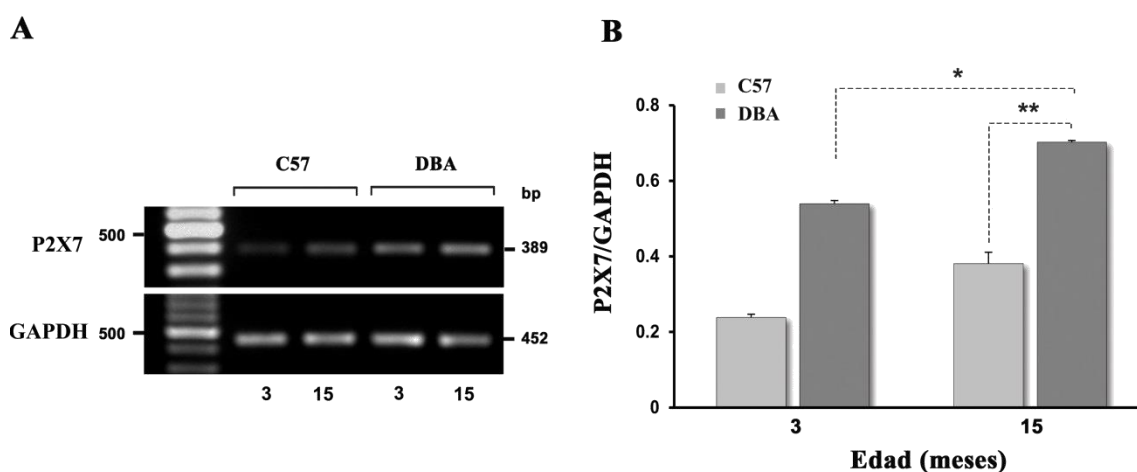


Figura 18. Evaluación de la expresión de ARN_m para ratones control y glaucomatosos a 3 y 15 meses de edad. (A) PCR para P2X7 se realizó usando los *primers* descritos en material y métodos. Se utilizó como control de carga GAPDH. Los valores del ratio de P2X7 con respecto a GAPDH se normalizaron con los niveles de ARN_m del control, definido como 100%. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, como mínimo, tres ratones (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.2 Caracterización del transportador VNUT.

Los nucleótidos extracelulares proceden de la liberación excitotóxica de células excitables o a través de otros mecanismos como canales iónicos, como consecuencia de la lisis celular o por medio de transportadores tales como CFTR o la glicoproteína-P de la familia ABC (del inglés: *ATP binding cassette*) (Vasiliou y cols., 2009). En las células nerviosas en general y en la retina neural en concreto, la liberación se lleva fundamentalmente a cabo a través de procesos de exocitosis. En este orden de cosas, el

almacenamiento del ATP junto con otros transmisores clásicos, se realiza gracias a la presencia de un transportador específico para nucleótidos denominado VNUT (Gualix y cols., 1996; Sawada y cols., 2008).

4.1.2.1 Inmunorreactividad para VNUT.

El estudio inmunohistoquímico se realizó para evaluar la expresión del patrón de marcaje de VNUT en la retina del modelo de ratón glaucomatoso y su respectivo control. En la figura 19A-B y 20 A-F, se observan secciones de retina marcadas con el anticuerpo para el transportador nucleotídico. El marcaje para VNUT se detectó en los segmentos externos, en la capa de fotorreceptores en las retinas glaucomatosas, en la capa plexiforme externa e interna (CPE y CPI) y en la capa nuclear interna (CNI) y capa de células ganglionares (CGR).

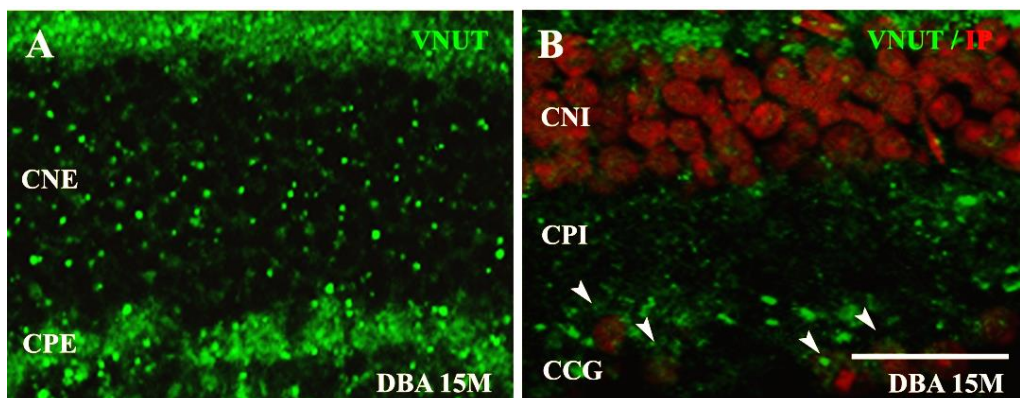


Figura 19. Aumento del marcaje inmunohistoquímico para VNUT en retinas de ratones DBA/2J a los 15 meses de edad. (A) Marcaje de VNUT en la capa de fotorreceptores y (B) marcaje de VNUT en células ganglionares (ver flechas). Escala: 20 μ m.

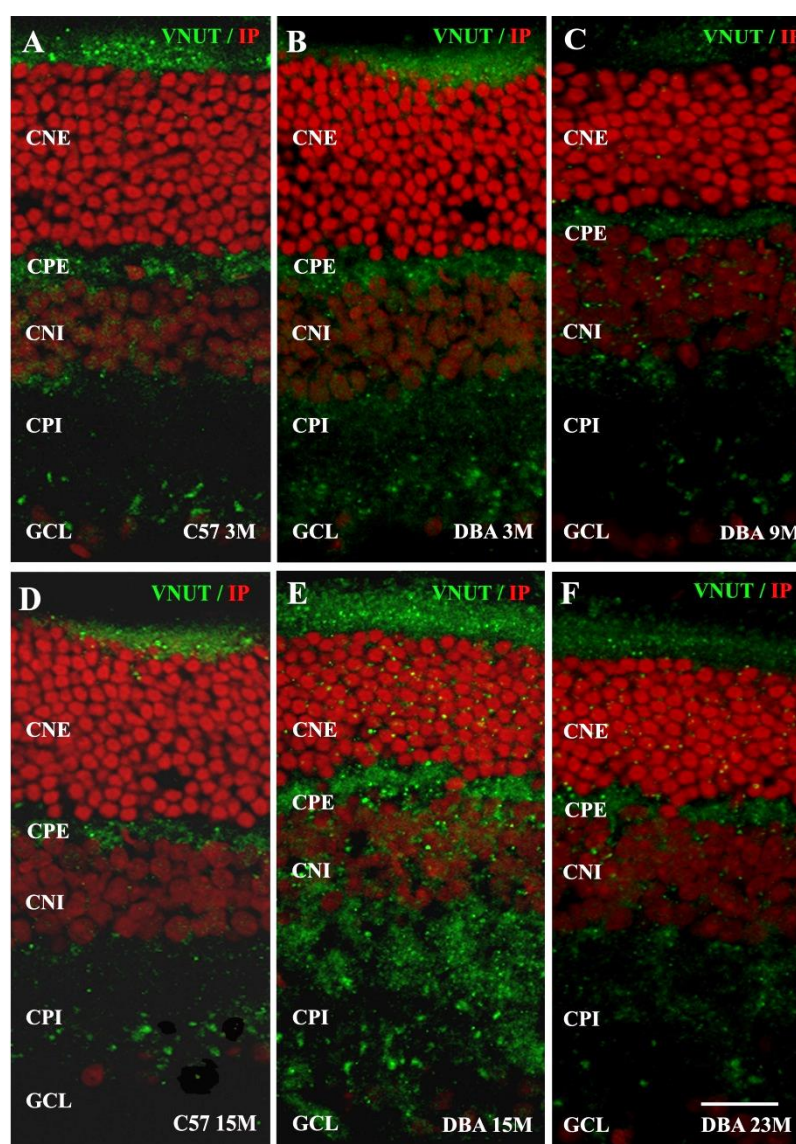


Figura 20. Marcaje inmunohistoquímico para VNUT en retinas de ratones C57BL/6J y DBA/2J. Secciónes verticales a 3, 9, 15 y 23 meses de ratones glaucomatosos (B, C, E, F) y ratones control a 3 y 15 meses (A, D). El marcaje del transportador vesicular nucleotídico (VNUT) de las retinas se muestra en fluorescencia verde y el marcador nuclear IPr se muestra a través de fluorescencia roja. Escala: 20 µm.

Se observó un pequeño cambio en el marcaje de VNUT en las retinas del DBA/2J con respecto a los ratones C57BL/6J a los 3 meses de edad (*figura 20A, B*). La expresión del transportador se mantuvo constante en los ratones control a los 9 y 23 meses de edad (datos no mostrados). En los ratones DBA/2J, los niveles de la proteína en la CPE, CPI y capas nucleares (CNI, CCG) se mantuvieron constantes a los 9 meses a diferencia de lo observado a los 15 meses, en los que se aprecia un claro incremento en las capas plexiformes (CPE y CPI), CNE, CCG y, en menor medida CNI (*figura 20*

D, E y figura 19 A, B). Por el contrario, a los 23 meses se observó una significativa reducción en el transportador vesicular en las retinas DBA/2J, siendo similar a los niveles basales encontrados a los 3 meses de edad.

4.1.2.2 Niveles de expresión de VNUT por Western Blot.

La figura 21, muestra el análisis de la cuantificación de la expresión de VNUT por Western Blot. Se encontró un aumento del 46.21% ($p < 0.001$) de los niveles de VNUT entre 3 y 15 meses de edad en los ratones glaucomatosos, al igual que cuando se comparó a los 15 meses con el ratón control (36.16%; $p < 0.001$). Sin embargo, los niveles de VNUT descendieron a los 23 meses (38.72 %, $p < 0.001$) cuando se comparaba con el ratón DBA/2J a los 15 meses. La expresión del transportador no mostró alteraciones significativas en los estadios establecidos en los ratones C57BL/6J.

Estos resultados, van en concordancia con los resultados observados por inmunofluorescencia.

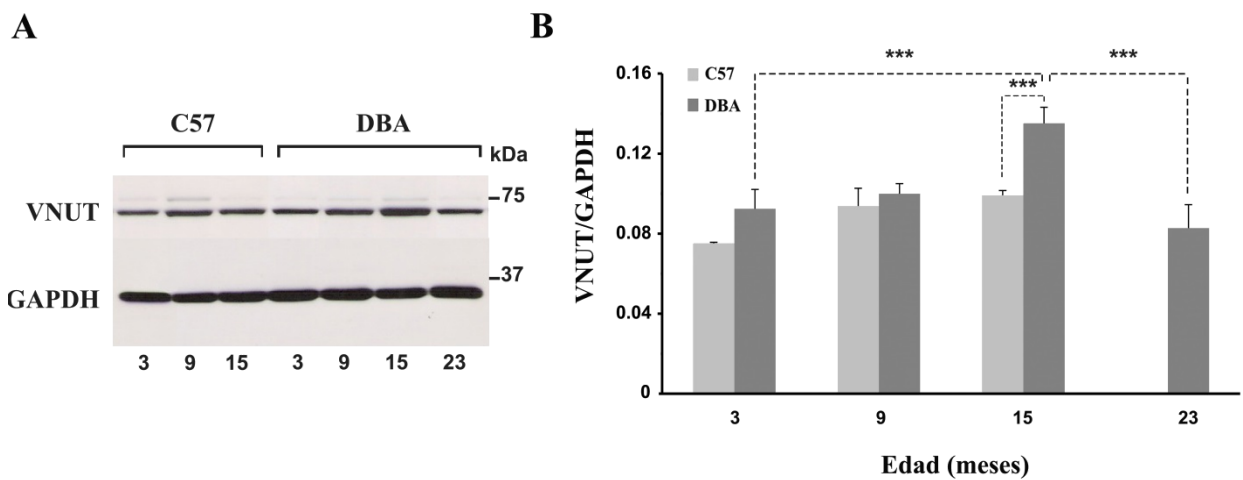


Figura 21. Expresión de VNUT en retinas control y glaucomatosas a los 3, 9, 15 y 23 meses. (A) Detección de los niveles de transportador vesicular (VNUT 68 kDa) en C57BL/6J y DBA/2J. Se utilizó GAPDH como control de carga. (B) Análisis por Western Blot de VNUT en diferentes estadios. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, cuatro ratones ($^{***} p < 0.01$).

4.1.2.3 Correlación entre la disfunción retiniana, el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) y liberación de ATP extracelular (ATP_e).

Una vez analizados, hasta el momento, los niveles de ATP liberados (*ver apartado 3.1.1 de resultados*) tras la estimulación y los niveles de expresión del transportador vesicular resultó de gran interés establecer una posible correlación entre estos resultados y los valores funcionales de actividad electroretinográfica obtenidos previamente (*ver apartado 2 de resultados*).

Ambos parámetros, el ATP extracelular (ATP_e) y los niveles de VNUT mostraron una fuerte correlación, en el modelo del DBA/2J (*figura 22*). Existiendo una clara dependencia entre la funcionalidad de las CGR y la expresión del transportador y ATP_e.

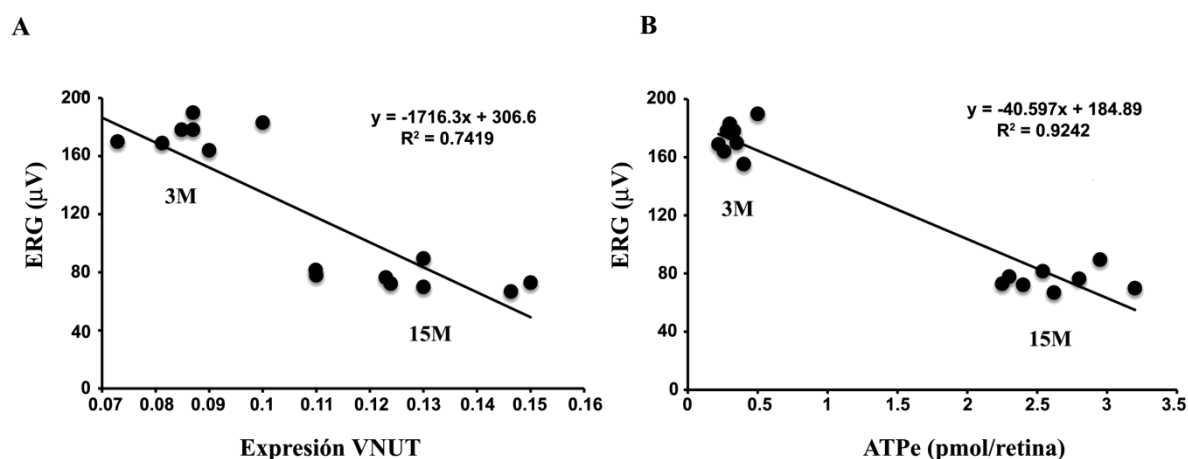


Figura 22. Correlación entre registros electroretinográficos, ATP_e y la expresión de VNUT. Relación entre ERG y niveles de ATP (A) y la amplitud ERG y expresión de VNUT (B). La correlación se mostró entre ratones DBA/2J entre 3 (valores a la izquierda) y 15 meses (valores a la derecha).

4.1.3 Caracterización del enzima NPP1.

Una vez analizada la expresión del receptor P2X7 y uno de los transportadores implicados en su activación (VNUT), resultó interesante estudiar una proteína implicada en la inactivación de las sustancias señaladoras, la ecto-fosfodiesterasa NPP1.

4.1.3.1 Niveles de expresión de NPP1 por Western Blot.

El análisis cuantitativo de la expresión de la NPP1, mostró una expresión basal diferente entre ambas cepas a los 3 meses, encontrando un incremento del 96 % ($p < 0.01$) en el ratón DBA comparando con su control a la misma edad. Analizando los niveles a los 15 meses, se observó un aumento del 95% ($p < 0.05$) en el modelo de ratón glaucomatoso DBA/2J con respecto a los controles y de un 80.39% ($p < 0.01$) comparando con estadios tempranos de la patología (3 meses de edad). La expresión de la ecto-fosfodiesterasa no mostró alteraciones significativas en los estadios establecidos en los ratones control.

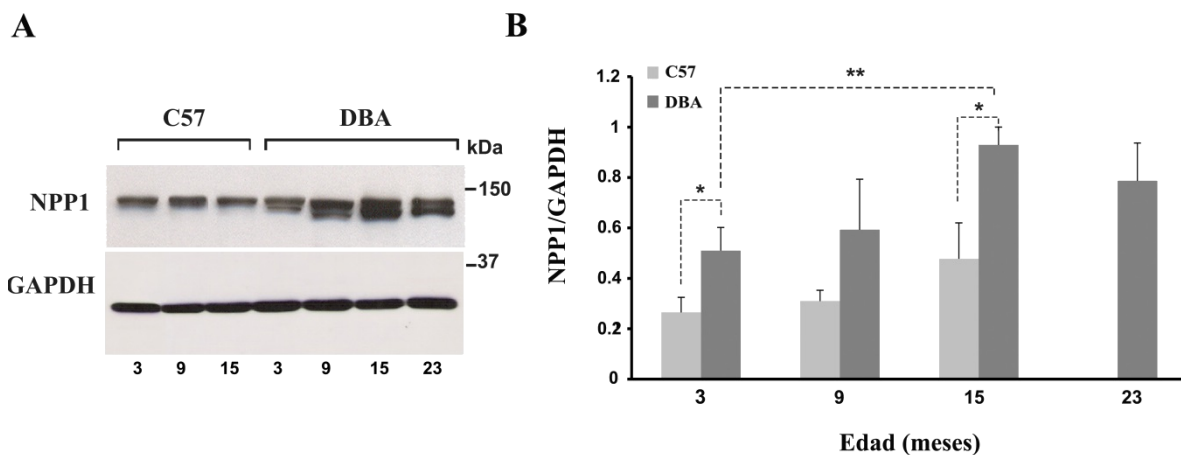


Figura 23. Expresión de NPP1 en retinas control y glaucomatosas en función de la progresión de la patología. (A) Detección de los niveles de transportador vesicular en C57BL/6J y DBA/2J. Se utilizó GAPDH como control de carga (B) Análisis por Western Blot de NPP1 en diferentes estadios. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.2 Activación de la respuesta astrocitaria por proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

4.2.1 Inmunorreactividad frente a GFAP.

El GFAP, el mejor marcador de gliosis reactiva, fue analizado por inmunohistoquímica en los diferentes estadios objeto de estudio (3 y 15 meses). En la retina de los ratones control, la inmunorreactividad frente a GFAP se detectó en los astrocitos ubicados en la CFNO y en un número reducido de procesos transversales

localizados en la periferia procedentes de las células de Müller. En la retina de los animales DBA/2J, la inmunorreactividad frente a GFAP aumenta de forma notable respecto a las retinas control a medida que progresa la patología (*figura 24*). El número de procesos transversales positivos a GFAP aumenta progresivamente a medida que los animales DBA/2J envejecen, verificándose un incremento de los mismos en la retina más periférica con respecto a zonas más centrales (resultados no mostrados). Parte de estos procesos se orientan radialmente hacia la retina más externa (CPI, CNI y CPE (*figura 24B*)). Asimismo, otra parte de los procesos de estos astrocitos se extienden a través de la CGR (*Figura 24C*) contactando con los vasos sanguíneos localizados en la capa de fibras del nervio óptico.

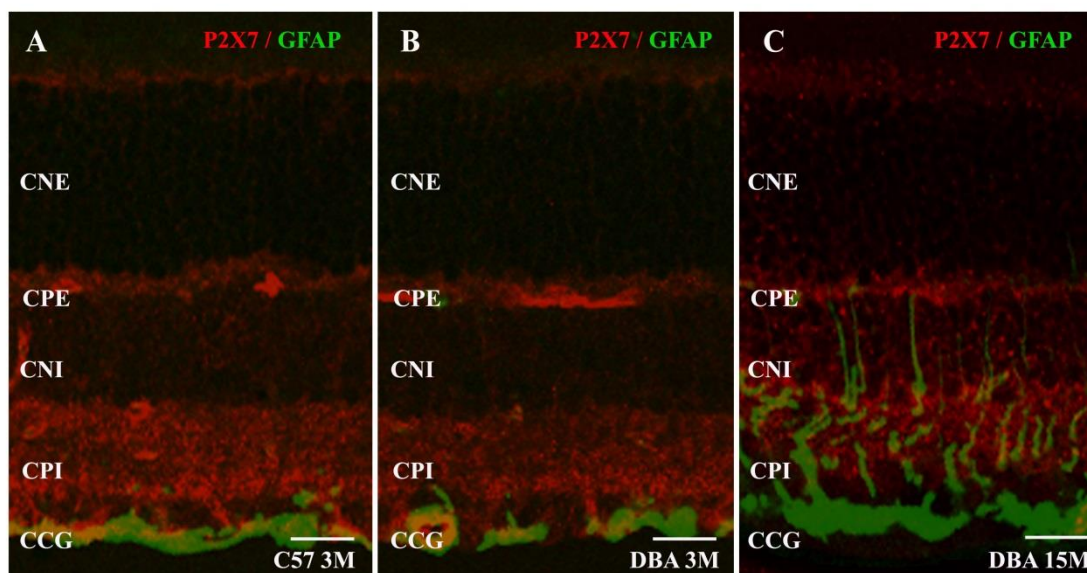


Figura 24. Marcaje inmunohistoquímico de GFAP y P2X7 en retinas de ratones C57BL/6J y DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El marcaje para GFAP de las retinas se muestra en fluorescencia verde y el P2X7 se muestra a través de fluorescencia roja. Escala: 20 μ m.

4.2.2 Niveles de expresión para la proteína fibrilar ácida (GFAP) por Western Blot.

El estudio cualitativo del aumento de la expresión de GFAP mediante inmunofluorescencia fue corroborado con la cuantificación de proteína a los diferentes tiempos objeto de estudio en los animales control y distróficos (*figura 25*). La expresión de GFAP mediante esta técnica mostró, en el animal control una banda uniforme entre

los 3 y 15 meses de edad. Los experimentos realizados en los ratones DBA/2J mostraron un aumento significativo de la expresión de la proteína 274% de aumento en las células gliales en respuesta al daño neuronal comparándolo con las retinas control ($p < 0.01$) así como cuando se comparó con el ratón DBA/2J a los 3 meses (84%).

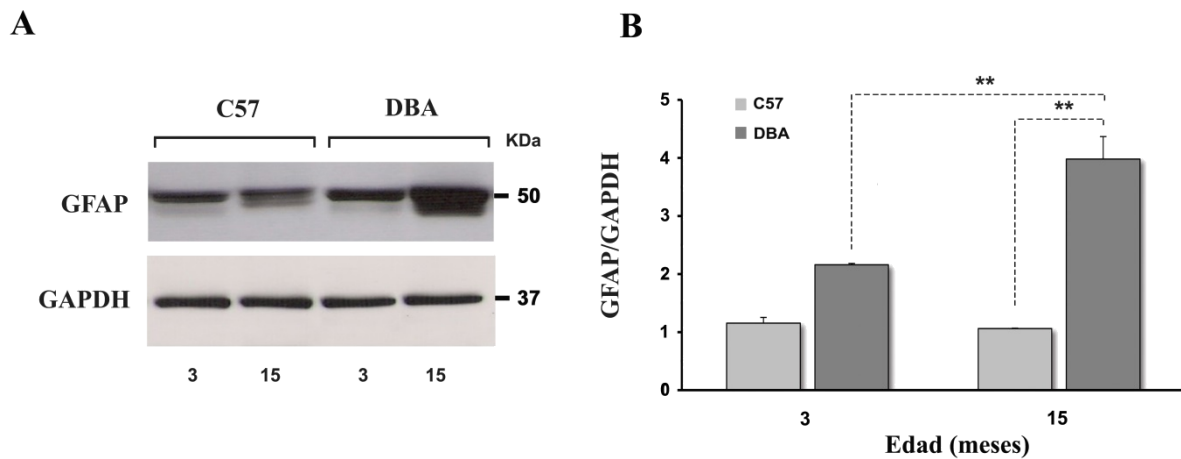


Figura 25. Cuantificación de la expresión de GFAP en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de GFAP en los ratones control C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.01$).

4.3 Pérdida de conexión sináptica.

Con el objeto de aclarar si existían posibles alteraciones en el circuito retiniano y, valorar la conectividad entre los fotorreceptores y las células horizontales, se llevó a cabo el marcaje de las retinas con sinaptofisina. La sinaptofisina es una proteína integral de membrana de las vesículas sinápticas involucrada en múltiples funciones como la exocitosis, la liberación de neurotransmisores y desarrollo retiniano, por lo que su estudio podía resultar de relevante interés (Nag y Wadhwa, 2001).

4.3.1 Inmunorreactividad para Sinaptofisina (Syp).

Con respecto a animales control C57BL/6J, a los 15 meses de edad las retinas patológicas de ratones DBA/2J mostraron, mediante inmunodetección frente a sinaptofisina, un patrón de expresión diferente de la proteína sináptica. La disminución en el marcaje de sinaptofisina se correlaciona con la alteración de los terminales axonales de los fotorreceptores a nivel de CPE, tal y como describieron (Fernandez-

Sanchez y cols., 2014), donde aparecen distribuidos en diferentes estratos, debido posiblemente a la desorganización de las capas. Es importante señalar, como en la CPI aumenta la expresión de esta proteína a los 15 meses de edad en los ratones glaucomatosos, lo que podemos asociar a procesos de plasticidad o remodelación sináptica. En los ratones control, se observa una distribución de la proteína en las capas plexiformes (CPE y CPI).

Por lo tanto, la degeneración glaucomatosa podría causar una alteración sináptica, el doble marcaje con **P2X7** y **Syp** revela daño axonal a nivel de los terminales de los fotorreceptores. Se detectaron niveles incrementados de P2X7 en terminales sinápticas sugiriendo los posibles procesos apoptóticos involucrados debido al deterioro del circuito retiniano (Puthussery y cols., 2006; Heiduschka y cols., 2010).

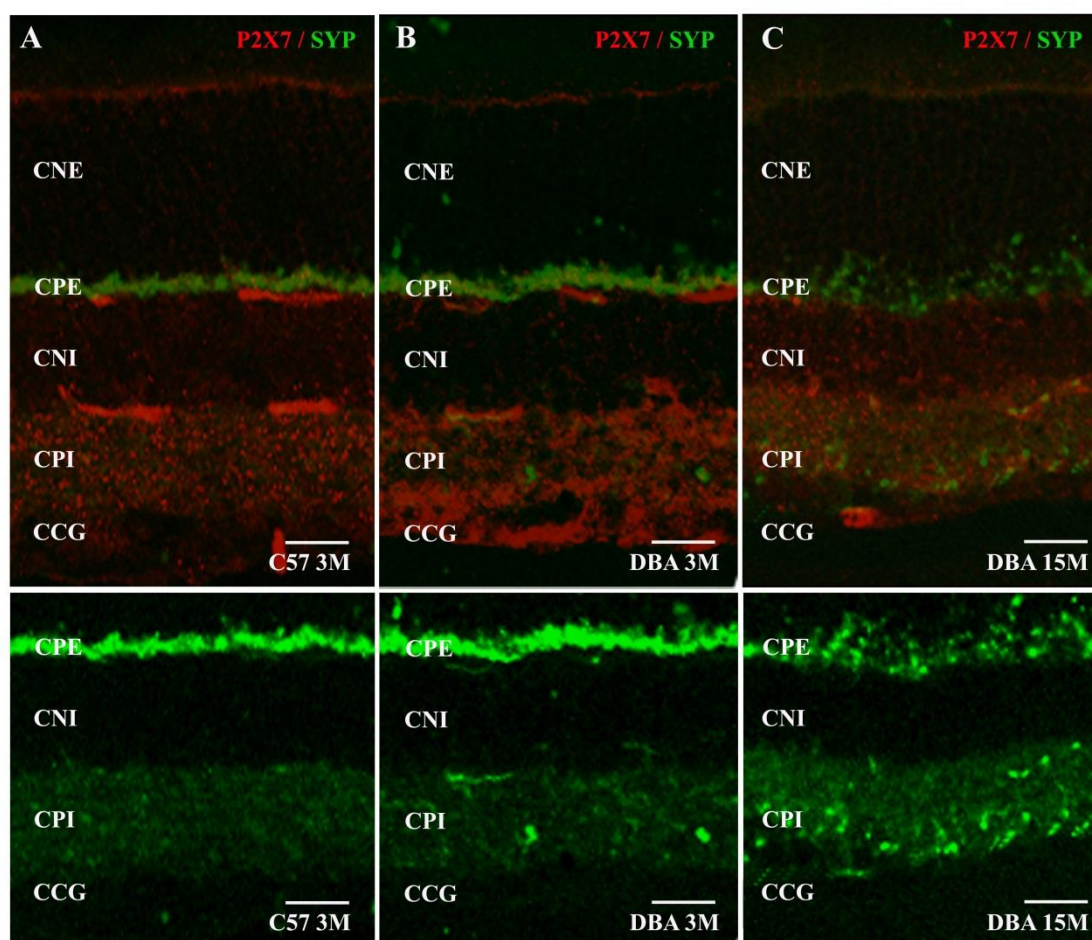


Figura 26. Marcaje inmunohistoquímico de Syp y P2X7 en retinas de ratones C57BL/6J y DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El marcaje para Syp de las retinas se muestra en fluorescencia verde y el marcaje para P2X7 se muestra a través de fluorescencia roja. Escala: 20 µm.

4.3.2 Niveles de expresión de sinaptofisina (Syp) por Western Blot.

Una vez analizado el diferente patrón de marcaje de la proteína sináptica, se evaluó si esa diferente distribución iba ligada a un cambio en la regulación de la misma. Los niveles de sinaptofisina fueron analizados por la técnica de Western Blot y, se observó, una reducción del 32% ($p < 0.05$) en los ratones DBA/2J a los 15 meses comparado con los ratones más jóvenes (DBA/2J a los 3 meses de edad). Además se encontró un descenso del 22% ($p < 0.05$) en los ratones glaucomatosos con respecto a los controles a los 15 meses. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los ratones C57BL/6J (*figura 27*).

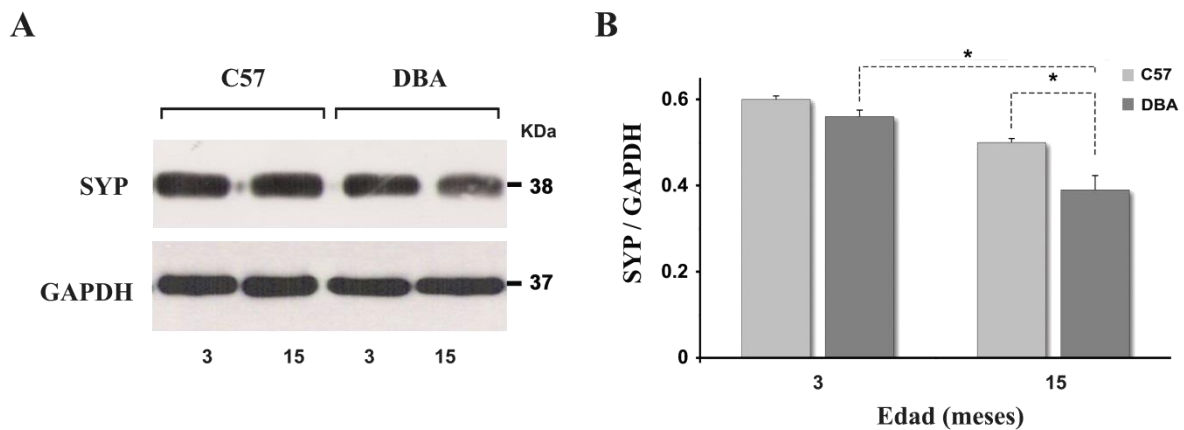


Figura 27. Cuantificación de sinaptofisina en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de Syp en los ratones control C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones ($*p < 0.05$).

4.4 Degeneración de las células ganglionares en la retina del modelo de glaucoma DBA/2J.

4.4.1 Inmunorreactividad frente a Brn3a.

A los 15 meses, cuando se detecta la disfunción visual correspondiente a la retina más interna (*figura 28*), la expresión de la proteína disminuyó significativamente debido a la pérdida de CGR en aproximadamente un 36%. Se observó cómo dependiendo del campo y de las secciones seleccionadas, el número de células positivas a Brn3a se modificaba de manera variable, encontrando campos con CGR preservadas en mayor medida y campos en los que la presencia de dichas neuronas se veía reducida

drásticamente. Por lo que, se llevó a cabo un estudio cuantitativo y un estudio morfológico más preciso que nos permitiera evaluar la pérdida progresiva de este tipo neuronal.

El doble marcaje del marcador neuronal **Brn3a** reveló que la mayoría de células ganglionares mostraban inmunotinción positiva para **P2X7** (*figura 28D*). Se observó un aumento en la pequeña población de CGR que sobreviven. Estos resultados, sugieren la posible contribución a la neurodegeneración mediada por P2X7 y la progresiva generación de retinas “parcheadas” (Schlamp y cols., 2006).

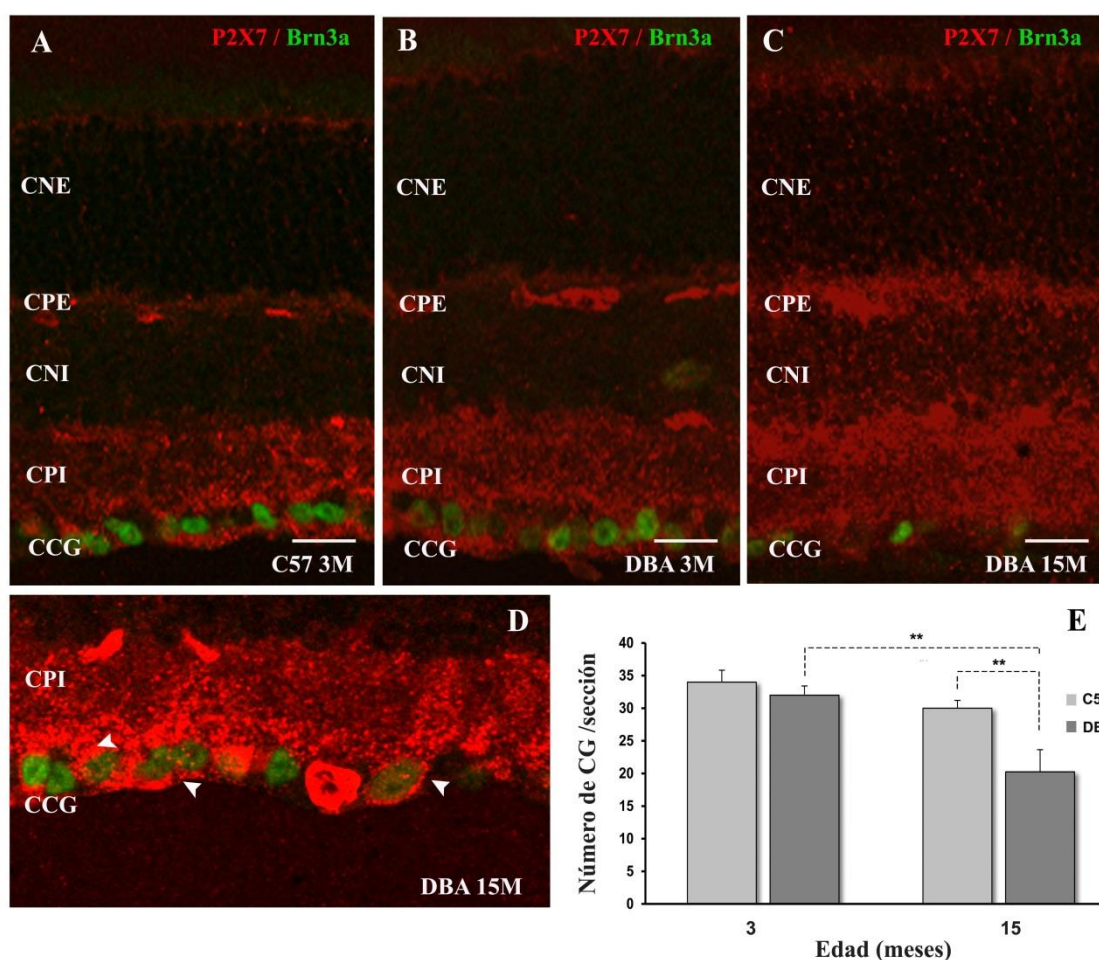


Figura 28. Marcaje inmunohistoquímico de Brn3a y P2X7 durante el desarrollo de patología en los ratones glaucomatosos (DBA/2J) y en ratones control (C57BL/6J) de 3 a 15 meses de edad (A-D). El marcaje para Brn3a de las retinas se muestra en fluorescencia verde y el marcaje para P2X7 se muestra a través de fluorescencia roja. (D) Aumento de una sección vertical de CG en los ratones DBA a 15 meses. Escala: 20 µm. (E) Cuantificación del número de CG de secciones verticales marcadas con Brn3a en ratones control y enfermos a 3 y 15 meses de edad. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media ± DS de, al menos, 10 campos diferentes de secciones de diferentes ratones de cada uno de los estadios analizados (** p< 0.01).

4.4.2 Niveles de expresión de Brn3a por Western Blot.

El estudio por inmunotransferencia nos permitió cuantificar la pérdida global de CGR en retinas glaucomatosas. Se encontró una reducción del factor de transcripción del 65 % ($p < 0.001$) a los 15 meses con respecto a las retinas de los mismos ratones a los 3 meses de edad. Además, cuando se comparó el número de CGR en retinas control y enfermas a los 15 meses se encontró una reducción del 62% ($p < 0.001$).

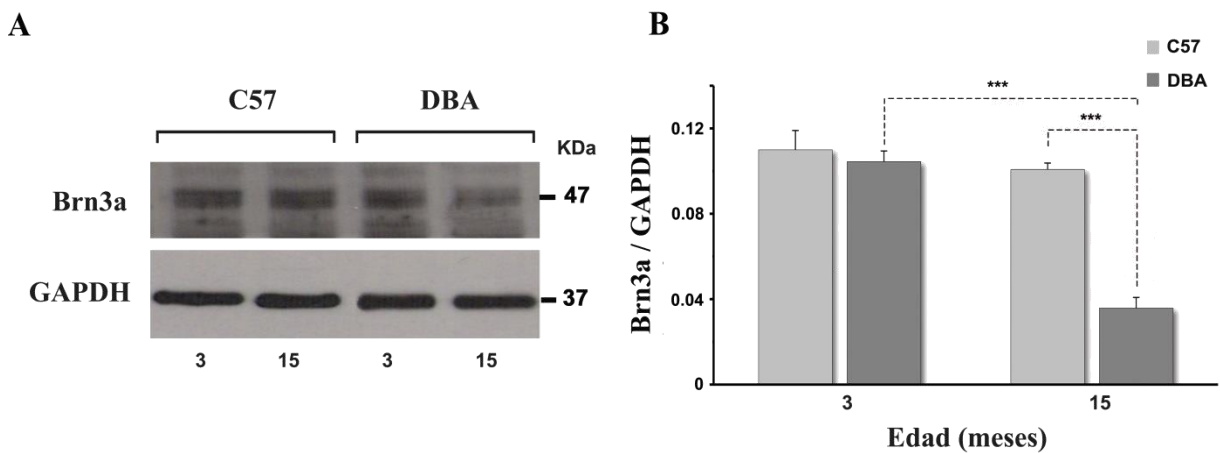


Figura 29. Cuantificación de Brn3a en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de Brn3a en los ratones control C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.001$).

4.4.3 Estudio morfofuncional de la población de células ganglionares de la retina.

Se procesaron 6 ratones C57BL/6J y 6 ratones DBA/2J para cuantificar el número de CGR a los 15 meses de edad. La población completa de CGR marcadas con el trazador OHSt e inmunodetectadas con Brn3a se contaron para ambos marcadores en ambas retinas de cada animal. Dos animales C57BL/6J se procesaron solo para inmunomarcaje frente a Brn3a. Los resultados de los contajes se muestran en la tabla I.

		OHSt		Brn3a	
Animal		Ojo derecho	Ojo izquierdo	Ojo derecho	Ojo izquierdo
C57BL/6J	#1	34625	36935	35338	35599
	#2	28073	32225	34737	37528
	#3	35361	39482	35117	37266
	#4	31363	28805	34209	35591
	#5	-	-	36032	26920
	#6	-	-	34537	40043
DBA/2J	#1	45833	42897	44481	42478
	#2	34832	38290	37081	32471
	#3	38599	36561	29947	36474
	#4	26923	31171	30162	33134
	#5	5286	39256	7912	40934
	#6	16649	40683	14653	39439

Tabla I. Contaje de células ganglionares marcadas con inyección OHSt e inmunotinción para Brn3a en ratones control (C57BL/6J) y glaucomatosos (DBA/2J).

4.4.3.1 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales control.

En ratones C57BL/6J, a los 15 meses de edad, las CGR de ambos ojos fueron marcadas desde los colículos superiores con el trazador neuronal OHSt y, posteriormente, inmunodetectadas con Brn3a. El objetivo era comprobar si existían diferencias entre la población de CGR que mantienen su transporte retrógrado funcionalmente activo (CGR OHSt⁺) y la población total de CGR funcionales, inmunodetectadas con Brn3a (CGR Brn3a⁺).

Los resultados obtenidos tras analizar los contajes de CGR detectadas por marcaje retrógrado y por inmunodetección con Brn3a, correspondientes a los ratones C57BL/6J a los 15 meses, mostraron una distribución normal de población de CGR (*figura 30*). Los resultados obtenidos tras analizar los contajes de CGR detectadas por marcaje retrógrado y por inmunodetección con Brn3a, correspondientes a los ratones C57BL/6J a los 15 meses de edad, mostraron una distribución normal de la población de CGR (*figura 31*). En este grupo control el número medio de CGR marcadas con OHSt por retina fue de $33.358,63 \pm 3.961,25$ (media \pm DS) (n = 8 retinas); mientras que el número de medio de CGR con inmunorreactividad positiva frente a Brn3a por retina fue de $35.243,08 \pm 3.079,92$ (media \pm DS) (n=12) (tabla I). No se encontraron diferencias

estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre la población de CGR de retinas derechas e izquierdas para cada uno de los marcadores, OHSt y Brn3a, ni en el número de CGR detectadas con ambos marcadores (t -de Student, $p > 0.05$). Por tanto, en ratones C57BL/6J sanos no se ve afectado el transporte axonal retrógrado con el paso del tiempo, al menos hasta los 15 meses de edad.

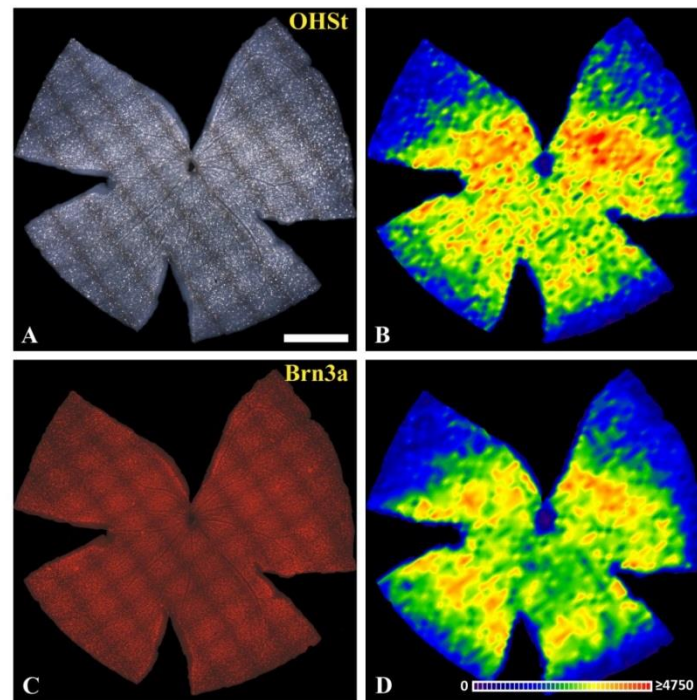


Figura 30. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales control de 15 meses de edad. Montaje global a plano “*in toto*” de una retina izquierda representativa de un ratón C57BL/2J mostrando marcaje con OHSt (A) aplicado a ambos colículos superiores una semana antes de su procesamiento e inmunotñición frente a Brn3a (C) y sus correspondientes mapas de isodensidad (B, D). La reconstrucción de los montajes a plano se realizó con ayuda de una platina motorizada en un microscopio de epifluorescencia con una cámara de alta resolución conectada a un sistema de análisis de imagen (Image-Pro® Plus, V5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Las CGR marcadas retrógradamente con OHSt (A, B) o inmunotñidas con Brn3a (C, D) aparecen distribuidas por toda la retina pero muestran una mayor densidad en la retina superior, donde se disponen a través de una región naso-temporal a modo de banda o estría visual con una mayor densidad. Esta retina tiene 39.482 CGR OHSt⁺ y 37.266 CGR Brn3a⁺. En todas las retinas el polo dorsal se orienta a la posición de las 12 de un reloj. Barra de escala 1 mm.

4.4.3.2 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales glaucomatosos.

Al igual que en el grupo de animales control, las CGR de los ratones DBA/2J se trazaron con OHSt aplicado en sus colículos superiores e inmunodetectaron con Brn3a.

La población media de CGR por retina marcada con OHSt fue de $33.081,67 \pm 11.723,28$ (n=12 retinas), mientras que la población media de CGR Brn3a⁺ cuantificada fue de $32.430,50 \pm 11.014,78$ (n=12 retinas) por retina (*Tabla I*). A pesar de observarse valores absolutos en la población CGR de algunas retinas marcadamente disminuidos con respecto a su retina contralateral o al valor medio del grupo (ver retinas derechas DBA/2J #5 y #6 para ambos marcadores en *Tabla I*), no se observan diferencias estadísticamente significativas en el número medio de CGR entre retinas izquierdas y derechas ni en el número medio de CGR por retina entre ambos marcadores. Sin embargo, son de destacar, con respecto al grupo de animales control, los valores de desviación estándar; lo que indica la existencia de animales en los que su población de CGR se ve cuantitativamente alterada, aunque esta alteración no sea lo suficientemente prevalente en la población analizada como para que el valor medio del número de CGR por retina se vea afectado.

Tras el análisis cuantitativo de las retinas de ambos grupos animales, se analizó cualitativamente la población de CGR marcadas y se generaron mapas de isodensidad sobre los montajes globales de retinas a plano para facilitar el estudio de la distribución espacial de la población de CGR con los marcadores estudiados, OHSt y Brn3a, para ambos grupos de estudio, ratones C57BL/6J y DBA/2J.

El uso en las mismas retinas de trazado neuronal retrógrado con OHSt y de inmunomarcaje con Brn3a da como resultado unas diferencias mínimas normales observadas con la aplicación de estas técnicas. Mientras el OHSt marca las CGR competentes para el transporte axonal retrógrado desde sus regiones retinotópicas en el cerebro hacia sus somas en la retina, el Brn3a marca las CGR vivas, independientemente de su competencia para el transporte axonal (Vidal-Sanz y cols., 2012).

El número de CGR inmunodetectadas fue menor en el ojo derecho de cuatro animales DBA/2J; sin embargo no se observó ninguna reducción sistemática en ninguna de las retinas de los otros dos animales analizados. Dentro de la población analizada, algunos animales muestran un número de CGR normal en uno de sus ojos, mientras que en el contralateral se observa una clara reducción. Uno de los animales muestra una clara reducción en el número de CGR cuantificadas en ambas retinas.

En las retinas DBA/2J se observaron grandes áreas que carecían de CGR marcadas con el trazador OHSt (datos no mostrados) o inmunorreacción positiva frente a Brn3a (*figura 31*). En tres retinas de ratones DBA/2J, además de mostrar valores normales de CGR Brn3a⁺, se observó un patrón de distribución típico en ambas retinas (*figura 31A, B*). Uno de los animales mostró un número de CGR Brn3a⁺ y una densidad celular mucho más baja de lo normal en ambas retinas, lo que afecta claramente al patrón de distribución espacial de las CGR (*figura 31C, D*). Dos de los animales analizados mostraban áreas que carecían de CGR Brn3a⁺ en una retina, mientras que la retina contralateral mostraba densidades de CGR Brn3a⁺ típicas y un patrón de distribución celular de animales normales (*figura 31E, F*). La ausencia de CGR se localizó preferentemente en la retina dorsal (*figura 31C, D*), pero también afecta a la retina inferior de forma difusa o variando desde un pequeño sector a varios cuadrantes de la retina donde la densidad celular es muy baja. Las áreas que muestran CGR Brn3a⁺ o marcadas retrógradamente tienen la típica forma de sector triangular, con su base localizada en la periferia y su vértice en el disco óptico (*figura 31E*), mientras que el resto de la retina muestra una densidad de CGR muy baja.

Todos estos resultados indican que la pérdida de CGR en los animales DBA/2J es variable, tanto entre individuos como entre ambas retinas del mismo ejemplar. Estos resultados no están exentos de la propia evolución de la patología en cada uno de los animales.

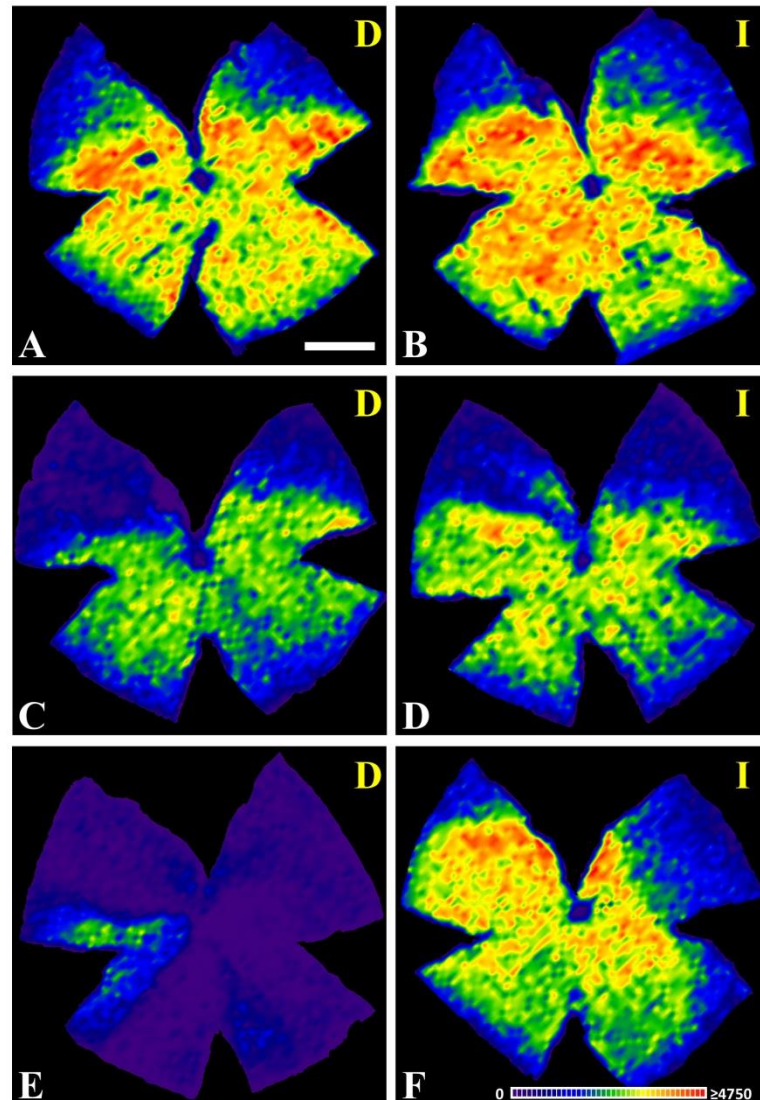


Figura 31. Distribución de la supervivencia de CGR identificadas mediante inmunofluorescencia con Brn3a a los 15 meses de edad en los ratones DBA/2J. (A-F) Mapas de isodensidad de CGR correspondientes al marcaje de Brn3a en montajes en plano de retinas derechas (A, C, E) e izquierdas (B, D, F) de tres retinas representativas del ratón DBA/2J. Barra de escala 1 mm.

4.4.4 Correlación entre la disfunción retiniana y la pérdida neuronal (CGR).

Los resultados electrofisiológicos y la caracterización neuronal indicaban que la pérdida de actividad funcional de la retina interna en los animales DBA/2J era debida a la muerte progresiva de las CGR de los mismos. Por lo que, resultó de gran interés establecer una posible correlación entre ambos parámetros.

La Figura 32, muestra los resultados de la correlación existente entre la amplitud del pSTR y la población celular a los 15 meses. La figura 32A, muestra como la población celular marcada con Brn3a tiene una baja variabilidad y se mantiene constante en ratones control, mostrando en su recta de regresión una pendiente prácticamente nula, aunque un alto grado de correlación; lo que tomado en conjunto indicaría que el valor de pSTR no es dependiente del número de CGR en los animales control C57BL/6J. Mientras que en la Figura 33B se muestra una marcada correlación positiva, aproximadamente lineal, entre el número de CGR y la amplitud de la señal de la respuesta STR en animales DBA/2J. Existiendo una clara dependencia entre el número de CGR y la amplitud de la respuesta STR.

Por tanto, los datos obtenidos muestran una clara evidencia de la variabilidad en la respuesta electrofisiológica de los ratones enfermos y una pérdida de CGR en función de la propia evolución de la enfermedad. La disminución de la pSTR confirmó la pérdida selectiva de las células más internas de la retina, las CGR, reflejando la pérdida de actividad funcional de las mismas; lo que estaría en concordancia con la reducción observada de CGR Brn3a⁺.

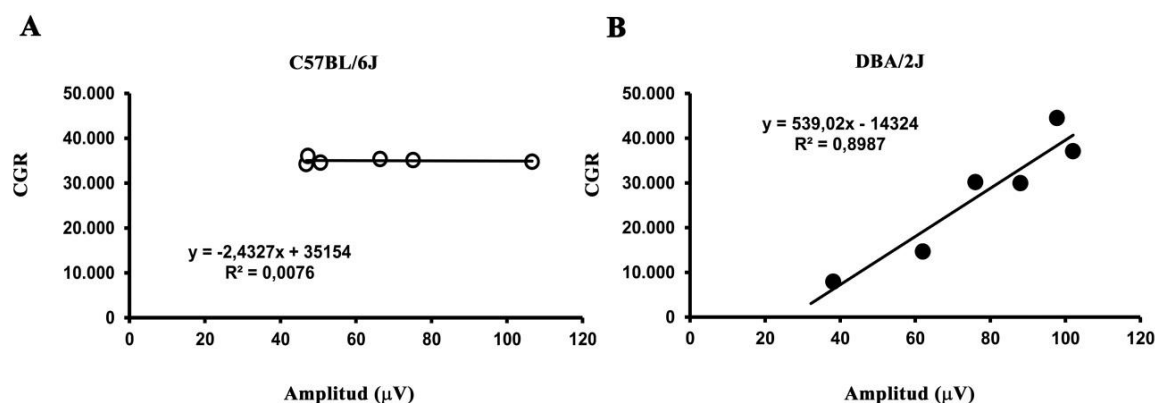


Figura 32. Correlación entre el número de células ganglionares de la retina (CGR) y la amplitud de la respuesta umbral escotópica en μV a los 15 meses de edad en ratones C57BL/6J (A) y DBA/2J (B). La ecuación correspondiente a la regresión lineal se muestra en cada una de las gráficas.

4.4.5 Estudio temporal de las alteraciones en la capa de fibras de la retina (NF).

4.4.5.1 Estudio de la capa de fibras de la retina en animales control.

En las retinas control, correspondientes a los ratones C57BL/6J, se aprecian los axones positivos frente a pNFH mostrando una trayectoria rectilínea, convergente, y centrípeta hacia el disco óptico, en concordancia con los resultados de trabajos previos (Parrilla-Reverter y cols., 2009a). En las retinas control esta proteína no se expresa en los somas de CGR ni en sus prolongaciones dendríticas (*figura 33 A-D*). Tanto en los ratones a 3 meses como a 15 meses no se observan diferencias morfológicas que se puedan asociar con alteraciones funcionales.

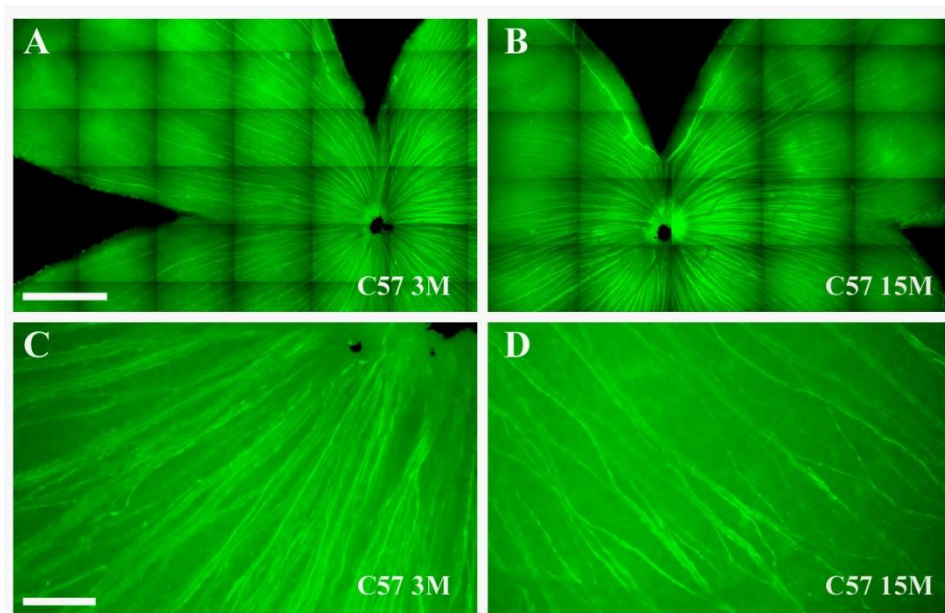


Figura 33. Inmunorreactividad frente a la subunidad de alto peso molecular fosforilada del triplete de neurofilamentos (pNFH) en la retina en el ratón control C57BL/6J. Fotomontaje micrográfico de retinas montadas a plano de ratones a los 3 (A) y 15 (B) meses de edad. Los axones de las CGR se extienden homogéneamente por toda la retina agrupándose en haces en su trayectoria más centrípeta hacia la papila óptica. En animales sanos la expresión de pNFH queda restringida a nivel axonal, no observándose marcaje en el soma celular ni en el axón proximal o en las ramificaciones dendríticas independientemente de la edad (C y D). Destacar que las fibras discurren radialmente y muestran un patrón rectilíneo característico. Barra de escala: 500 μ m (A y B) y 50 μ m (C y D).

4.4.5.2 Cambios en la capa de fibras de la retina en animales glaucomatosos.

En la capa de fibras de la retina de los ratones DBA/2J a los 3 meses de edad preservó una morfología y un patrón de densidad axonal similar al observado en las retinas de ratones control (*figura 34*). Sin embargo, en los ratones glaucomatosos a los 15 meses de edad se observa, una pérdida considerable de axones, variable en extensión e independiente de si se trataba del ojo derecho o izquierdo (*figura 34*). Observando en detalle se aprecian cambios morfológicos en la trayectoria axonal, las fibras axonales se desempaquetan y muestran trayectorias irregulares, distorsionadas y aberrantes ocasionales en su recorrido. Además el patrón de expresión pNFH cambia, observándose también inmunorreactividad positiva en el soma y en las terminales dendríticas.

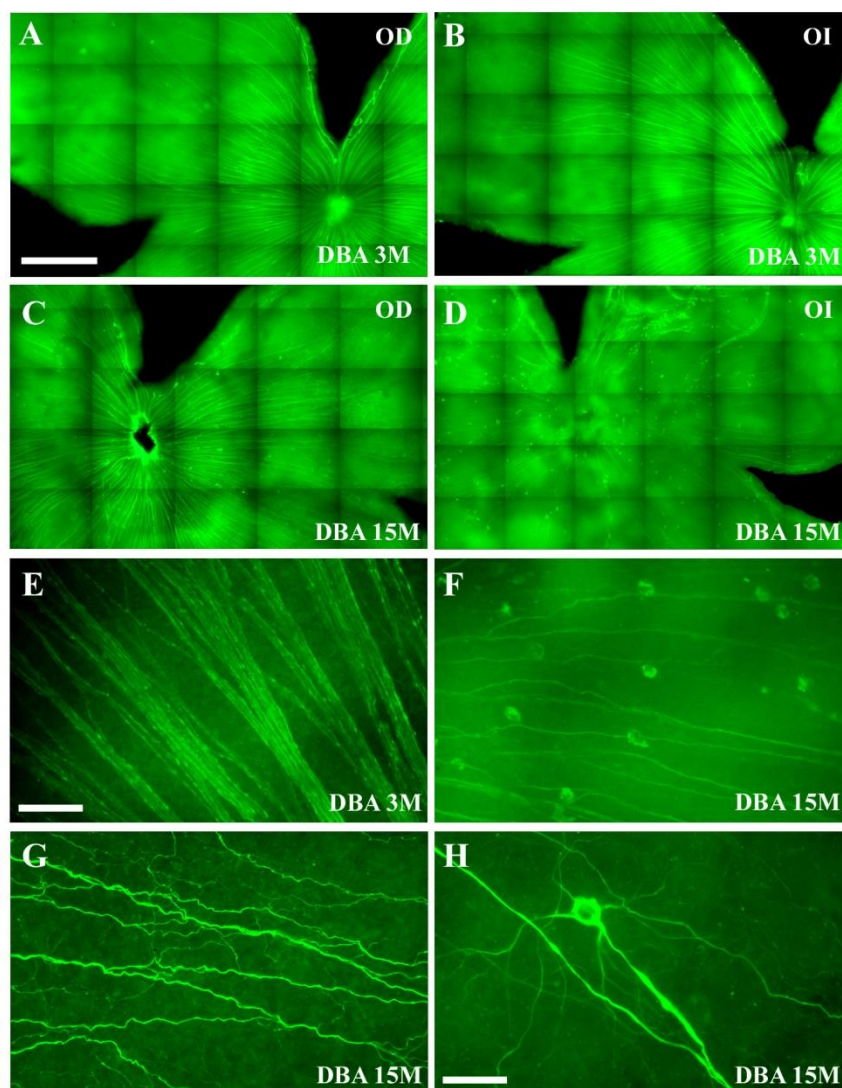


Figura 34. Evolución de las alteraciones de la capa de fibras nerviosas en la retina glaucomatosa del ratón DBA/2J a los 3 y 15 meses de edad. (A-F). Reconstrucciones gráficas a 20x de las retinas derecha e izquierda tras la inmunodetección de pNFH. Se observa la pérdida de linealidad del recorrido de los axones (A-F). (A-D) Barra= 500 µm. (E-G) Microfotografías tomadas a 40x. Barra= 50 µm. (H) Barra= 25 µm.

4.4.5.3 Doble marcaje con P2X7.

Se pudo observar el aumento del receptor P2X7 descrito en los estudios de inmunofluorescencia mediante secciones transversales en los ratones DBA/2J a los 15 meses de edad con respecto a los 3 meses. Se observa un intenso marcaje de algunas de las CGR preservadas. El doble marcaje frente a P2X7 y pNFH permitió identificar que

los somas doblemente marcados se correspondían a CGR (co-localización) y no con otro tipo celular retiniano, como p.e. microglía.

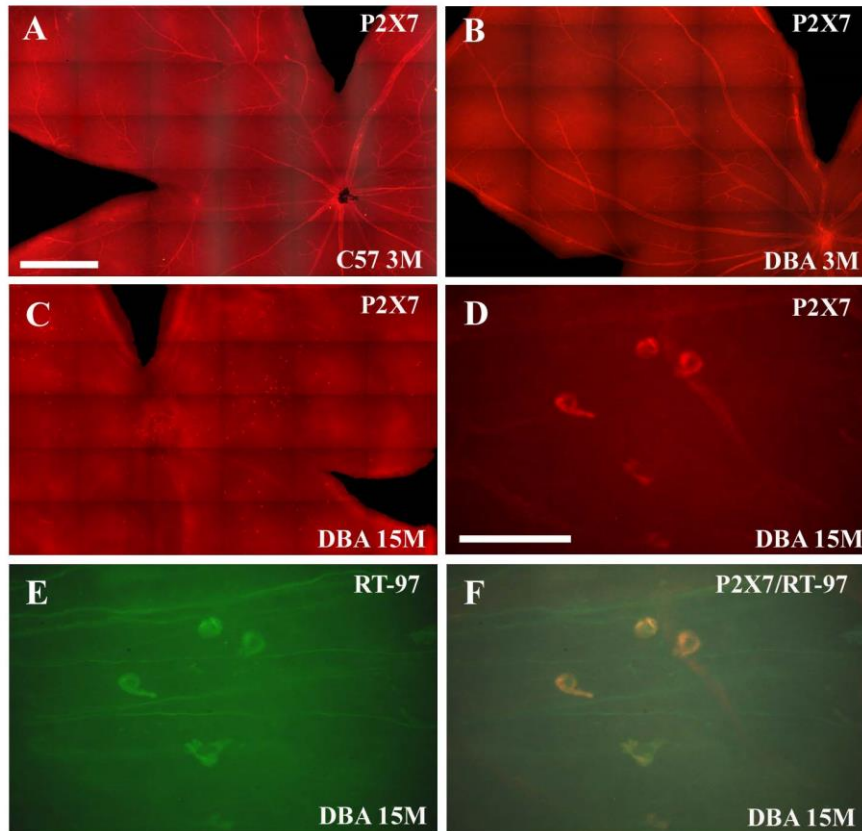


Figura 35. Marcaje inmunohistoquímico para P2X7 y pNFH (RT-97) en retinas a plano de ratones C57BL/6J y DBA/2J. (A-F). Reconstrucciones a 3 y 15 meses de edad tras la inmunodetección del receptor P2X7 a 20x (A-C). Escala: 500 μ m. (D-F) Aumento a 40x del marcaje de pNFH (RT-97) y de la co-localización con P2X7 (F). Escala: 50 μ m.

5. IMPLICACIONES DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR P2X7 EN EL GLAUCOMA.

5.1 *In vivo*

5.1.1 Fosforilación de las proteínas p38 y JNK en el proceso de neurodegeneración glaucomatosa.

Una vez llevada a cabo la caracterización morfológica del ratón DBA/2J y descrita la pérdida de las CGR, se evaluó la posible implicación de MAPKs durante el

curso del proceso apoptótico inducido por el desarrollo de la degeneración glaucomatosa. Se monitorizó la activación de dos miembros de la familia MAPK; p38 y JNK54/46 por análisis de Western Blot con anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de estas dos quinasas (*figuras 36 y 37*).

Las retinas se analizaron a diferentes edades, 3 y 15 meses en ratones control (C57BL/6J) y enfermos (DBA/2J). De modo que, se pudo comparar con respecto al ratón control y con respecto a la propia evolución de la patología, tal y como se está llevando a cabo a lo largo de todo el trabajo experimental. Como se muestra en la figura 36, los niveles de expresión de la proteína p38 fosforilada fueron más elevados a los 15 meses que a los 3 meses de edad en los ratones DBA/2J (encontrando un aumento del 342%, $p < 0.01$). Cuando se comparó con los niveles de proteína de los ratones glaucomatosos a los 15 meses con respecto a su control de la misma edad, los niveles se incrementaron en un 212% ($p < 0.01$) (*figura 36B*).

Además del estudio de la proteína p38, se detectó una sobre-expresión de los niveles de fosfo-JNK54/46 en las retinas lesionadas de 15 meses de edad, encontrando un 79.35% ($p < 0.01$) de aumento cuando se comparaba con los ratones control a los 15 meses. Cuando se analizó la activación de dicha proteína durante el progreso de la patología entre 3 y 15 meses, se observó un aumento del 55.10% ($p < 0.01$) en ratones DBA/2J (*figura 37A, B*).

Se observó un ligero aumento dependiente de la edad no significativo en los niveles de las proteínas fosforiladas obtenidos entre los 3 y 15 meses de edad en el ratón control. Los niveles de proteína total p38 y JNK54/56 se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo (*figura 36 y 37 A, B*).

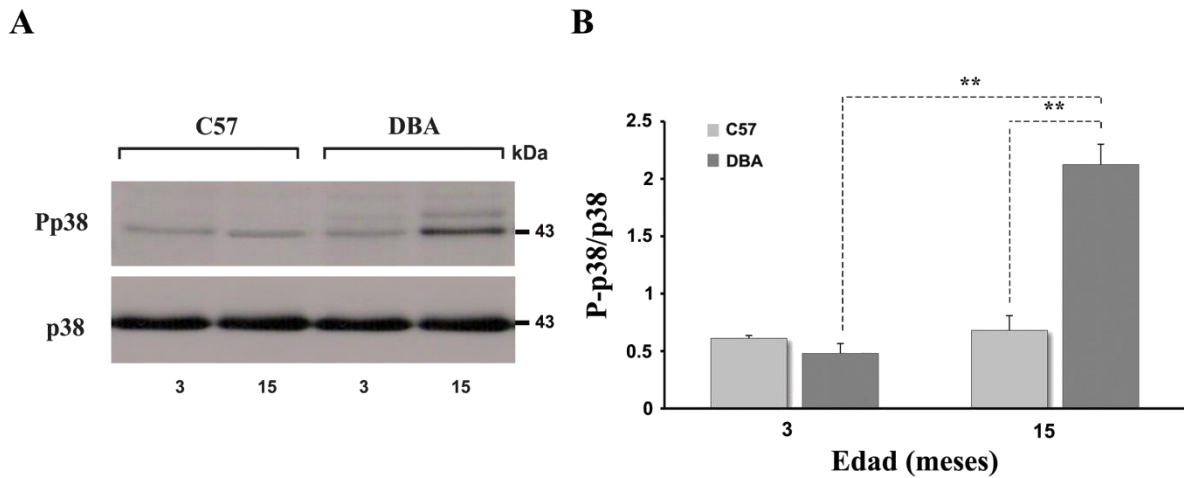


Figura 36. Cuantificación de P-p38 en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de P-p38 en los ratones control C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J a 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando p38 como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** p < 0.01).

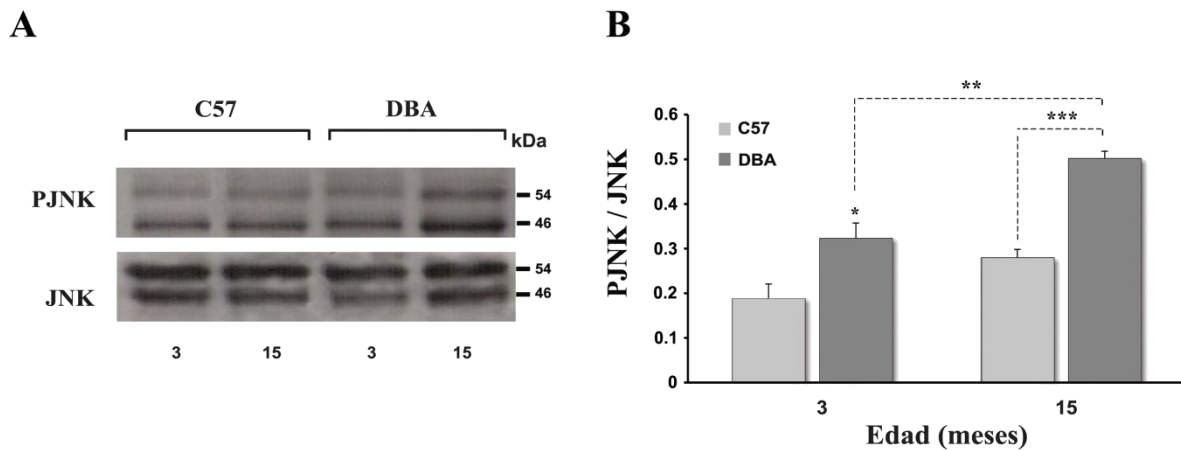


Figura 37. Cuantificación de P-JNK en las retinas C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los ratones control y glaucomatosos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de P-JNK en los ratones control C57BL/6J y DBA/2J a los 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando JNK como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

5.1.2 Activación y medida de la actividad enzimática de la caspasa-3.

Tal y como se ha descrito en el apartado 4.4.3.1, se ha caracterizado la pérdida de células ganglionares en este modelo murino de glaucoma. Se pudo caracterizar morfológicamente y cuantificar la muerte de las células ganglionares de la retina del ratón DBA/2J. Para evaluar el tipo de muerte neuronal originada resultaba interesante analizar si se trataba de un proceso de muerte celular programada. Por lo que, se estudió la posible muerte apoptótica mediante la expresión de la caspasa-3. El análisis por Western Blot de los extractos de retina mostraron una mínima expresión de caspasa-3 en retinas no patológicas (retinas de control y retinas DBA a los 3 meses) y durante el desarrollo de la patología, se incrementó su expresión, obteniendo valores de un 439 % ($p < 0.01$) 5.39 veces con respecto al ratón control y de 172% ($p < 0.01$) con respecto a los niveles detectados en los DBA/2J a los 3 meses (figura 38).

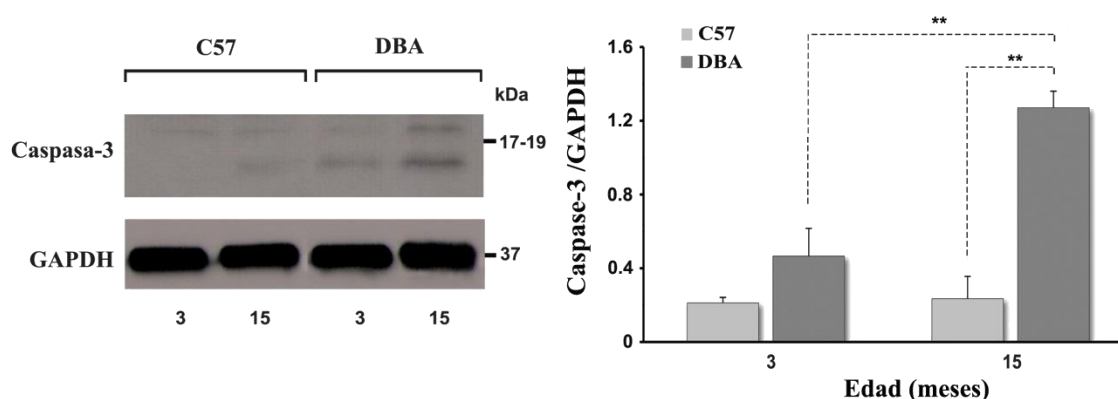


Figura 38. Cuantificación de caspasa-3 en las retinas de los ratones C57BL/6J y DBA/2J. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos a 3 y 15 meses de edad. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles en los ratones control C57BL/6J y glaucomatosos. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.01$).

Estos resultados de inmunotransferencia se correlacionaron con la medida de la actividad de caspasa-3 en las retinas control y patológicas (DBA/2J) a los 3 y 15 meses. Se observó un gran aumento de la ruptura de Ac-DEVD-N'-MC-R110 en las retinas glaucomatosas. Como se muestra en la figura 39, la actividad de la caspasa-3 se

incrementó significativamente a los 15 meses de edad en los ratones DBA/2J (188%; $p < 0.01$) en comparación con las retinas DBA/2J a los 3 meses. Del mismo modo, los niveles de actividad enzimática se incrementaron un 218% ($p < 0.001$), cuando se comparó con los valores obtenidos en el ratón control.

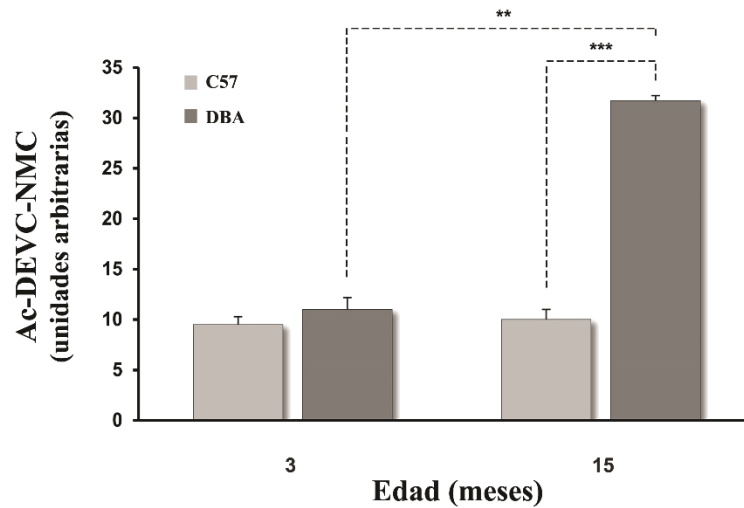


Figura 39. Actividad enzimática de la caspasa-3 en retinas de ratones control y enfermo a los 3 y 15 meses. La activación de la caspasa-3 se midió incubando las retinas con el sustrato de caspasa-3 fluorescente, tal y como se describió en Material y métodos. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de tres ratones (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5.2 In vitro.

5.2.1 Caracterización farmacológica del receptor P2X7.

Para poder estudiar mediante un modelo *in vitro* la posible vinculación del receptor P2X7 a las vías de señalización observadas en el modelo, inicialmente se quiso determinar la presencia de dicho receptor en la línea celular R28 mediante Western Blot (figura 40).

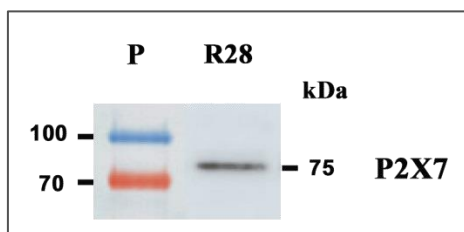


Figura 40. Western Blot representativo de la presencia del receptor P2X7 en las células R28 E1A-NR.3 (R28). *P* patrones de peso molecular conocido.

A continuación, se quiso comprobar el comportamiento general de la señal de calcio cuando se estimulaban dichas células con ATP, de modo que se produjera una respuesta general de todos los receptores P2X y P2Y presentes en dicha línea celular (*figura 41A*). Para ello, se empleó una concentración de ATP de 100 μM y, posteriormente se aplicó un inhibidor general de los receptores P2Y, la suramina. Se observó una disminución de aproximadamente un 50% con respecto a la respuesta inicial, lo que confirmaba la presencia de dos tipos de receptores en esta línea celular, tal y como se describió en una serie de *arrays* realizados por Seigel (2014). Del mismo modo, se demostró cómo activando únicamente los receptores P2Y mediante la aplicación de UTP 100 μM , la respuesta producida era debida a dichos receptores siendo prácticamente eliminada en su totalidad por acción de la suramina a 100 μM (*figura 41C*).

A continuación, se evaluó la respuesta a calcio de los receptores P2X. Para ello, se estimuló con ATP, de modo que se produjera la respuesta de los receptores P2X y, a continuación, se incubó con A438079 5 μM obteniéndose una disminución de la respuesta a calcio originada por la eliminación de la contribución de P2X7 a la respuesta global. Seguidamente, se incubó de nuevo con A438079 5 μM y suramina 100 μM , obteniendo la disminución del pico. La respuesta final era la originada por parte únicamente de los receptores P2X (*figura 41B*).

Finamente, se quiso determinar la respuesta de calcio inducida exclusivamente por el receptor P2X7. Se estimularon las células con BzATP 100 μM , para ser seguidamente activado en presencia de suramina y, eliminando la participación P2Y a la respuesta (*figura 41D*).

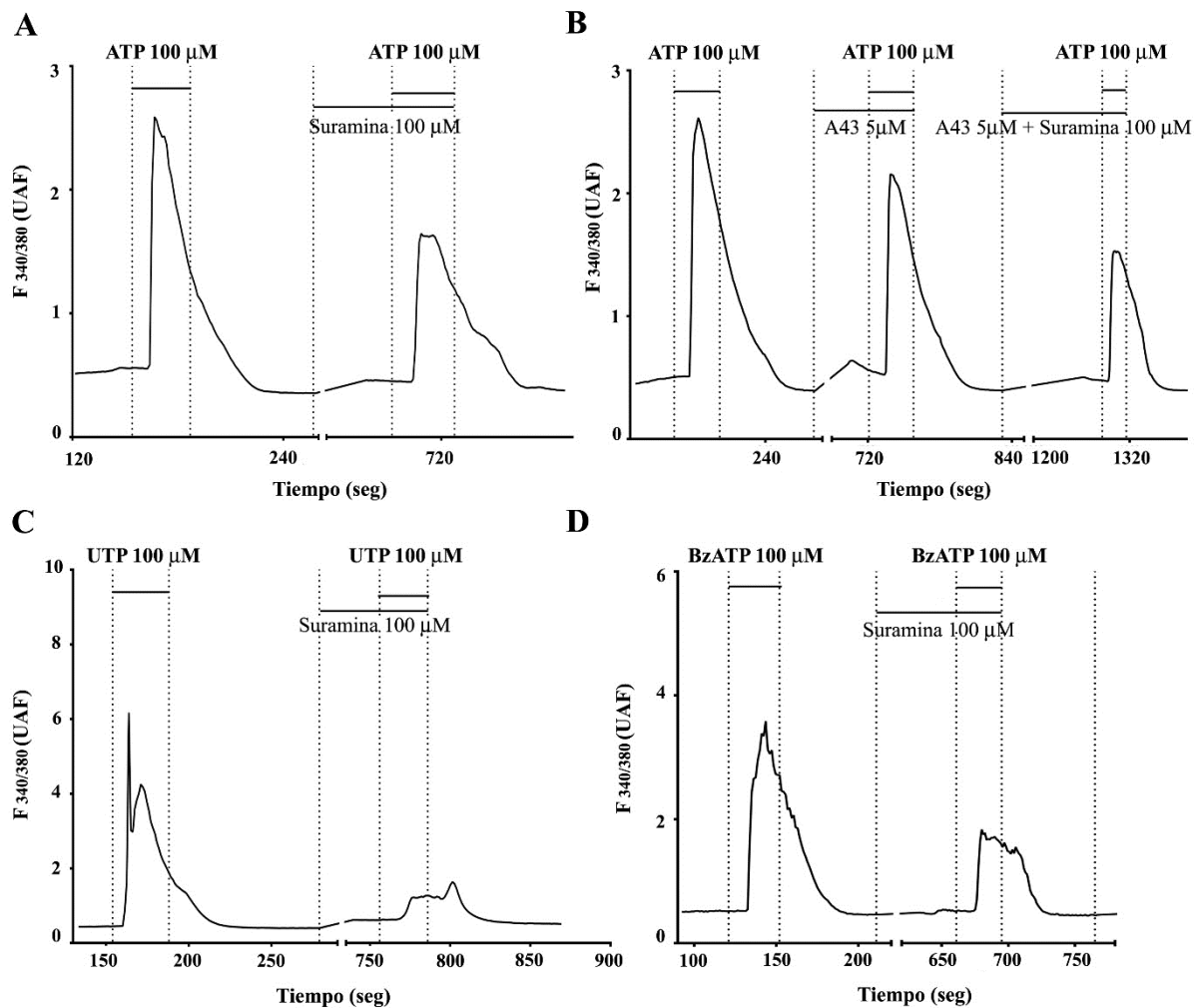


Figura 41. Respuestas de calcio inducidas por diferentes agonistas P2X y P2Y en células R28 individuales. Las células se estimularon durante 30 s con ATP 100 μM, UTP 100 μM o BzATP 100 μM. Una vez recuperado el valor basal, se realizaron diferentes incubaciones durante 5 minutos con distintos antagonistas (*ver texto*).

Cabe señalar que el BzATP es bastante selectivo para el receptor P2X7, pero también puede activar otros P2X (Bianchi y cols., 1999). Por ello, para potenciar las acciones del BzATP sobre el receptor P2X7, los experimentos se realizaron de manera rutinaria en un medio en ausencia de Mg^{2+} (Locke sin Mg^{2+}), ya que una de las características diferenciales del P2X7 es su sensibilidad a la inhibición por cationes divalentes (Virginio y cols., 1997).

5.2.2 Ensayos de viabilidad celular.

Se realizaron estudios de citotoxicidad exponiendo a las células R28 a diferentes concentraciones del agonista del receptor P2X7, BzATP durante 48 horas. De esta

manera, se pudo determinar el umbral a partir del cual se desencadena el proceso de muerte celular y, se estableció el rango de concentraciones adecuado para los estudios posteriores de muerte celular programada. Estos ensayos, se llevaron a cabo mediante ensayos con MTT, tal y como se describió en el apartado 12 de Material y métodos.

Se observó cómo a partir de concentraciones de BzATP de 100-250 μM se produjo una considerable disminución de la viabilidad celular (40%, $p < 0.01$). El descenso fue más acusado cuando se aplicaban concentraciones entre 500-750 μM (55%, $p < 0.01$). A concentraciones superiores de 750 μM la muerte celular era masiva, por lo que se determinó un rango en el que podría empezar a desencadenarse un proceso apoptótico entre [100-750] μM de BzATP (*figura 42A*).

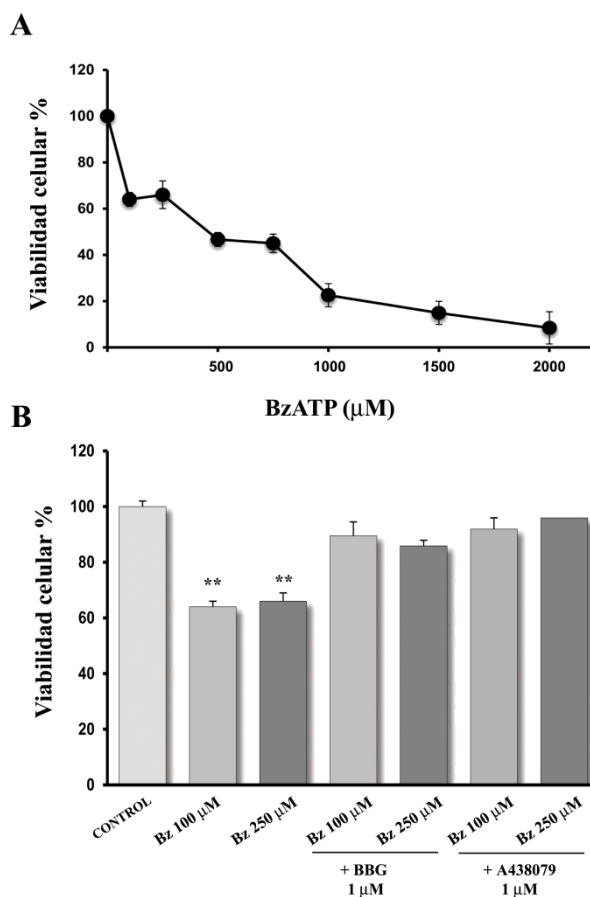


Figura 42. Estudio de la viabilidad celular de la línea celular R28. La línea celular fue estimulada con BzATP a concentraciones de entre 100 y 2000 μM durante 48 horas (A). También se realizaron estimulaciones con BzATP 100 y 250 μM en presencia de antagonistas específicos (A43 y BBG) a 1 μM (B). Los valores mostrados corresponden a la media \pm DS de tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.01$).

A continuación, se evaluó el efecto de los antagonistas sobre el receptor P2X7. Para ello, se utilizaron dos antagonistas específicos (BBG y A438079) junto a concentraciones del agonista donde comienza a producirse la disminución de la viabilidad celular 100 y 250 μM (*figura 42B*). En presencia de estos antagonistas el efecto fue revertido, lo que confirma que la disminución de la supervivencia celular era inducida por la activación del receptor P2X7 vía BzATP (*figura 42B*).

5.2.3 Fosforilación de las proteínas p38 y JNK mediada por BzATP en la línea inmortalizada de retina R28.

Una vez determinada la activación de estas rutas de señalización en el modelo murino de glaucoma, se decidió comprobar la implicación directa del receptor P2X7 en la estimulación de dichas vías de señalización en la línea inmortalizada de retina R28.

Para estudiar el efecto de la activación del receptor P2X7 sobre las proteínas p38 y JNK se empleó el agonista BzATP y se evaluó el estado de fosforilación de dichas proteínas mediante experimentos de inmunodetección por ELISA (*figuras 43 y 44*). Como se observa en la *figura 43A*, los incrementos en la fosforilación de la proteína p38 inducidos por el agonista fueron transitorios, observándose ya ésta fosforilación a tiempos de 5 minutos, alcanzando sus niveles máximos a los 15 minutos de estimulación y, volviendo progresivamente a los niveles basales a tiempos más largos de 30 minutos-1 hora. Así, por ejemplo a una concentración de BzATP de 250 μM se detectó un incremento en la fosforilación de p38 de un 56% y un 73% para los tiempos de 5 y 15 minutos (*figura 43B*).

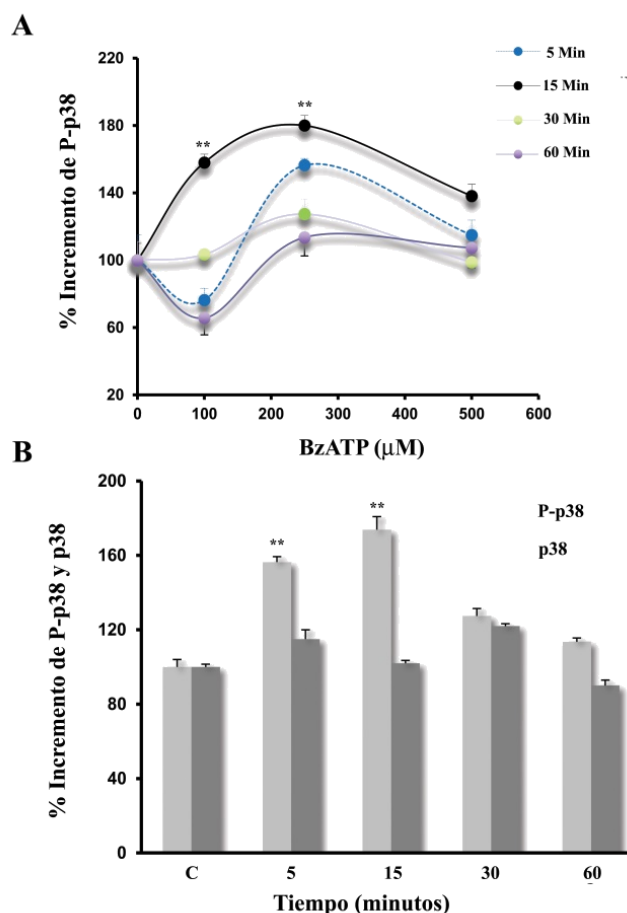


Figura 43. Efecto del BzATP sobre la fosforilación de p38. (A) Dosis-respuesta del porcentaje de incremento en la fosforilación de p38 en función de la concentración (0-500 μM). Estos experimentos se llevaron a cabo a diferentes tiempos. (B) Porcentaje de incremento de la fosforilación de la proteína p38 tras la estimulación celular mediante BzATP a 250 μM en función del tiempo. Los valores mostrados en gráficas corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.01$).

Del mismo modo, se estudió el efecto del BzATP sobre el estado de fosforilación de la proteína JNK en las células R28. Como se observa en la figura 44A, a todas las concentraciones evaluadas se observó un incremento significativo de la fosforilación de la proteína a los 5 minutos de estimulación con el agonista, alcanzándose los valores más altos transcurridos 15 minutos. Estos incrementos fueron inducidos a concentraciones de 250 μM y 500 μM . Se detectó un aumento del 51% a una concentración de agonista de 250 μM y un 160% para 500 μM a los 5 minutos (figura 44B) y un aumento del 107% para 250 μM y de 205% para la concentración de agonista de 500 μM a los 15 minutos. El incremento en el estado de fosforilación de

JNK se mantuvo en el tiempo de 30 minutos y tiende a retornar hacia los niveles basales a los 60 minutos.

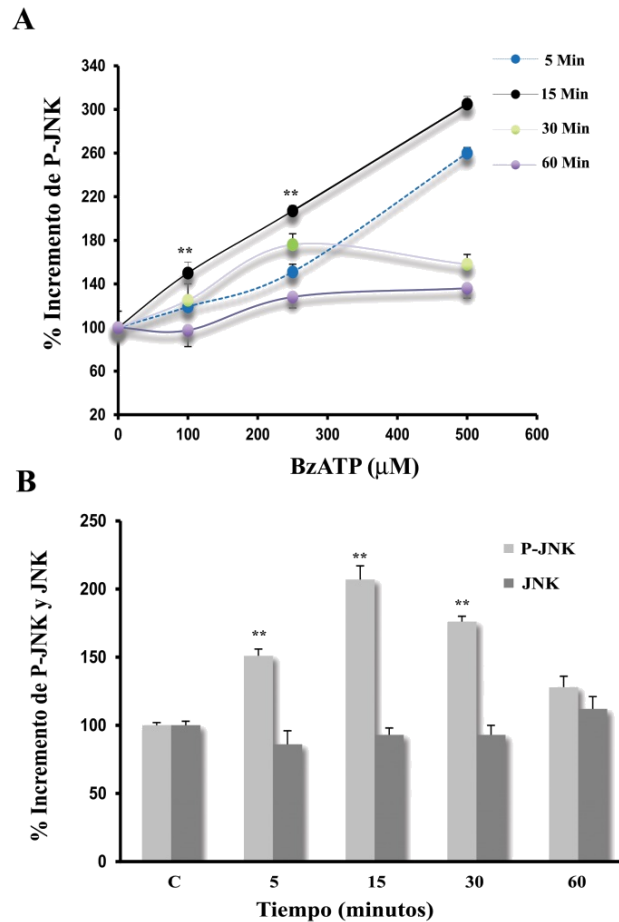


Figura 44. Efecto del BzATP sobre la fosforilación de JNK. (A) Dosis-respuesta del % de incremento de fosforilación de JNK en función de la concentración. Estos experimentos se llevaron a cabo a diferentes tiempos. (B) % de incremento de la fosforilación de la proteína JNK tras la estimulación celular mediante BzATP a 250 µM en función del tiempo. Los valores mostrados en gráficas corresponden a la media ± DS de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media ± DS de, al menos, tres ratones (** p < 0.01).

Se observó un inicio de la fosforilación de la proteína estadísticamente significativo a concentraciones de agonista de 100 µM durante 15 minutos, aumentando dicha activación a medida que se incrementaba la concentración de BzATP. El perfil de respuesta encontrado para la incubación de agonista durante 5 minutos fue muy similar (figura 44A). Sin embargo, cuando se aplicaba el agonista durante 30-60 minutos se observó un aumento significativo de la fosforilación a concentraciones de 250 µM, revirtiéndose dicho efecto a concentraciones crecientes del mismo. Se fijó una

concentración de BzATP de 250 μM con el fin de obtener los valores más altos de fosforilación de P-JNK (*figura 44B*) y estudiar el efecto del antagonismo del receptor.

5.2.4 Identificación del receptor P2X7 como responsable de la respuesta inducida por el BzATP sobre la fosforilación de las proteínas p38 y JNK.

Para poder confirmar que el efecto del BzATP sobre la señalización de ambas proteínas estaba mediado por un receptor P2X7, se emplearon antagonistas específicos de dicho receptor (BBG y A438079). Tal y como se muestra en las figuras 45 y 46, tanto el BBG (Jiang y cols., 2000) como el A-438079 (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007), fueron capaces de disminuir el incremento inducido por BzATP en la fosforilación de ambas proteínas. Así como se mostraba en las figuras 43 y 44, a los 15 minutos el tratamiento de BzATP a 250 μM produjo un significativo incremento de los niveles de P-p38 (73%) y P-JNK (107%), en presencia de los antagonistas no fue posible detectar dicho aumento. De esta manera, se confirmó que el receptor P2X7 media las acciones efectuadas por el BzATP en el cultivo retiniano.

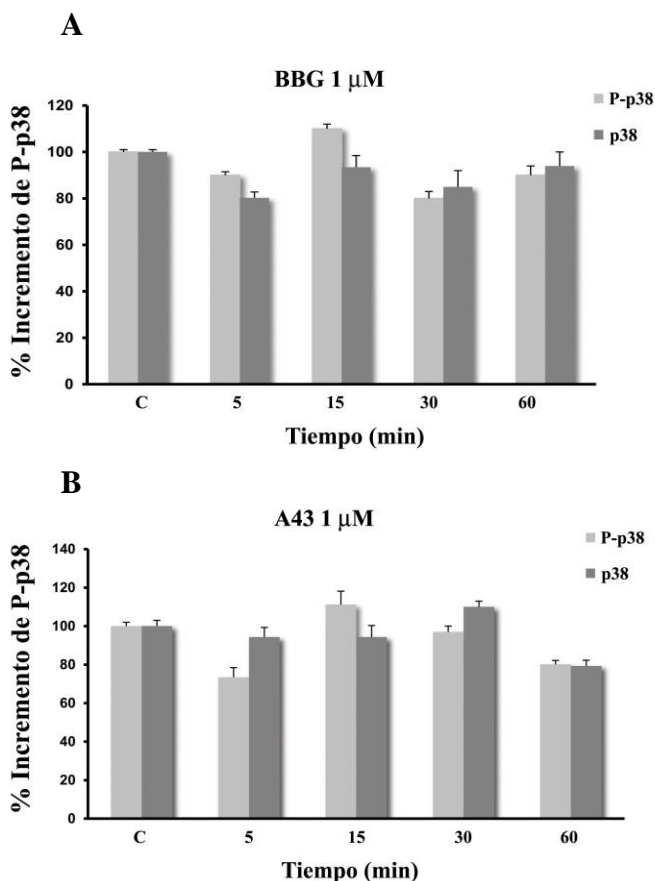


Figura 45. Efecto de distintos antagonistas nucleotídicos sobre la fosforilación de P38 inducida por el BzATP. Las neuronas fueron estimuladas a concentración de BzATP de 250 μM a diferentes tiempos en presencia de antagonistas (A) BBG a 1 μM y (B) A438079 a 1 μM . Los valores mostrados en gráficas corresponden a la media \pm DS de, al menos tres experimentos independientes de cultivos diferentes.

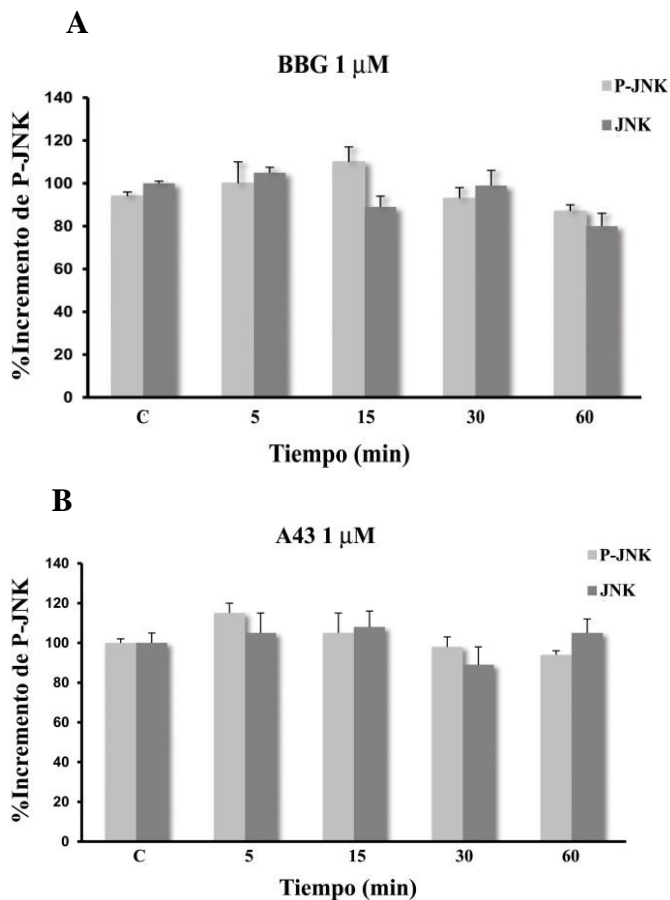


Figura 46. Efecto de distintos antagonistas nucleotídicos sobre la fosforilación de JNK inducida por el BzATP. Las neuronas fueron estimuladas a concentración de BzATP de 250 μ M a diferentes tiempos en presencia de antagonistas (A) BBG a 1 μ M y (B) A43a μ M. Los valores mostrados en graficas corresponden a la media \pm DS de al menos tres experimentos independientes de cultivos diferentes.

5.2.5 Efecto del BzATP en la activación del marcador de apoptosis caspasa-3.

Una vez analizada la señalización del BzATP acoplada a las proteínas p38 y JNK, se quiso determinar si estaba comprometida otra proteína implicada en numerosos procesos de muerte celular, la caspasa-3. Esta proteína perteneciente a la familia de las caspasas, están relacionadas fundamentalmente con vías apoptóticas y han sido relacionadas en numerosos trabajos en procesos de neurodegeneración como ya se ha comentado anteriormente (Zhang y cols., 2005). Además, tanto las MAP kinasas (p38 y JNK) como las caspasas, están involucradas en procesos de daño neuronal a través de la señalización mediada por la activación del receptor P2X7.

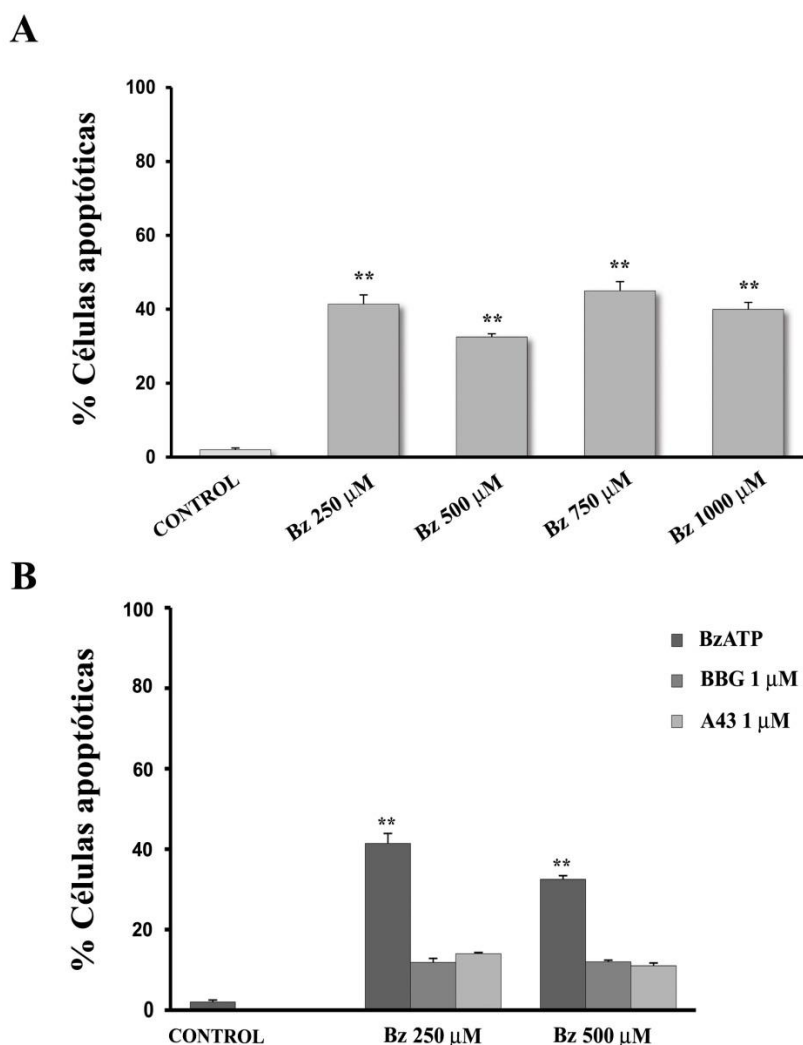


Figura 47. Evaluación de células apoptóticas obtenidas por estudios de citometría de flujo. (A) La activación de la caspasa-3 (indicativa de apoptosis celular) se analiza tras la exposición de las células a distintas concentraciones de BzATP. (B) Inhibición del proceso de muerte celular programada mediante el uso de antagonistas específicos tras la estimulación a diferentes concentraciones de BzATP. Los datos se muestran como porcentaje de células apoptóticas (con caspasa-3 activa) totales (células en apoptosis temprana y células en apoptosis en estadios avanzados). Los valores mostrados en gráficas corresponden a la media \pm DS de, al menos tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los datos se consideraron significativos estadísticamente a ** $p < 0.01$.

Se observó un aumento de aproximadamente 45% de células apoptóticas en el rango de concentraciones [250-1000] μM de exposición al agonista (*figura 47A*), dicho incremento se vio reducido significativamente (*figura 47B*) al realizar el ensayo en presencia de antagonistas selectivos del receptor (BBG y A438079).

6. EFECTO DEL BBG EN LA DEGENERACIÓN RETINIANA DEL MODELO DBA/2J.

6.1 Efecto del BBG sobre la respuesta electrorretinográfica de los ratones glaucomatosos tratados.

El tratamiento mediante antagonistas del receptor P2X7, tales como BBG y A438079, habían demostrado ser capaces de prevenir la activación del proceso de neurodegeneración inducidos por activación de dicho receptor en diferentes patologías (Diaz-Hernandez y cols., 2012). Además, en estudios *in vivo* se demostró cómo el tratamiento con el antagonista modificaba la actividad eléctrica de la retina de ratón (Puthussery y cols., 2006; Puthussery y Fletcher, 2009) en el proceso de neurotransmisión. Los estudios *in vitro* realizados por Zhang y cols. (2005), demostraron la implicación de dicho receptor y su activación en la muerte de las CGR. Todo ello y, los resultados mostrados anteriormente en los estudios *in vitro*, señalaba el posible establecimiento del BBG o A438079 como posibles agentes neuroprotectores en nuestro modelo de glaucoma.

Por lo que, para su demostración directa, se decidió llevar a cabo un tratamiento de los ratones DBA/2J (*ver apartado 4.1.3 de Material y Métodos*) y evaluar la posible mejora de la función visual de los mismos.

Los registros ERG se realizaron en los ojos derechos de ratones DBA/2J tratados (n=10) y no tratados (n=10) de la misma edad antes (a los 11 meses) y después (a los 15 meses) de ser tratados durante aproximadamente 4 meses. Se evaluó la respuesta STR, tal y como se ha descrito en el *apartado 6.2.1 de Material y Métodos*.

Cuando se analizaron las respuestas ERG de los ratones control (DBA/2J no tratados) con los DBA/2J tratados no se apreciaron diferencias significativas en ninguna de las intensidades analizadas. Así como tampoco se observaron diferencias significativas cuando se compararon los ratones tratados antes y después de comenzar el tratamiento (*figura 48*).

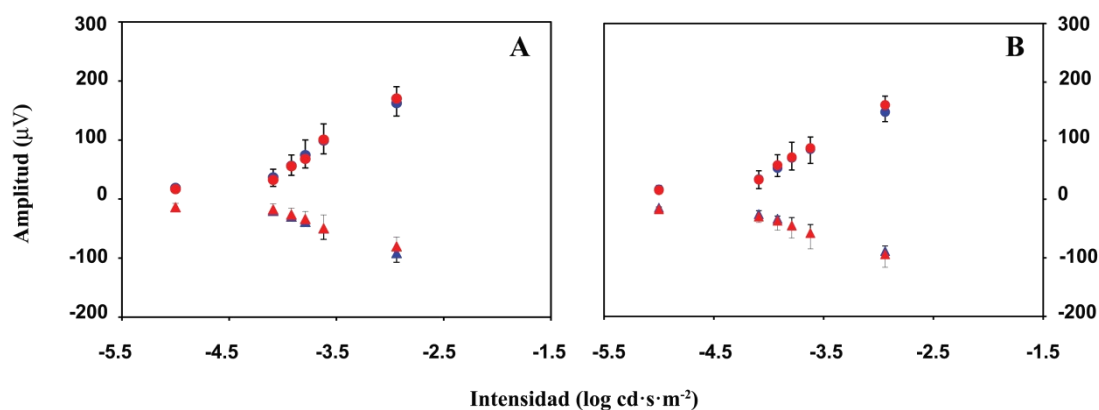


Figura 48. Representación gráfica de las amplitudes promediadas versus intensidad de estímulo en los ojos derechos e izquierdos de ratones control C57BL/6J (puntos azules) y ratones DBA/2J (puntos rojos) a los 11 meses (A; n=9 para cada cepa de ratón) y 15 meses (B; n=9 para cada cepa de ratón). Los datos corresponden a pSTR (círculos azules y rojos) y a pSTR (triángulos azules y rojos).

6.2 Estudio de los niveles de expresión de las MAPK.

Una vez evaluada la función visual de los ratones en función del tratamiento establecido, se quiso determinar si dicho tratamiento había originado algún cambio molecular a nivel de señalización intracelular.

Las retinas se analizaron antes y después del tratamiento estableciendo estudios comparativos entre los ratones tratados y no tratados, y con respecto a la propia evolución de cada uno de los grupos. Se observó cómo los niveles de expresión de las proteínas p38 y JNK fosforiladas disminuyeron significativamente en ambos casos. Encontrando valores de 91 % ($p < 0.05$) en el caso de P-p38 y de 44.73 % ($p < 0.05$) en el caso de P-JNK con respecto a los ratones no tratados a los 15 meses. Al establecer el estudio comparativo antes y después del tratamiento en el grupo tratado se obtuvieron descensos de fosforilación del 92% ($p < 0.01$) en el caso de P-p38 y de 39.13 % ($p < 0.05$) en el caso de P-JNK (figura 49).

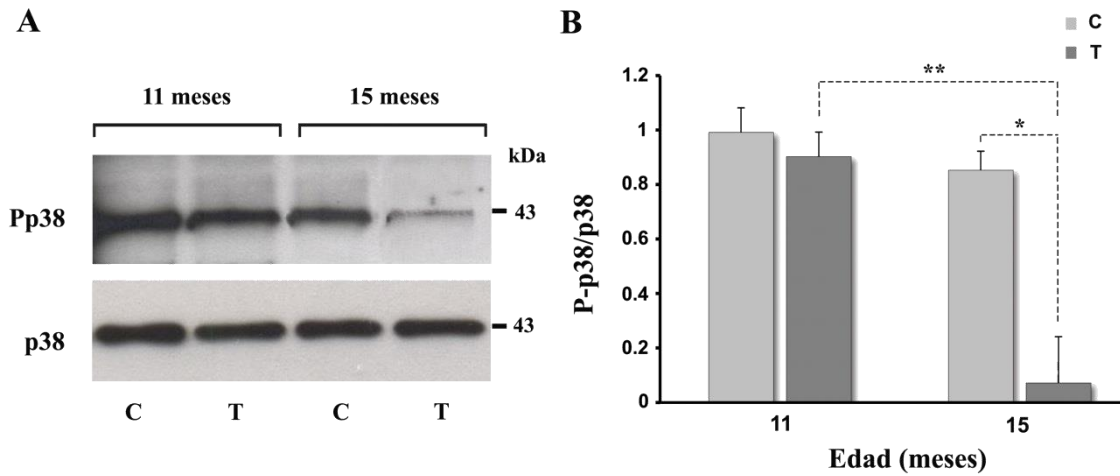


Figura 49. Cuantificación de P-p38 en las retinas de ratones DBA/2J tratadas (T) con BBG (45.5 mg/kg) y no tratadas (C, controles). (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de P-p38 en los ratones glaucomatosos DBA/2J antes y después del tratamiento. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

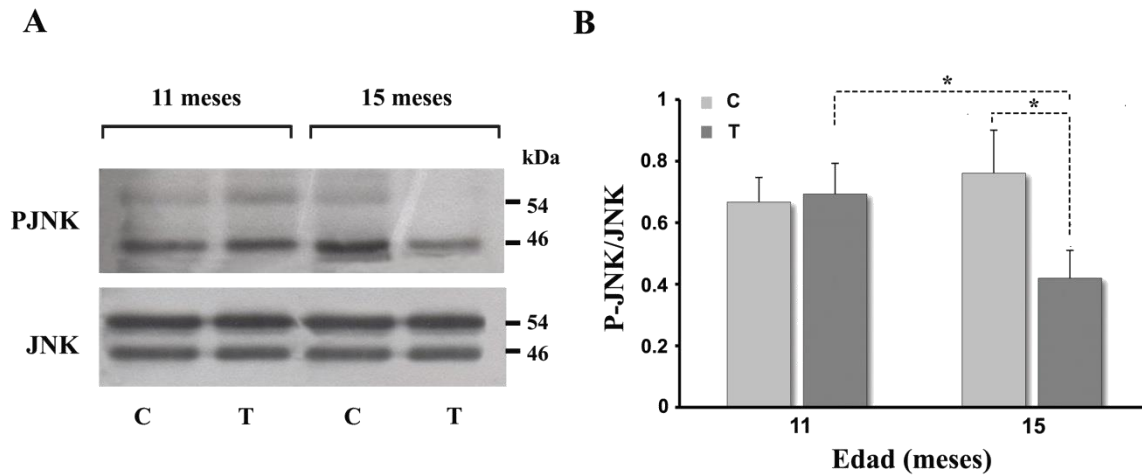


Figura 50. Cuantificación de P-JNK en las retinas de ratones DBA/2J tratadas (T) BBG (45.5 mg/kg) y no tratadas (C) con (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos múridos. (B) Análisis de la cuantificación de los niveles de P-JNK en los ratones glaucomatosos DBA/2J antes y después del tratamiento. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (* $p < 0.05$).

Estos resultados, confirmaban que el tratamiento mediante antagonismo del receptor P2X7, a pesar de no estar produciéndose un cambio funcional de la respuesta electroretinográfica de la retina (*ver apartado 6.1*) está regulando las rutas de señalización intracelular estudiadas, posiblemente inhibiendo la consecuente activación de las caspasa-3.

7. ESTUDIO COMPARATIVO CON UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Con el fin de evaluar las posibles similitudes entre la enfermedad glaucomatosa y la enfermedad de Alzheimer, se realizaron experimentos preliminares para poder establecer una comparación objetiva entre ambos modelos en neurodegeneración.

7.1 Caracterización funcional de la respuesta electroretinográfica del proceso neurodegenerativo en la enfermedad de Alzheimer.

Para evaluar el estado de la respuesta funcional de la retina del modelo de enfermedad de Alzheimer se analizó la respuesta electroretinográfica escotópica. Los registros ERG se realizaron en los ojos derechos de ratones transgénicos Tg ($A\beta$ PPswe, PSEN1dE9) y su respectiva cepa control B6C3F1 a diferentes edades (5 y 17 meses). Para estudiar la evolución del desarrollo de la patología, se establecieron grupos de ocho animales con sus correspondientes controles a los 5 y 17 meses y se evaluó la STR y escotópica.

Los registros STR se realizaron bajo estímulos luminosos (-5.00 a $-4.09 \log \text{cd s m}^{-2}$) No se detectó *onda a* para intensidades de luz inferiores a $-2.94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. La *onda b* también aumentó de manera exponencial, alcanzando su máximo con estímulos de $-2.94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Tal y como se describió anteriormente en el modelo de glaucoma (*ver apartado 2*).

A los 5 meses de edad, no se detectaron diferencias en la respuesta pSTR y nSTR de los ojos del modelo de EA con respecto a los ratones control (*figura 51A*). Sin embargo, a los 17 meses los registros electroretinográficos de animales representativos de EA mostraron una reducción significativa de aproximadamente un 33.18 % y de

45.51% con respecto a los ratones control ($p < 0.001$) a una intensidad luminosa de -3.79 y $-5 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ respectivamente. En este estadio, los registros ERG escotópicos registrados en los ojos enfermos también mostraron diferencias significativas encontrándose una reducción de la onda b del 24.8 % con respecto al control ($p < 0.001$).

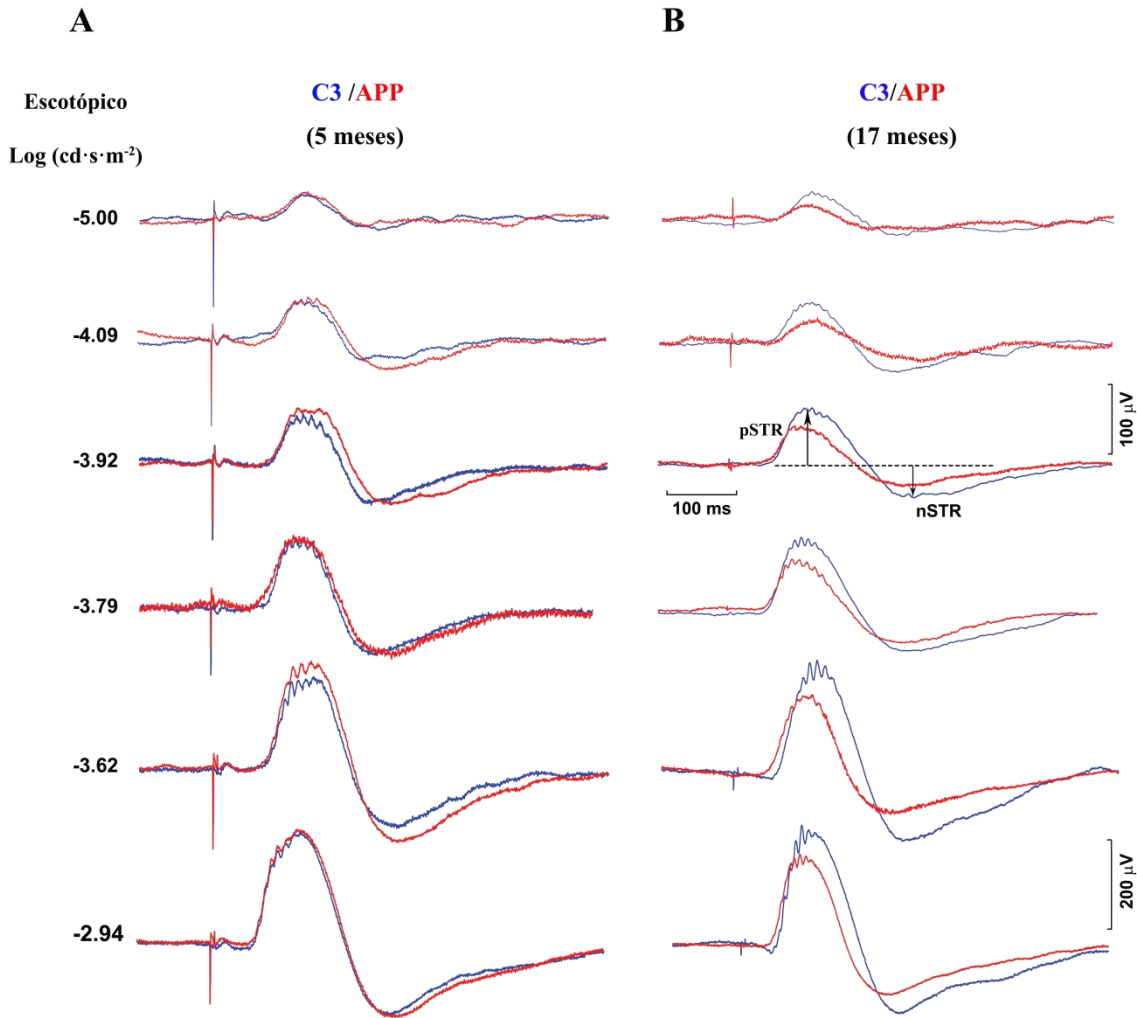


Figura 51. Registros electroretinográficos escotópicos a los 5 y 17 meses de edad en el modelo de enfermedad de Alzheimer a los 5 y 17 meses con respecto a los ratones control. Ejemplos de registros ERG en un ratón control (trazo azul) y en un modelo de ratón de EA (trazo rojo). Al aumentar la intensidad del impulso lumínico, cada respuesta STR (amplitud) se incrementó, estableciéndose un rango de intensidad entre -5 y $-2.94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ registrados. La intensidad del estímulo luminoso se muestra a la izquierda de los registros ERG en $\log \text{cd s m}^{-2}$.

Los valores absolutos de la amplitud de respuesta de la STR a los 17 meses en los ratones de enfermedad de Alzheimer, mostraron una reducción estadísticamente significativa para la mayoría de los estímulos presentados respecto a los ratones control (*Figura 52*). También, se observó una disminución significativa de la onda b con respecto a los ratones control.

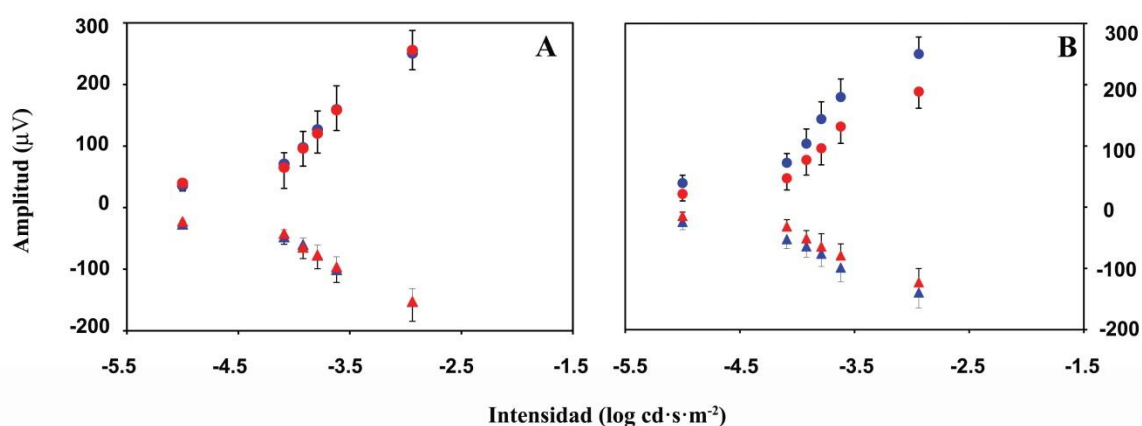


Figura 52. Representación gráfica de las amplitudes promediadas versus intensidad de estímulo en los ojos derechos e izquierdos de ratones control (puntos azules) y de enfermedad de Alzheimer (puntos rojos) a los 5 meses (A; n=10 para cada cepa de ratón) y 17 meses (B; n=10 para cada cepa de ratón). Los datos corresponden a nSTR (círculos azules y rojos) y a pSTR (triángulos azules y rojos). Se aprecia una reducción significativa de las amplitudes de pSTR en los ratones APP de los 5 a 17 meses ($p < 0.001$).

Del mismo modo, se analizaron las respuestas pSTR a medida que se desarrollaba la patología en los ratones de EA (*figura 53*), encontrando una disminución significativa de un 20 % ($p < 0.05$) y de 46.06 % ($p < 0.001$) a una intensidad luminosa de -3.79 y -5 log cd·s·m⁻² respectivamente. Además, los registros ERG escotópicos registrados en los ojos enfermos también mostraron diferencias significativas encontrándose una reducción de la onda b del 26 % durante la progresión de la patología (t-test; $p < 0.001$). Sin embargo, en los ratones control no se apreciaron cambios correspondientes al deterioro de la función visual con la edad.

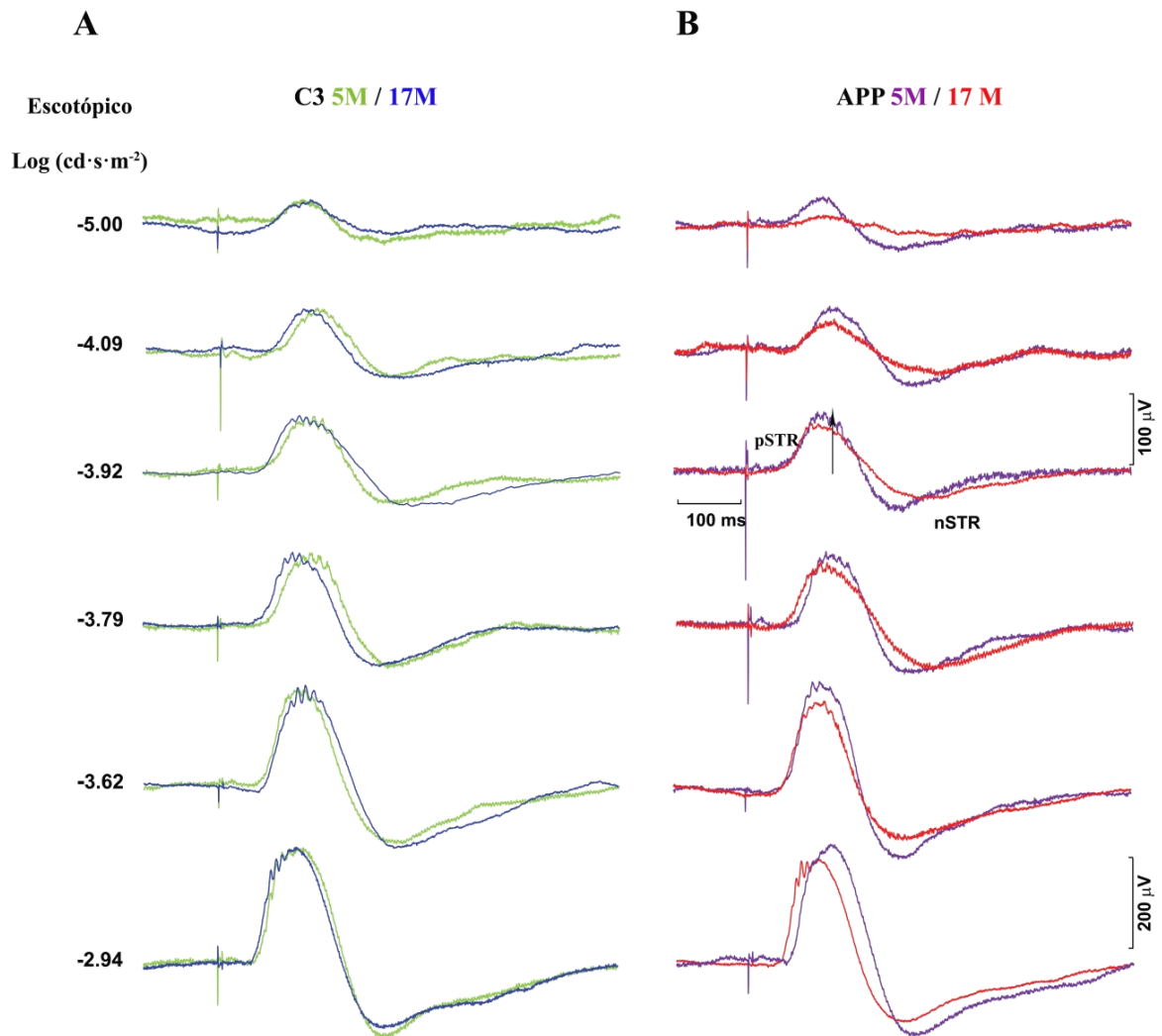


Figura 53. Evolución temporal de la amplitud de la respuesta escotópica (STR) a los 5 y 17 meses de edad en B6C3F1(A) y Tg (APP/PSEN1). (A) Registros electroretinográficos representativos del ratón B6C3F1 a los 3 (trazo verde) y 15 meses (trazo azul). (B) Registros electroretinográficos representativos del ratón Tg (APP/PSEN1) a los 5 (trazo morado) y 17 meses de edad (trazo rojo). La intensidad del estímulo luminoso se muestra a la izquierda de los registros ERG en log cd s m⁻².

7.2 Estudio temporal de la población de las CGR en el modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer.

Las CGR de los ojos izquierdos y derechos de los ratones B6C4F1 y Tg (APP, PSEN1) a los 5 y 17 meses fueron marcadas desde los colículos con OHSt y, posteriormente inmunodetectadas con Brn3a para poder evaluar el estado de las CGR con respecto a la cepa control y, con respecto a la evolución de la patología.

Los resultados obtenidos tras analizar los contajes de CGR detectadas por marcaje retrógrado y por inmunodetección con Brn3a, correspondientes a los ratones B6C3F1 a los 5 y 17 meses, mostraron una distribución normal de población de CGR. En el grupo control el número medio de CGR trazadas con OHSt por retina fue de 38567.9 ± 1619.3 n=5 (media \pm DS) a los 5 meses y se obtuvieron medias similares con alta variabilidad cuando se analizaron a los 17 meses de edad (29845.7 ± 5445.6 , n=6). En este grupo control el número medio de CGR con inmunorreactividad positiva frente a Brn3a por retina fue de 40811.5 ± 1473.5 n=5 (media \pm DS) para 5 meses y de 38390.2 ± 4992.8 n=6 (media \pm DS) para 17 meses.

Cuando se llevó a cabo el análisis de los ratones enfermos con EA, se obtuvieron valores de la población de CGR similares a los obtenidos en el grupo control a los 5 37913.1 ± 2417.6 n=5 (media \pm DS) y a los 17 meses (39275.8 ± 1750.7 n=3) de CGR marcadas con OHSt, al igual que ocurría cuando se analizaban los contajes realizados para la inmunorreactividad frente a Brn3a en ambos estadios (41300.3 ± 1601.1 a los 5 meses y 45291.8 ± 1763.6 a los 17 meses, n=3-5).

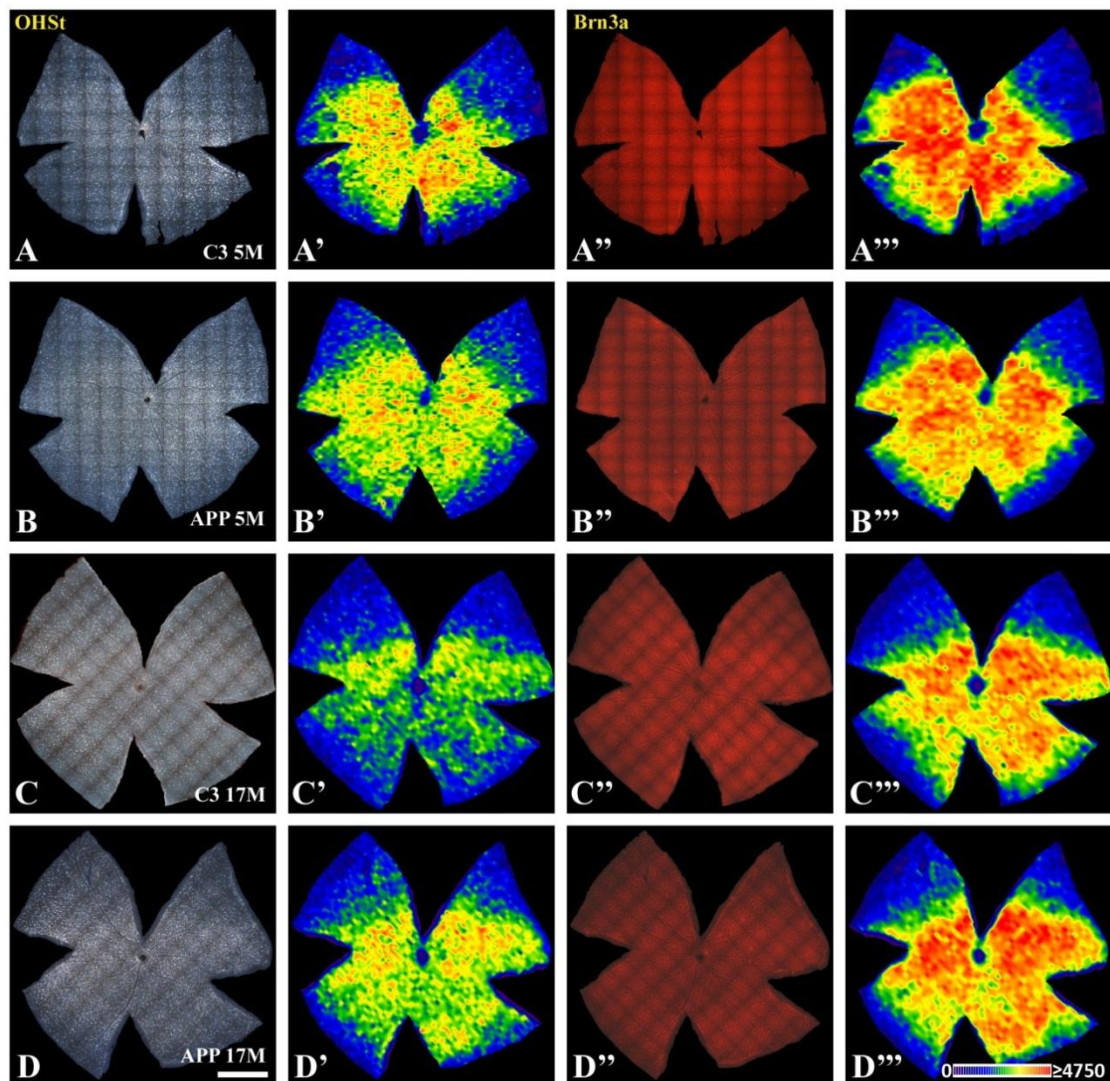


Figura 54. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales control (B6C3F1) y de enfermedad de Alzheimer Tg (APP, PSEN1) a los 5 y 17 meses de edad. Montaje global a plano “*in toto*” de una retina representativa de un ratón B6C3F1 mostrando marcaje con OHSt a los 5 y 17 meses de edad (A y C) aplicado a ambos colículos superiores una semana antes de su procesamiento e inmunotinción frente a Brn3a (A' y C') y sus correspondientes mapas de isodensidad (A', A''' y C', C'''). Los mismos montajes se realizaron con los ratones de EA Tg (APP, PSEN1) a los 5 y 17 meses marcados con OHSt (B, D) y Brn3a (B'', D'') y sus respectivos mapas de isodensidad (B', B''' y D', D'''). La reconstrucción de los montajes a plano se realizó con ayuda de una platina motorizada en un microscopio de epifluorescencia con una cámara de alta resolución conectada a un sistema de análisis de imagen (Image-Pro® Plus, V5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Barra de escala 1 mm.

7.3 Caracterización molecular del modelo de enfermedad de Alzheimer.

7.3.1 Detección de la proteína β -amiloide en las retinas de enfermedad de Alzheimer.

7.3.1.1 Detección morfológica de la proteína β -amiloide en las retinas del modelo animal de enfermedad de Alzheimer.

Se realizó la extracción a plano de las retinas a lo largo de este estudio para poder evaluar la presencia de posibles acumulaciones de la proteína β -amiloide descritas en este modelo de ratón y, su distribución a lo largo de la retina. En las retinas control, correspondientes a los ratones B6C3F1, no se apreció ningún marcaje para dicha proteína a lo largo de los estadios analizados. Lo mismo se observó en las retinas del modelo de EA a los 5 meses de edad. Sin embargo, cuando se estudiaron las retinas de los ratones transgénicos a los 17 meses de edad, se detectaron depósitos β -amiloide positivos en la CPI y en la CGR distribuidas de manera heterogénea a lo largo de las retinas (*figura 55*). En los ratones sanos de la misma edad, se detectaron algunos depósitos de la proteína β -amiloide en la CPI, posiblemente vinculados al propio proceso fisiológico de envejecimiento.

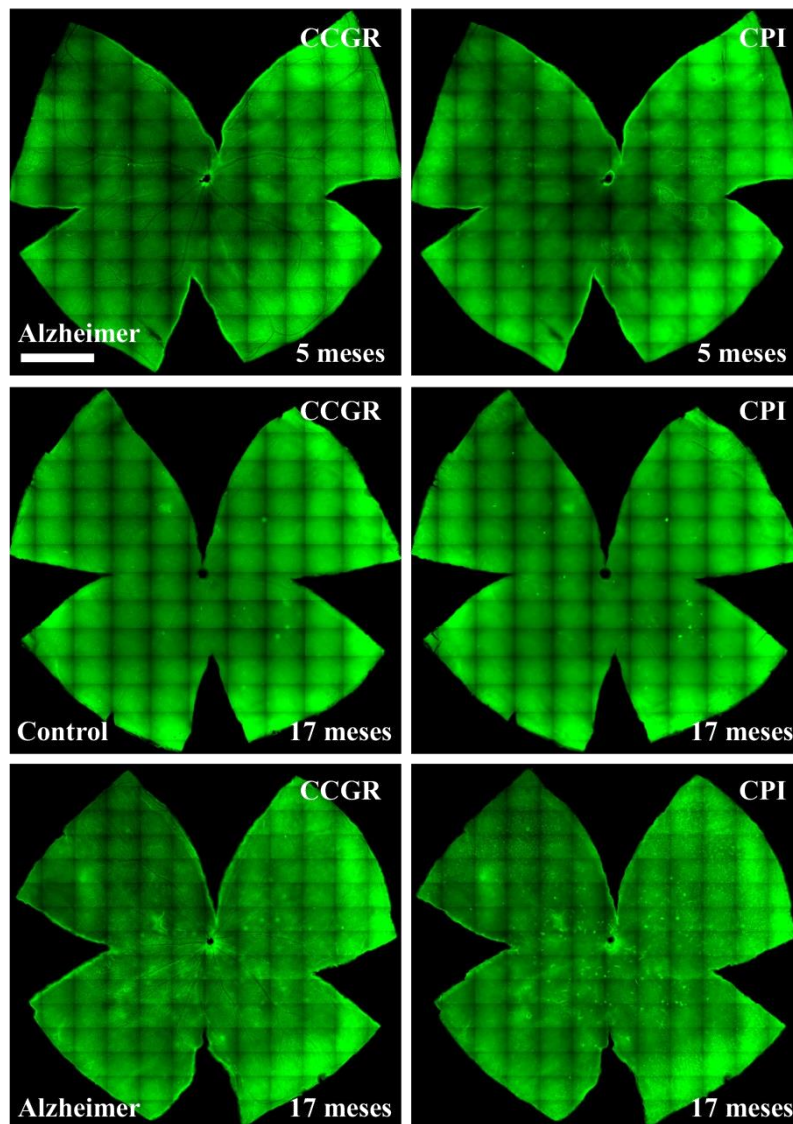


Figura 55. Inmunorreactividad frente a la proteína β -amiloide en la retina en el ratón control B6C3F1 y en el modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer Tg (APP, PSEN1). Fotomontaje micrográfico de retinas montadas a plano de ratones a los 5 (A) y 17 (B) meses de edad. Se observan depósitos de la proteína β -amiloide en la CPI y las CGR en las retinas de los ratones de EA a los 17 meses de edad. En animales sanos de la misma edad se detectan algunos depósitos. Barra de escala 1 mm.

7.3.1.2 Cuantificación de los niveles de proteína β -amiloide.

El estudio morfológico del aumento en la expresión de la proteína β -amiloide mediante inmunofluorescencia fue corroborado con la cuantificación de proteína a los 5 y 17 meses (*figura 56*). Se observó un aumento significativo de la expresión de la

proteína amiloide del 181.5%, ($p < 0.01$) en las retinas de los ratones de EA con respecto al control y al estado basal del ratón a los 5 meses de edad (188.6%, $p < 0.01$).

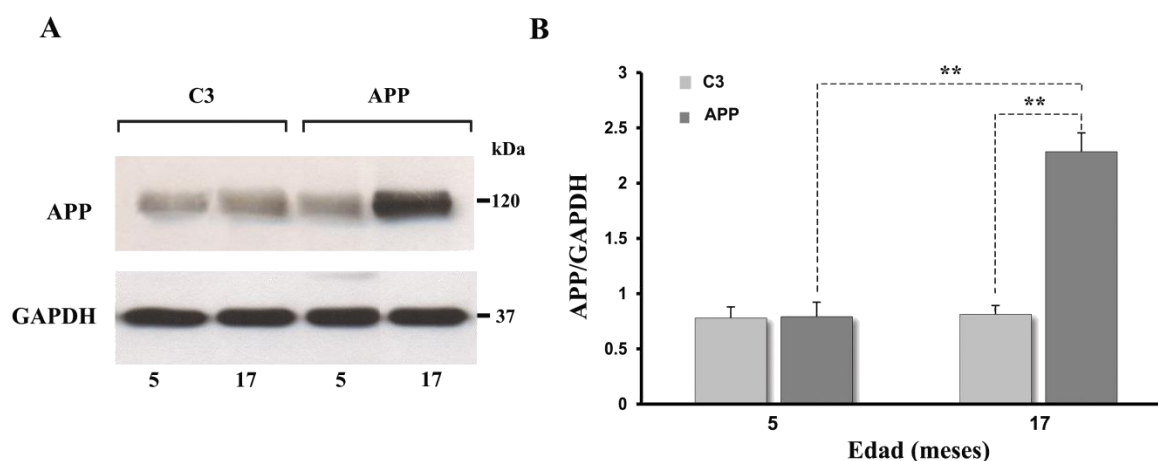


Figura 56. Cuantificación de los niveles la proteína precursora amiloide en las retinas control y del modelo de EA a los 5 y 17 meses de edad. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos mûridos. (B) La representación gráfic en columnas muestra la expresi3n de la prote3na a los 5 y 17 meses de edad. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (** $p < 0.01$).

A continuaci3n, se analiz3 la expresi3n de la prote3na en el modelo de glaucoma DBA/2J, de modo que se pudiera establecer un posible paralelismo entre ambas patolog3as, con respecto a la presencia de la prote3na amiloide (Goldblum y cols., 2007; Guo y cols., 2007b).

Los niveles de la prote3na β -amiloide aumentaron en un 37% ($p < 0.05$) en los **ratones glaucomatosos** a los 15 meses de edad cuando se compar3 con el control y con la evoluci3n de la degeneraci3n retiniana del rat3n DBA/2J, encontr3ndose un aumento del 51% ($p < 0.01$).

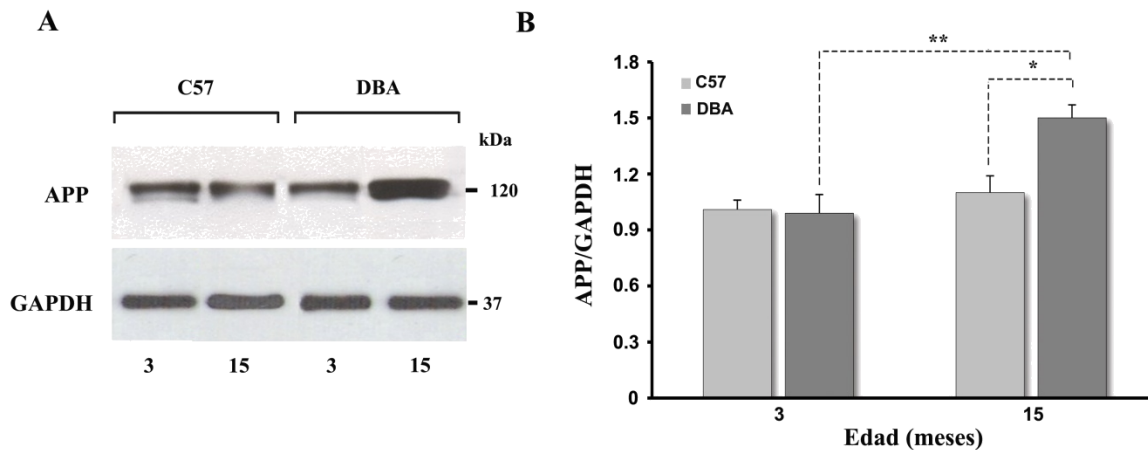


Figura 57. Cuantificación de los niveles la proteína precursora amiloide en las retinas C57BL/6J y DBA/2J los 3 y 15 meses de edad. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos murinos. (B) La representación gráfica en columnas muestra la expresión de la proteína a los 3 y 15 meses de edad. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

7.3.2 Cuantificación de los niveles de P2X7 en las retinas de enfermedad de Alzheimer.

Por analogía con el objetivo principal de la tesis, el estudio del receptor P2X7, se quiso determinar si en las retinas del modelo de ratón de EA existía alguna alteración en los niveles de la proteína. Para ello, se cuantificó mediante Western Blot la presencia de la misma a los 5 y 17 meses de edad en el modelo EA y su respectivo control.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento estadísticamente significativo de los niveles de P2X7 (32 %, $p < 0.05$) en el modelo EA de los 5 a los 17 meses al igual que cuando se comparó con el ratón control (18%, $p < 0.05$).

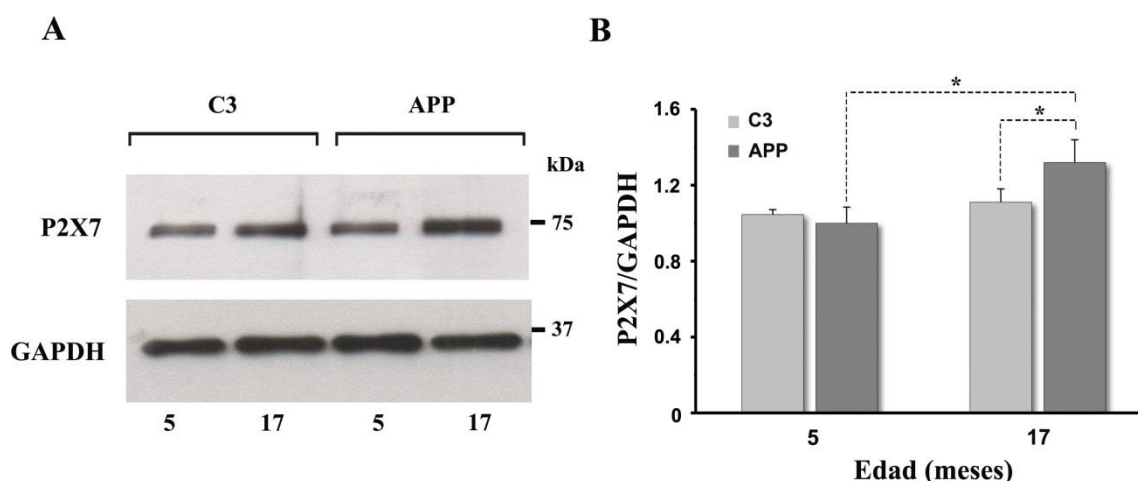


Figura 58. Cuantificación de los niveles del receptor P2X7 en las retinas control y del modelo de EA a los 5 y 17 meses de edad. (A) Bandas del Western Blot representativo de los resultados obtenidos para los modelos animales. (B) La representación gráfica en columnas muestra la expresión del receptor P2X7 a los 5 y 17 meses de edad en ambas cepas. El análisis de la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, utilizando GAPDH como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DS de, al menos, tres ratones ($p < 0.05$).

7.4 Evaluación de los niveles de ATP en el modelo de EA.

Una vez observada la sobreexpresión del receptor P2X7 en el modelo murino de enfermedad de Alzheimer, se evaluaron los niveles de ATP en dicho modelo, con el objetivo de garantizar la activación del mismo.

Los niveles de ATP extracelular fueron analizados comparando los ratones control (C3) y los ratones con enfermedad de Alzheimer (APP) en diferentes estadios: antes del desarrollo de la patología (3 meses), cuando se está desarrollando (14 meses) y cuando el avance está consolidado totalmente (17 meses). Para ello, se estimularon las retinas como se describió en el apartado 10.3.1.1 de material y métodos.

Tal y como se muestra en la figura 59, los niveles de ATP extracelular en el ratón control en condiciones de “no estimulación” no produjo un cambio significativo durante el intervalo temporal estudiado encontrando un valor medio de 0.71 ± 0.40 pmol/mg retina. Sin embargo, los niveles de ATP extracelular tras la estimulación de las retinas produjeron una liberación del nucleótido de 2.48 ± 0.37 pmol/mg retina (a los 3 meses), 2.89 ± 0.45 pmol/mg retina (a los 14 meses) y, disminuyó drásticamente a los 17 meses de edad 0.37 ± 0.12 pmol/mg retina (figura 59A).

Con respecto a los niveles de ATP extracelular de retinas no estimuladas en los ratones de EA, los valores obtenidos a los 3 meses aumentaron de 0.68 ± 0.24 pmol/mg retina hasta 1.82 ± 0.26 pmol/mg retina a los 14 meses, descendiendo dichos valores a 1.20 ± 0.40 pmol/mg retina a los 17 meses. Cuando las retinas de EA fueron estimuladas, la liberación de ATP a los 3 meses fue de 2.50 ± 0.45 pmol/mg retina, obteniéndose un gran incremento de 5.32 ± 0.33 pmol/mg retina a los 14 meses y, volviendo a valores similares a los basales de 1.56 ± 0.48 pmol/mg retina (n=3) (ver figura 60).

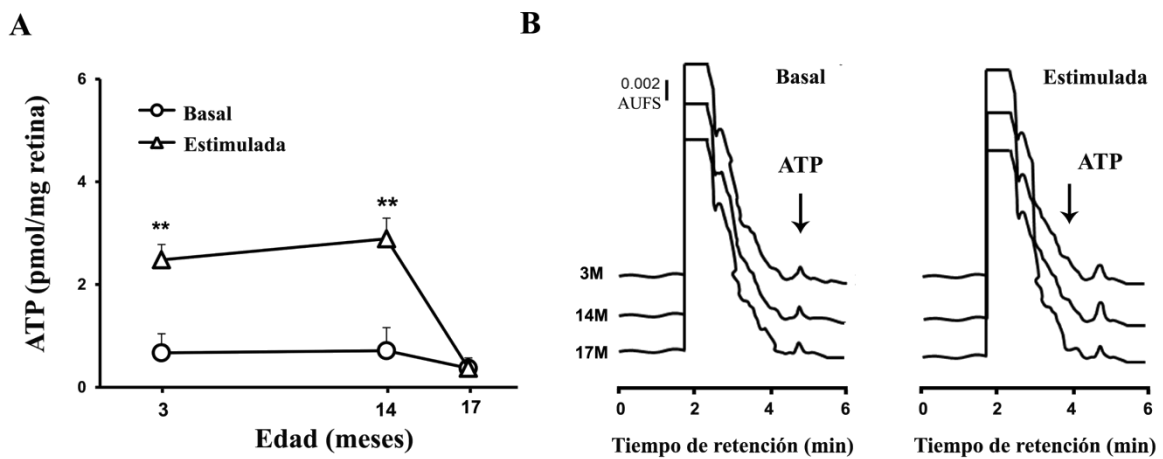


Figura 59. Estudio de la liberación de ATP en ratones control (B6C3F1) en función de la edad. (A) Liberación de ATP en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas control. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS (n=4). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha). (**p < 0.01).

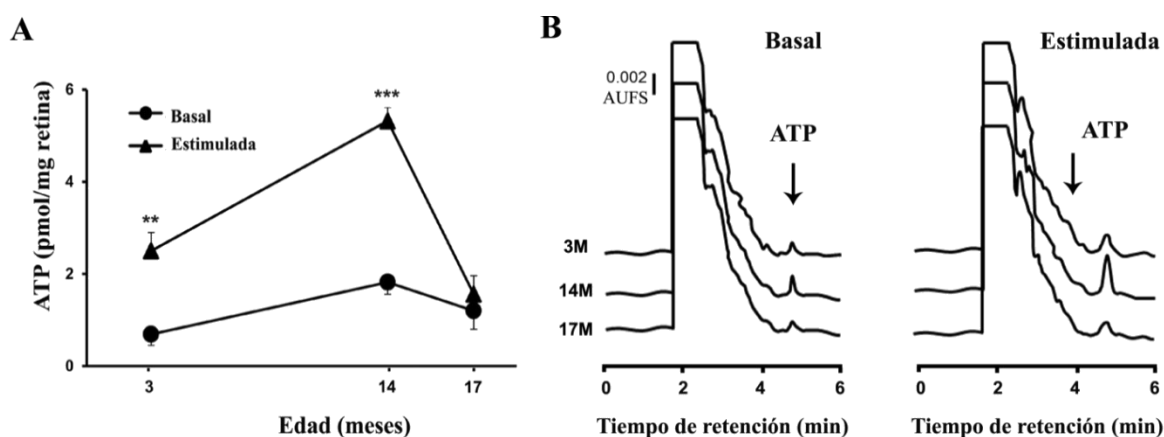


Figura 60. Estudio de la liberación de ATP en ratones de EA (Tg (APP/PSEN)) en función de la edad. (A) Liberación de ATP en condiciones basales (no estimuladas, círculos) y en condiciones de estimulación (con KCl 59 mM, triángulos) detectados en las retinas. Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS (n=4). (B) Cromatogramas representativos obtenidos por HPLC en condiciones basales (izquierda) y estimuladas (derecha) (**p < 0.01; ***p < 0.001).

Se compararon los niveles totales de liberación de ATP tras la estimulación en ratones de EA con respecto a los controles en los estadios establecidos. De modo, que se pudo obtener el incremento producido en la liberación del nucleótido de 1.81 ± 0.14 pmol/mg retina en las retinas de 3 meses hasta valores de 2.18 ± 0.25 pmol/mg retina a los 14 meses en los ratones control, mientras que en los ratones enfermos el cambio osciló de 1.82 ± 0.10 pmol/mg retina a los 3 meses hasta valores de 3.50 ± 0.30 pmol/mg retina a los 14 meses (figura 61).

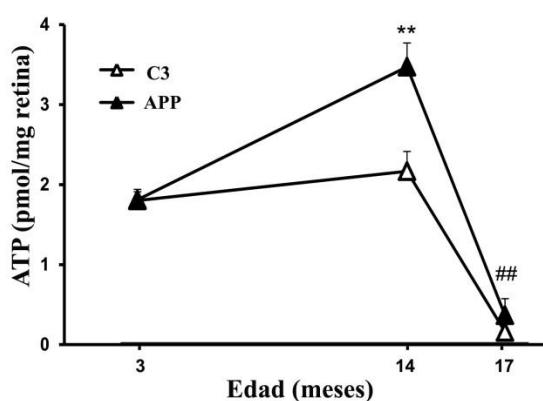


Figura 61. Liberación total de ATP total en las retinas de ratones control (triángulos blancos) y de EA (triángulos negros) a diferentes edades (n= 4 para cada estadio). Los valores mostrados en la gráfica corresponden a la media \pm DS. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia el ratón control y mediante # cuando se comparó el ratón de EA con respecto a los 3 meses (**p < 0.01 y ##p < 0.01).



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El glaucoma es una de las causas más importantes de pérdida de visión irreversible. Debido a que se trata de una neuropatía asintomática, en un periodo de tiempo relativamente largo, el diagnóstico precoz de la misma adquiere una gran relevancia así como el desarrollo de fármacos que frenen su progresión.

Para el estudio de la patología, se han desarrollado diferentes modelos animales de hipertensión ocular (Salinas-Navarro y cols., 2009a; Salinas-Navarro y cols., 2010), lesiones axonales (Peinado-Ramon y cols., 1996; Parrilla-Reverter y cols., 2009a; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Agudo-Barriuso, 2011), ligadura selectiva de vasos oftálmicos (Lafuente y cols., 2002), cauterización de la vena episcleral (Shareef y cols., 1995) y modelos inducidos mediante inyecciones de soluciones hipertónicas de suero salino (Morrison y cols., 1997), de microesferas (Sappington y cols., 2010) o fotocoagulación de vena episcleral y malla trabecular (WoldeMussie y cols., 2001; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Salinas-Navarro y cols., 2010). Además de estos modelos experimentales, existen modelos genéticos (Howell y cols., 2008), como es el caso que nos ocupa durante el trabajo de esta Tesis Doctoral, el modelo de ratón DBA/2J.

Los datos obtenidos durante el desarrollo experimental indican que el modelo animal de glaucoma DBA/2J, simula la progresión de la patología glaucomatosa con el tiempo. En estadios avanzados, aproximadamente a los 15 meses de edad, se aprecia una pérdida selectiva de las CGR acompañada de la correspondiente disminución de la respuesta electrofisiológica. Además de los cambios morfológicos de la degeneración glaucomatosa, en este trabajo se ha pretendido realizar una aproximación a los mecanismos moleculares que conllevan a la pérdida neuronal entre los que se encuentra el sistema purinérgico.

1. GENOTIPADO DEL RATÓN DBA/2J.

El ratón DBA/2J ha sido ampliamente caracterizado como modelo de glaucoma, causado por la mutación de dos genes, *Tyrp1* y *Gpnmb* (John y cols., 1998; Anderson y cols., 2002; Anderson y cols., 2006).

Inicialmente se llevó a cabo el genotipado de los ratones DBA/2J con el objetivo de garantizar el fondo genético de dicho modelo animal. Ha sido ampliamente documentada la distinta manifestación fenotípica de los ratones cuando contenían la mutación de uno de los genes, por lo que se prestó especial interés en determinar que ambas mutaciones estuviesen presentes en los animales. La verificación de éstos permitió estudiar la evolución de un modelo de glaucoma exfoliativo (Bayer y cols., 2001; Porciatti y cols., 2010). Los resultados de PIO, ERG, análisis morfológicos y alteraciones moleculares expuestos a continuación, se deben claramente a la presencia de las dos mutaciones en los ratones DBA/2J.

2. EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN EL MODELO DBA/2J.

Los cambios en los valores de PIO fueron estudiados en todos los ratones glaucomatosos (DBA/2J) en los diferentes estadios establecidos a lo largo del estudio así como también se realizaron en paralelo las medidas en los ratones control (ratones C57BL/6J). Se pudo establecer un estudio comparativo entre la cepa control y con respecto al propio desarrollo de la patología con el tiempo, de modo, que se pudiera evaluar la contribución del deterioro de la función visual originado por el proceso de envejecimiento.

Cabe destacar, las limitaciones técnicas que proporciona el modelo para realizar las medidas fisiológicas de PIO en edades avanzadas de la patología, debido a la presencia de calcificaciones corneales y aumento del grosor de la misma (Inman y cols., 2006).

El glaucoma es una neuropatía óptica, donde la pérdida progresiva de la función visual está frecuentemente asociada con el aumento crónico de la presión intraocular (PIO). Numerosos estudios demuestran que la elevación sostenida de PIO daña el disco óptico de la cabeza del nervio óptico, originando degeneración de las células ganglionares de la retina (CGR) y produciendo ceguera (Quigley y Broman, 2006). El desarrollo de la enfermedad está relacionado con la edad. En humanos la prevalencia de la patología aumenta en una proporción del 0.2 % a los 40-50 años de edad (Dielemans y cols., 1994); este valor puede incrementarse al 10% a los 80 años (Tielsch y cols.,

1991). En el modelo experimental de glaucoma de DBA/2J, se observó un aumento gradual de la PIO aproximadamente desde los 9 meses de edad hasta alcanzar los 12 meses, estadio en el cual se alcanzan valores de PIO 50% superiores de los valores basales de presión. Los resultados son concordantes con estudios reportados por otros grupos, que demuestran valores máximos de presión en este intervalo temporal (Saleh y cols., 2007; Scholz y cols., 2008; Harazny y cols., 2009). Aunque la elevación de la PIO es una característica del modelo, hay una dispersión considerable en estos valores, encontrados cuando fueron analizados en diferentes poblaciones de ratones. La variabilidad en la manifestación fenotípica mostrada durante el desarrollo del glaucoma debe ser considerado en este modelo de glaucoma, incluso debería considerarse la posibilidad de que algunos animales fueran capaces de contrarrestar la elevación de la PIO (John y cols., 1998). La alta dispersión observada en los valores de la PIO podría estar relacionada con diferencias individuales originadas en cámara anterior debido a la deposición aleatoria del pigmento del iris sobre la malla trabecular (originada por las mutaciones descritas en el modelo animal) y, con la posibilidad de que se activen determinados mecanismos compensatorios capaces de activar el drenaje episcleral con el fin de mantener la PIO en valores normales. De esta manera, podría explicarse cierta variabilidad en la evolución de la patología.

Por otro lado, diferentes autores han analizado el papel que desempeña la PIO en el daño originado en las CGR en relación con la degeneración glaucomatosa. Previos estudios (Scholz y cols., 2008; Harazny y cols., 2009) mostraron que no había una relación directa entre PIO y daño retiniano. Esto sugería que el aumento de la PIO podría ser un factor que contribuye a la degeneración celular pero no lo suficientemente condicionante como para inducir la muerte neuronal. En este trabajo, aunque la PIO alcanza un aumento significativo a los 12 meses de edad, este valor decrece a los 15 meses de edad (*figura 2 del capítulo de resultados*). Esta disminución considerable de los valores de presión, podría estar sujeta posiblemente a que en ratones mutantes tan longevos, las células tanto de la malla trabecular como del cuerpo ciliar, estuvieran dañadas. Como consecuencia, originaría una disminución de la producción del flujo de humor acuoso (HA) y un mayor drenaje del mismo. Todos estos resultados sugieren que un aumento en la PIO no es el único factor responsable del daño de las CGR (Atorf y

cols., 2013) y que la enfermedad puede seguir progresando originando ceguera permanente.

3. DISFUNCIÓN VISUAL EN LOS RATONES GLAUCOMATOSOS.

Para poder establecer un rango temporal y analizar los posibles cambios moleculares originados en la degeneración glaucomatosa, se realizó el seguimiento de la actividad eléctrica de la retina del ratón DBA/2J. Para ello, se realizó el registro de la respuesta umbral escotópica (STR), técnica electrofisiológica utilizada para la detección del daño interno de la retina, concretamente de las CGR (Frishman y cols., 1996; Bui y Fortune, 2004).

El seguimiento de la evolución del deterioro de la retina en diferentes neuropatías, *in vivo*, ha suscitado el desarrollo de diferentes técnicas para analizar el estado funcional de la misma. Inicialmente, en este trabajo, se registró la actividad eléctrica global de la retina mediante el μ ERG pudiendo caracterizar funcionalmente los diferentes tipos neuronales, y evaluar la posible pérdida de la función de la retina externa y conexiones sinápticas, fundamentalmente de fotorreceptores y células bipolares (Harazny y cols., 2009; Baltan y cols., 2010), sin detectarse cambios significativos en muchas de las repuestas analizadas. En ratones DBA/2J, han sido detectados importantes cambios en torno a los 24 meses de edad implicando, de esta manera, el deterioro de la retina más externa (Heiduschka y cols., 2010).

También se analizaron las principales células dañadas en el glaucoma, las células ganglionares, mediante la realización de STR, descrito previamente por diferentes autores como test funcional para el estudio de la población de CGR (Frishman y Steinberg, 1989; Frishman y cols., 1996; Saszik y cols., 2002; Bui y Fortune, 2004). Diferentes autores han utilizado técnicas alternativas para examinar la funcionalidad de las CGR incluyendo el pERG en este modelo animal DBA/2J (Porciatti y cols., 2007; Porciatti y cols., 2010).

En este trabajo, se han analizado los cambios funcionales de la retina a lo largo del desarrollo de la patología encontrándose una disminución de la pSTR de aproximadamente un 68% a los 15 meses con respecto a los 3 meses de edad. Es interesante observar que aunque las diferencias de amplitud pSTR no fueron

significativas a los 3 meses de edad, se hicieron bastante pronunciadas entre los 9 y 15 meses de edad. Sin embargo, también se observó una ligera disminución de la amplitud pSTR en el control de ratones C57BL/6J con el envejecimiento. En este sentido, el uso de ratones C57BL/6J como una cepa de control de la patología debería ser reconsiderada. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores sobre diferentes modelos animales glaucomatosos, que también muestran una disminución en las amplitudes de la respuesta ERG (Bui y cols., 2005; Holcombe y cols., 2008; Alarcon-Martinez y cols., 2009; Kong y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Alarcon-Martinez y cols., 2010; Cuenca y cols., 2010).

Este acusado descenso de la respuesta electroretinográfica se correlaciona con la reducción de la población de CGR inducida por un aumento sostenido de la PIO en algunos modelos experimentales de glaucoma (Bui y cols., 2005; Li y cols., 2006; Kong y cols., 2009), pero se hace cada vez más evidente la importancia de los diferentes mecanismos bioquímicos implicados como la apoptosis de las CGR y en alteraciones metabólicas (Schuettauf y cols., 2004).

4. DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES.

Para llevar a cabo la identificación de la población de las CGR afectadas se utilizó un trazador neuronal retrógrado (OHSt) y un marcador específico al tipo neuronal, el factor de transcripción Brn3a (Nadal-Nicolas y cols., 2009) con el objetivo de evaluar si había un transporte retrógrado funcionalmente activo y si la población total de CGR estaba preservada.

La cuantificación de las CGR llevada a cabo en este estudio muestra la gran variabilidad en la pérdida del número de CGR presente en los animales DBA/2J a los 15 meses de edad en comparación con las retinas control C57BL/6J (Jakobs y cols., 2005; Heiduschka y cols., 2010).

La reducción del marcaje retrógrado mediante OHSt o mediante marcaje con Brn3a de CGR en ratones glaucomatosos se observó principalmente en la retina dorsal, y mostraron dos patrones diferentes: (i) un patrón difuso, con una escasa reducción de la distribución celular a través de toda la capa CGR, y (ii) un patrón focal, que se caracteriza por una ausencia casi completa de CGR marcadas distribuidas en sectores

triangulares, con su base localizada en la periferia y su vértice en el disco. Estos resultados están en concordancia con trabajos realizados en el ratón DBA/2J (Jakobs y cols., 2005; Schlamp y cols., 2006; Soto y cols., 2008). En los modelos descritos por otros autores se han encontrado variaciones en la distribución del daño a las CGRs similares a las obtenidas en este trabajo, en diferentes modelos experimentales de glaucoma (Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Salinas-Navarro y cols., 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012) y en modelos hereditarios de hipertensión ocular (Mabuchi y cols., 2004) entre los que se encuentra la subcepa DBA/2NNia (Dantias y cols., 2003; Filippopoulos y cols., 2006).

Además, se observó cómo la afectación neuronal se intensificaba en los ojos derechos de los mutantes con respecto a los ojos izquierdos a los 15 meses de edad.

Los mapas de isodensidad generados a partir de la contabilización celular tanto con OHSt como Brn3a, mostraron la desaparición progresiva de estas células con respecto al animal control revelando la pérdida heterogénea de CGR (Dantias y cols., 2003; Heiduschka y cols., 2010). Este daño sectorial podría ser debido, como se ha mencionado anteriormente, a la obstrucción aleatoria de la malla trabecular por la acumulación del pigmento ocasionado por ISA y IPD. La muerte de CGR en diferentes modelos animales de glaucoma ha sido ampliamente descrita (Filippopoulos y cols., 2006; Howell y cols., 2007; Buckingham y cols., 2008; Alarcon-Martinez y cols., 2009; Alarcon-Martinez y cols., 2010). De la misma manera, la afectación retiniana de la patología en humanos es sectorial, encontrándose una mayor disminución de la población de células ganglionares en el glaucoma exfoliativo (Ritch, 1996; Jeng y cols., 2007).

Por el contrario, los contajes obtenidos de CGR detectadas por marcaje retrógrado y por inmunodetección con Brn3a, correspondientes a los ratones C57BL/6J a los 15 meses de edad, mostraron una distribución normal de la población de CGR. Las diferencias observadas en este estudio en el número de CGR detectadas para ambos marcadores con respecto a estudios previos en retina de ratón de otros autores (Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013a) pueden deberse a diferencias dentro de la misma especie al tratarse de cepas y/o estirpes (ratones Swiss o C57BL/2N) diferentes a la usada en nuestro estudio (C57BL/6J, a

diferencias asociadas al sexo de los animales utilizados o también a la diferencia de edad entre animales en los diferentes estudios. Todos estos factores podrían influir en el menor número de CGR contabilizado en nuestro estudio.

5. ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE NUCLEÓTIDOS.

Dado que se había detectado una disfunción visual de la retina interna del modelo glaucomatoso, resultó de gran interés poder evaluar la neurotransmisión mediada por ATP a través de los receptores P2X. Para ello, se llevó a cabo la determinación de los niveles de dicho nucleótido. Los cambios en los niveles de nucleótidos ATP y Ap₄A se analizaron a medida que progresaba la degeneración glaucomatosa.

Se observó un incremento significativo en los niveles de **ATP** extracelular a medida que avanzaba la patología, obteniendo los valores máximos a los 23 meses en el ratón glaucomatoso. Se observó también un aumento del contenido de ATP total con la edad en dichos ratones y, los respectivos controles, siendo más pronunciado en los patológicos. Estos resultados van en consonancia con trabajos recientes en los que se detectan niveles elevados de ATP en diferentes modelos animales de degeneración glaucomatosa (Lu y cols., 2015), y con los resultados obtenidos por Reigada y cols. (2008) dónde evalúan los niveles de ATP extracelular en la retina cuando simulaban un modelo de glaucoma bajo la aplicación de presión. Esto podría ser debido a un aumento citoplasmático del nucleótido en las células de la retina, que intentaría ser compensado mediante una sobre-expresión del transportador vesicular (VNUT) para reducir el incremento observado a través de la posterior liberación exocitótica de ATP. El aumento en los niveles de ATP, fue descrito también en el modelo de EA (*apartado 7.4 de resultados*) en condiciones basales y de estimulación en los ratones Tg (APP_{swe}/PSEN1_{ΔE9}). A diferencia del modelo glaucomatoso, el incremento de las concentraciones de ATP extracelular alcanzó un máximo en el intervalo temporal en el que la patología estaba establecida totalmente y, disminuyó drásticamente en estadios avanzados de la misma. A pesar de estas diferencias, cuando se analizó la liberación total del nucleótido, se observó un comportamiento similar. En los ratones glaucomatosos, la liberación neta de ATP extracelular aumentó entre los 9 y 15 meses decreciendo a los 23 meses. En los ratones de EA, la liberación neta de ATP aumenta a

los 14 meses para disminuir drásticamente a los 18 meses. En ambos casos, a medida que progresa la enfermedad aumenta la liberación total para, finalmente, alcanzar niveles muy bajos de ATP_e. Esta reducción en la liberación total de ATP_e en estadios muy avanzados podría estar indicando el proceso de muerte o de deterioro celular.

Como se ha mencionado anteriormente, se estudió la expresión del transportador vesicular nucleotídico (VNUT) durante el desarrollo de la patología. La distribución de VNUT en la retina, principalmente en las capas plexiformes, sugiere el importante papel de la liberación del ATP como neurotransmisor (Vessey y Fletcher, 2012). El ATP es co-almacenado con transmisores tales como la acetilcolina (Sugiyama y cols., 2010), noradrenalina (Reigada y cols., 2008), otras monoaminas (Richardson y Brown, 1987) y con glutamato (Poelchen y cols., 2001), en el sistema nervioso central. Si hay una co-transmisión equivalente en la retina sería factible encontrar ATP como un transmisor en las células amacrinas-*starburst* colinérgica (A18 de gran campo y las células amacrinas desplazadas, y otras), amacrinas dopaminérgicas y células interplexiformes, en células bipolares glutamatérgicas y células ganglionares. En nuestro caso, sólo podemos sugerir la presencia del transportador VNUT en la capa nuclear interna y en las células ganglionares. Es evidente, que la descripción precisa de qué células contienen VNUT merece atención, pero esto no es el objetivo del presente trabajo, que básicamente se centra en determinar la presencia del transportador de ATP en las capas plexiformes y en establecer el posible vínculo con los niveles de nucleótidos en sus lugares de liberación.

Analizando la expresión temporal del transportador, se observó un incremento de la proteína a los 15 meses que disminuyó considerablemente a los 23 meses, concomitantemente a la disminución de la liberación total de ATP. Este hallazgo podría estar sugiriendo que la mayoría de este ATP está originado por un proceso de muerte celular y su consecuente liberación al medio extracelular. Por lo que, el ATP liberado en la retina interna podría estar activando diferentes receptores purinérgicos P2 (Sanderson y cols., 2014). Concretamente, entre todos los receptores y, en relación con procesos de muerte celular producidos en estadios avanzados de degeneración, podría estar involucrado el receptor P2X7. De esta manera, podría estar contribuyendo a la activación de cascadas de señalización que promueven mecanismos apoptóticos tal y

como se ha descrito por diferentes autores en células ganglionares (Zhang y cols., 2005; Hu y cols., 2010) y en fotorreceptores cuando se realizaban inyecciones intravítreas con ATP (Puthussery y Fletcher, 2009; Notomi y cols., 2011). Así como, el aumento en ATP extracelular activa receptores P2X7 en modelos de hipoxia o aumento de presión hidrostática inducida en células ganglionares en cultivo (Resta y cols., 2007; Reigada y cols., 2008; Sugiyama y cols., 2010).

Analizando hasta este punto los resultados obtenidos, los cambios en los niveles de ATP y en el transportador vesicular podrían ser responsables, en parte, de las alteraciones electrofisiológicas en las retinas de los ratones glaucomatosos. Desde un punto de vista farmacológico, considerando el vínculo establecido entre elevados niveles de ATP y daño glaucomatoso, podría ser de gran interés eliminar o bloquear el exceso del nucleótido como posible terapia neuroprotectora.

Otro nucleótido objeto de ser estudiado es el **Ap₄A**, por su participación en el glaucoma. Los diadenosin polifosfatos, el Ap₄A en concreto, actúa disminuyendo la PIO. Diferentes estudios farmacológicos sugirieron que este efecto hipotensor estaba mediado vía receptores P2X (Pintor y cols., 2003; Pintor y cols., 2004b; Guzman-Aranguez y cols., 2007) así como vía P2Y₁ facilitando la salida de humor acuoso de la malla trabecular (Soto y cols., 2005). Además, la aplicación de Ap₄A, actúa como un posible agente neuroprotector (Hoyle y Pintor, 2010) contra daños neuronales inducidos por isquemia o 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) a través de la inhibición de la apoptosis (Wang y cols., 2003b). A pesar de que se desconoce el posible papel biológico del Ap₄A sobre la retina, se ha demostrado el efecto terapéutico de los dinucleótidos en procesos patológicos como el desprendimiento de retina (Maminishkis y cols., 2002; Nour y cols., 2003).

Todo esto nos llevó a analizar los posibles cambios en los niveles de este nucleótido tras la estimulación de las retinas glaucomatosas y control. Los niveles de Ap₄A liberados en el ratón DBA/2J disminuyeron drásticamente a medida que avanzaba la patología, obteniendo los valores mínimos a los 23 meses, a diferencia de los valores encontrados para el ratón control, que se mantuvieron en niveles similares. Los niveles decrecientes encontrados en la liberación total del nucleótido posiblemente sean debidos al progresivo daño neuronal y a la activación del sistema de degradación de nucleótidos,

contribuyendo a su vez, a la elevada concentración de ATP extracelular comentada anteriormente.

Una vez analizados los niveles de nucleótidos y la expresión del transportador vesicular, nos resultó de gran interés estudiar la expresión de una de las **enzimas** involucradas en la degradación de nucleótidos, la NPP1, de la familia de las ectofosfodiesterasas para poder vincular posibles resultados de niveles de nucleótidos con la actividad enzimática (Vollmayer y cols., 2003). Se observó como a medida que se desarrollaba la patología los niveles de NPP1 se incrementaban entre los 9 y 15 meses de edad en el ratón DBA/2J. Este incremento de la actividad enzimática podría justificar el aumento de los niveles de ATP a lo largo de este intervalo temporal debido a la progresiva degradación de Ap₄A.

Una vez estudiadas todas las alteraciones producidas en la retina de los ratones patológicos, se determinaron los niveles de los nucleótidos, en el **humor acuoso**. De modo que pudiéramos argumentar si los cambios observados en los niveles de ATP y Ap₄A en la retina iban en consonancia con lo sucedido en polo anterior.

Además, estudios previos demostraron la presencia de niveles incrementados de estos nucleótidos en el humor acuoso y otras estructuras de pacientes glaucomatosos, presentando niveles muy superiores a los encontrados en individuos sanos (Pintor y cols., 2003; Castany y cols., 2011; Li y cols., 2011). Las elevadas concentraciones de Ap₄A en el humor acuoso podrían estar reflejando una liberación de los nucleótidos, quizás como mecanismo homeostático debido a la elevación de PIO (Castany y cols., 2011; Pintor, 2011), pudiendo ser liberados a nivel celular por posibles deformaciones mecánicas de las estructuras o del propio daño tisular originado. Los resultados obtenidos fueron en concordancia con lo anteriormente descrito, se observó un aumento de los niveles de ambos nucleótidos durante el desarrollo de la patología en los ratones DBA/2J y, en comparación con los ratones control.

6. EL RECEPTOR P2X7 EN LA PATOGÉNESIS DEL GLAUCOMA.

El receptor P2X7 ha sido vinculado a procesos patológicos como un posible candidato implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Diaz-Hernandez y cols., 2009; Diaz-Hernandez y cols., 2012; Jimenez-Pacheco y cols., 2013). Las alteraciones en los niveles de ATP extracelular y, la consecuente activación del receptor P2X7 pueden contribuir a la muerte de las células ganglionares de la retina y la pérdida de función de las mismas (Resta y cols., 2005; Reigada y cols., 2008; Puthussery y Fletcher, 2009; Hu y cols., 2010; Sugiyama y cols., 2010; Niyadurupola y cols., 2013). Por otra parte, los estudios previos realizados *in vitro* han demostrado la implicación del ATP en la apoptosis neuronal inducida a través del receptor P2X7. De hecho, la estimulación del receptor P2X7 mediante BzATP induce la apoptosis en las células ganglionares cultivadas de rata (Zhang y cols., 2005) así como, se ha determinado la muerte celular inducida/mediada por P2X7 en modelos de hipoxia (Reigada y cols., 2008; Mitchell y cols., 2009; Sugiyama y cols., 2010).

Sobre-expresión de los receptores P2X7 en el modelo glaucomatoso

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se observó un incremento significativo en la expresión del receptor P2X7 en ratones glaucomatosos a los 15 meses. El aumento de los niveles del receptor P2X7, fue más notable en la retina interna (IPL y CGL). Además, se analizó el patrón de marcaje del receptor P2X7 en la capa de CGR en los diferentes estadios estudiados. Se observó cómo el aumento de la expresión de este receptor era variable. Se encontraron CG con fuerte inmunorreactividad para P2X7, sin embargo, no fue homogénea a lo largo de la capa de CGR. Cabía esperar que, tal y como se había descrito anteriormente, dicha expresión no fuera uniforme de acuerdo con la muerte sectorial encontrada en estas células tal y como se había observado en estudios preliminares en este modelo glaucomatoso (Fernandez-Sanchez y cols., 2014). Este hallazgo se correlacionó con diversas alteraciones morfológicas y cambios moleculares observados en las retinas de los ratones DBA/2J.

Se observó una activación de la respuesta astrocitaria (**GFAP**) a medida que se desarrollaba la patología mostrando co-localización con P2X7 en astrocitos, tal y como describieron en la retina de ratón Vessey and Fletcher (2012). Esta presencia de P2X7 sugería la posible implicación de este receptor en la regulación de la actividad de la

microglia (Monif y cols., 2010). La presencia del receptor P2X7 activado puede estar involucrada con las respuestas inflamatorias en la retina interna como se describe en estudios *in vitro* (Panenka y cols., 2001). Se observa como a los 15 meses en los ratones glaucomatosos hay un ligero marcaje frente a sinaptofisina en la CPI pudiendo sugerir la existencia de procesos de plasticidad sináptica. Además, se observó un aumento de la expresión del receptor P2X7 en la CPE acompañado por una disminución de la **conexión sináptica**. Este resultado está de acuerdo con un trabajo reciente (Fernandez-Sanchez y cols., 2014), donde se describen los contactos sinápticos de la CPE en este modelo. Esto podría sugerir la implicación del receptor P2X7 en la señalización de la vía de los fotorreceptores y otros mecanismos indirectos que podrían contribuir a la degeneración de las CGR mediada por este receptor (Puthussery y cols., 2006; Vessey y Fletcher, 2012).

Por otro lado, se observó una degeneración axonal variable. Se detectó una pérdida de la trayectoria de los neurofilamentos y desempaquetamiento de las fibras axonales. Estos signos de degeneración son similares a los observados en otros modelos experimentales de glaucoma tales como la lesión producida por axotomía (Parrilla-Reverter y cols., 2009a). Se detectó co-localización con el receptor P2X7, en el soma de las CGR, mostrando una marcada inmunorreactividad para ambos marcadores así como se detectó un aumento en la expresión de RT-97 en las dendritas de las CGR. Esto podría estar indicando una posible reorganización de los **neurofilamentos** de las células dañadas, células que presentan una fuerte inmunorreactividad para P2X7, como un posible intento de regeneración del citoesqueleto.

7. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR P2X7 EN EL GLAUCOMA.

Señalización del receptor P2X7 acoplada a proteínas MAP quinasas en la degeneración glaucomatosa

El receptor P2X7 se ha asociado con múltiples cascadas de señalización, entre ellas la activación de la fosfolipasa D, liberación de citoquinas, reordenamientos del citoesqueleto y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Skaper y cols., 2010). Varios estudios proporcionan datos que muestran que la activación del receptor P2X7 conduce a la activación de p38 (Ono y Han, 2000; Armstrong y cols., 2002; Donnelly-Roberts y cols., 2004) y JNK (Suzuki y cols., 2004). Por otra parte, las vías de

señalización intracelular que conducen a procesos de muerte celular en el glaucoma involucran, entre otras, la activación de las vías de JNK y p38 intracelulares (Kikuchi y cols., 2000; Levkovitch-Verbin y cols., 2005; Munemasa y cols., 2005; Munemasa y cols., 2006; Bessero y cols., 2010; Donovan y cols., 2011). Estudios realizados en retinas glaucomatosas humanas también mostraron la activación de estas rutas (Tezel y cols., 2003). Además está bien documentado, el uso de inhibidores específicos de JNK y p38 como diana terapéutica protegiendo a las neuronas de la retina por excitotoxicidad inducida por NMDA (Munemasa y cols., 2005).

En el presente trabajo de investigación, se han detectado alteraciones en la expresión de varias proteínas relacionadas con la muerte de células ganglionares de la retina de ratones DBA/2J. En primer lugar, nuestros datos muestran una activación de miembros de la familia la MAPK (JNK y p38), en retinas lesionadas en comparación con los ratones control a los 15 meses de edad. Los resultados obtenidos a partir del análisis de Western Blot mostraron un perfil diferente de expresión de las mismas, lo que llevó a pensar que posiblemente ambas proteínas JNK y p38, se activen en momentos diferentes de la degeneración glaucomatosa, inducidas por cambios en el receptor P2X7. Nuestros resultados mostraron que la activación de estas vías de señalización podría estar contribuyendo como mediadoras de proteínas efectoras del proceso apoptótico de las CGR inducida por activación del receptor P2X7.

Activación de la caspasa-3 en el glaucoma

La apoptosis inducida por la activación del receptor P2X7, compromete la liberación de ATP a partir de células excitadas o dañadas como consecuencia del deterioro ocular. Los niveles de ATP extracelular podrían estar vinculados en la activación del receptor P2X7 en la patología glaucomatosa (Resta y cols., 2007; Reigada y cols., 2008) tal y como describieron Zhang y cols. (2005) en CGR de rata aisladas, en las que la estimulación del receptor inducía la apoptosis de las mismas por activación de las caspasas originada tras el incremento de las concentraciones intracelulares de calcio. Se confirmó la presencia de este elevado nivel de nucleótido en el modelo del ratón DBA/2J (*apartado 3.1 de resultados*), que junto con el aumento de la expresión del receptor P2X7 descrito en este trabajo, sugiere que su activación puede desencadenar las cascadas intracelulares subyacentes propuestas. En este sentido,

muchos estudios han demostrado que la activación de las cascadas de caspasas en las células neuronales desempeña un papel importante en la muerte celular programada de las células ganglionares de la retina (Morrison y cols., 1997; Sawada y Neufeld, 1999; Kim y Park, 2005; Zhang y cols., 2005; Reichstein y cols., 2007; Sugiyama y cols., 2013). La muerte celular mediada por las caspasas se regula en parte por vías intracelulares mediadas por las MAP quinasas. Se ha descrito como la proteína JNK está involucrada en la señalización de lesión axonal y de la apoptosis (Donovan y cols., 2011; Fernandes y cols., 2012; Harder y cols., 2012). Así como se ha detectado sobreexpresión de diferentes proteínas en un modelo de transección del nervio óptico mediante la regulación de las vías de apoptosis (Agudo y cols., 2009). Del mismo modo, la activación de MAPK p38 se ha descrito como un mediador de la activación de las caspasas en el desarrollo de lesiones RGC en diferentes modelos experimentales de glaucoma, incluyendo la axotomía del nervio óptico, la hipertensión ocular, y la degeneración inducida por excitotoxicidad (Kikuchi y cols., 2000; Manabe y Lipton, 2003; Harada y cols., 2006; Levkovitch-Verbin y cols., 2007; El-Remessy y cols., 2008). Además, trabajos recientes describen la inhibición de p38 como una posible diana terapéutica en la microcirugía filtrante del glaucoma en conejos (Nassar y cols., 2015) y en los modelos de disfunción axonales (Dapper y cols., 2013). La distribución de estas proteínas de estrés en la retina del ratón incluye CNI y CGR y se han detectado aumento en sus niveles de expresión mediante el análisis proteómico en modelos de neurotoxicidad retiniana (Munemasa y cols., 2005; Bessero y cols., 2010), en daño glaucomatoso (Dapper y cols., 2013) y en procesos isquémicos de la retina (Roth y cols., 2003).

Todos estos trabajos son consistentes con resultados actuales donde se describe la posible conexión entre las proteínas de estrés activado (p38, JNK) y caspasas (Chen y Kadlubar, 2003; Dapper y cols., 2013).

Durante del desarrollo experimental de esta Tesis, se observó que la expresión de estas proteínas era significativamente mayor durante el desarrollo de la patología en los ratones DBA/2J, así como la muerte de las CGR. Se observó también la activación de la caspasa-3 durante el progreso de la degeneración glaucomatosa. Además se analizaron los niveles de la proteína y la actividad de la caspasa-3 en la retina de los

ratones control y con glaucoma. En este sentido, se pudo correlacionar el aumento significativo en la actividad de la caspasa-3 a los 15 meses con el aumento del nivel observado del fragmento p20 activo de la caspasa-3. Estos resultados, sugerían la posible participación del receptor P2X7 mediada por ATP en la activación de la caspasa-3 a través de vías de señalización de MAP quinasas (JNK y p38).

Todo el estudio molecular se realizó en la retina de un modelo animal, sin poder discriminar las diferentes capas de la retina. Por lo que fue de gran utilidad el estudio inmunohistoquímico para poder localizar los cambios cuantitativos observados en las retinas glaucomatosas.

Todas estas observaciones en el modelo animal, nos llevaron a plantear si la activación específica del receptor desencadenaría la activación de la ruta propuesta. Para poder establecer el posible mecanismo de señalización intracelular acoplado al receptor P2X7, se decidió utilizar una línea inmortalizada de células progenitoras de retina, la línea R28 E1A-NR.3. De este modo, se pudo demostrar el acoplamiento del receptor P2X7 a la activación de la caspasa-3, a través de la vía de señalización de las MAP quinasas.

Inicialmente, se comprobó que en dicha línea celular estuviera presente el receptor P2X7, para ello, se chequeó su presencia mediante ensayos de inmunotransferencia. A continuación, era necesario comprobar la funcionalidad del mismo, por lo que se realizó su caracterización farmacológica, probando que el receptor sobre el que estaba actuando el agonista nucleotídico BzATP en las células R28 era el receptor P2X7. A este respecto, hay que señalar que dicha línea celular co-expresa varios tipos de receptores P2X, pudiendo contribuir a las respuestas inducidas por BzATP, por lo que para potenciar las acciones del agonista sobre el receptor P2X7, los experimentos se hicieron en medio en el que la concentración de Mg^{2+} estuvieran dentro del rango descrito por Virginio y cols. (1997), ya que el P2X7 es particularmente sensible a la inhibición por dicho catión.

A continuación, se demostró que la aplicación del BzATP, desencadenaba una activación de la caspasa-3 y, la consecuente muerte celular, que se veía revertida significativamente cuando se bloqueaba el receptor con antagonistas específicos (BBG,

A438079) (Jiang y cols., 2000; Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007). Además, el BzATP fue capaz de inducir aumentos en la fosforilación de p38 y JNK, suprimidos en su totalidad cuando las células se exponían a los antagonistas previamente mencionados. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que las respuestas sean el resultado de la activación exclusiva del receptor P2X7, puesto que se ha descrito la formación de heterómeros en diferentes líneas celulares (Nicke y cols., 2005; Guo y cols., 2007a; Lalo y cols., 2008) que muestran características farmacológicas mixtas. Por lo tanto, es importante señalar que en el modelo animal, el ATP no ejerce una activación “selectiva” con respecto al receptor P2X7, puesto que dicho nucleótido desencadena diferentes respuestas en función del tipo de receptor presente. La respuesta global fisiológica producida viene determinada por una compleja participación de nucleótidos, receptores y enzimas de degradación que componen la señalización purinérgica.

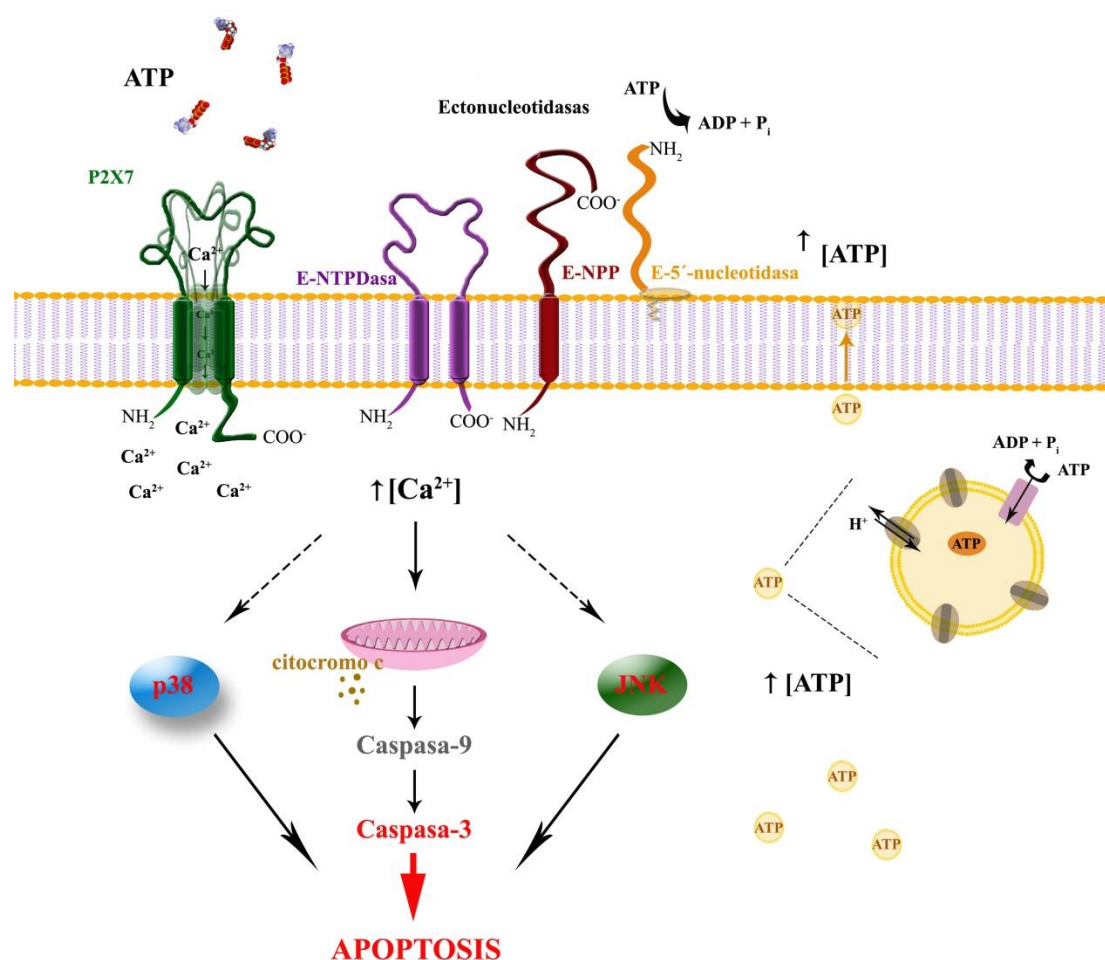


Figura 1. Esquema representativo de la señalización mediada por ATP hacia la caspasa-3. La activación del receptor P2X7 induce la fosforilación de las rutas de las MAP quinasas (p38 y JNK) y la consecuente muerte celular mediante la activación de la caspasa-3.

Antagonismo del receptor P2X7 como diana terapéutica

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el antagonismo del receptor P2X7, podría ser una alternativa terapéutica para prevenir la muerte de células ganglionares en la patogénesis del glaucoma. Estudios recientes, sugieren un papel neuroprotector vía antagonismo del receptor P2X7 (Di Virgilio y cols., 2001; Franke y cols., 2004; Jun y cols., 2007; Diaz-Hernandez y cols., 2009; Chen y cols., 2013). La administración *in vivo* de un antagonista del receptor P2X7, demostró la reducción de las placas amiloides en el modelo de la enfermedad de Alzheimer a través de la GSK-3 (Diaz-Hernandez y cols., 2012) así como la prevención de la apoptosis neuronal y daño cerebral inducido en la enfermedad de Huntington y epilepsia (Diaz-Hernandez y cols., 2009; Jimenez-Pacheco y cols., 2013). Además, un estudio reciente ha demostrado el efecto neuroprotector del antagonismo en daño cerebral traumático (Wang y cols., 2015). Han sido descritos hallazgos similares en modelos de degeneración glaucomatosa o de hipertensión ocular, encontrando que la activación del receptor P2X7 está implicado en el proceso de muerte neuronal en modelos murinos y en cultivos de retina primarias (Zhang y cols., 2005; Hu y cols., 2010; Sugiyama y cols., 2010; Niyadurupola y cols., 2013; Sugiyama y cols., 2013). También se demostró que el antagonismo del receptor revirtió significativamente la pérdida neuronal.

En el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio electrofisiológico de la retina antes y después del tratamiento con BBG en los ratones glaucomatosos. Este primer estudio del efecto de la aplicación terapéutica del antagonista selectivo del receptor P2X7, no modificó la respuesta eléctrica de las CGR cuando se comparaban con los ratones no tratados. Así como tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a los ratones tratados antes y después de comenzar el tratamiento. Sin embargo, cuando se analizaron las rutas involucradas en la activación de la caspasa-3, JNK y P38, se observó una disminución de la expresión de las mismas.

Todos estos resultados podrían estar indicando que el tratamiento estaba resultando ser efectivo a nivel molecular, el antagonismo del receptor P2X7 estaría produciendo una disminución de la activación de la fosforilación de las rutas de señalización implicadas y, la consecuente disminución de la degeneración neuronal. Sin

embargo, no sería suficientemente efectivo en las condiciones establecidas como para desencadenar una mejoría de la disfunción visual o un retraso en el deterioro de la misma. Pudiendo estar relacionado, o bien con la elección temporal del comienzo del tratamiento o bien con la dosis administrada y frecuencia.

Además sería interesante considerar, el uso de inhibidores específicos de las moléculas implicadas en los mecanismos moleculares (p38 y JNK) que subyacen la degeneración glaucomatosa.

8. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA DEGENERACIÓN GLAUCOMATOSA Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Uno de los factores que contribuyen a la fisiopatología de un gran número de enfermedades neurodegenerativas es el plegamiento anómalo de las proteínas. Una de las más características es la amiloidosis, originada por la formación irreversible de agregados fibrilares insolubles llamados amiloides. Entre las enfermedades neurodegenerativas que la presentan se encuentran la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Creutzfeldt-Jacob, entre otras.

Con el objetivo de establecer la posible existencia de analogías entre la patología glaucomatosa y la enfermedad de Alzheimer (EA) se realizaron estudios comparativos análogos a los realizados en el modelo glaucomatoso.

Se evaluó la **respuesta electrofisiológica** de las retinas del modelo de EA, de modo que, se pudiera determinar la existencia de una posible disfunción de la respuesta eléctrica en algún tipo neuronal de la retina. Se identificó una significativa pérdida funcional de las CGR, de modo que, se quiso evaluar si se había producido la muerte celular de las mismas.

Se pudo observar como el **número de CGR** estaba preservado en las retinas del modelo animal de EA cuando se comparaba con el control y, cuando se analizaba con respecto a la progresión de la patología, por lo que la disfunción visual no iba acompañada de un proceso de muerte celular en los estadios analizados. Estos hallazgos, sugerían una activación de respuestas intracelulares que ocasionaban un deficiente funcionamiento del proceso de transmisión de la información visual de las

CGR sin, implicar necesariamente, la muerte celular de las mismas en el estadio analizado.

Por tanto, se analizaron los niveles de la proteína precursora amiloide (**APP**) en los ratones de EA. Se encontró un incremento en los niveles de esta proteína, característica inherente a esta enfermedad neurodegenerativa en los ratones de EA a los 17 meses de edad. Se encontraron niveles ligeramente elevados de la proteína APP, en los ratones control C3B6F1, posiblemente debido a una acumulación “fisiológica” vinculada al propio envejecimiento. De la misma manera, se evaluaron los niveles de dicha proteína en los ratones glaucomatosos, encontrando un aumento en la expresión de la misma, de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio histológico en diferentes trabajos (McKinnon y cols., 2002; Goldblum y cols., 2007; Guo y cols., 2007b) y en la caracterización de las retinas mediante estudios de inmunofluorescencia a plano. Además, una posible justificación de la detección de estos agregados en las retinas del ratón DBA/2J, podría ser debido a alteraciones descritas en el nervio óptico originadas por estrés del retículo endoplasmático (Ojino y cols., 2015). El plegamiento anómalo de esta proteína β -amiloide podría estar originado por el desarrollo de condiciones de estrés de este orgánulo responsable de la síntesis, modificación y transporte de proteínas.

Estos resultados sugieren una nueva hipótesis acerca de los mecanismos moleculares implicados en la muerte de las CGR, implicando a la neurotoxicidad originada por los depósitos de β -amiloide (McKinnon y cols., 2002). Así como, una posible correlación entre los mecanismos intracelulares involucrados en ambas patologías, pudiendo contribuir las alteraciones en el metabolismo de la APP en la muerte de las RGC en el glaucoma. Esta acumulación proteica podría ser consecuencia de diferentes factores como el aumento de PIO, procesos isquémicos o traumas, entre otros, originados en el transcurso de esta neuropatía óptica.

Por otra parte, se encontró un incremento en los niveles del receptor **P2X7** en el modelo de EA a los 17 meses, indicando una posible implicación de la proteína en dicha patología, tal y como se había detectado en el modelo glaucomatoso. Estos resultados van en concordancia con estudios realizados en cerebro en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer en el que se observó un aumento de la expresión de dicho

receptor y su posible implicación en el proceso de neurodegeneración (Parvathenani y cols., 2003). Además estudios realizados *in vivo* demostraron como la inhibición del receptor P2X7 disminuía significativamente el número de placas de la proteína β -amiloide en ratones transgénicos para APP humana (Diaz-Hernandez y cols., 2012).

Cuando se analizaron los niveles de liberación total de **ATP extracelular** en este modelo, se observó cómo la concentración aumentaba a los 14 meses y disminuía significativamente a medida que se desarrollaba la patología, probablemente originado por un mal funcionamiento de la maquinaria intracelular y el consecuente deterioro celular.

Todos estos resultados y la gran incidencia del glaucoma y otras neuropatías entre pacientes con enfermedad de Alzheimer, sugieren la posible relación entre estas dos patologías (Bayer y cols., 2002a). Cabe mencionar la presencia del péptido β -amiloide en el humor acuoso de pacientes con glaucoma lo que implicaría una etiología similar con respecto a la enfermedad de Alzheimer (Janciauskiene y Krakau, 2001), así como en humor vítreo de pacientes con diferentes retinopatías (Yoneda y cols., 2005).

No obstante, sería interesante señalar la posible detección de una enfermedad neurodegenerativa emergente, a través de un estudio visual, o bien, la prevención de una afectación retiniana como consecuencia de una patología ya diagnosticada.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El seguimiento electroretinográfico de la retina de los ratones DBA/2J muestra un **déficit progresivo de la función visual** desde los 9 meses de edad cuyo origen es probablemente debido a la pérdida de población de CGR, y esto transcurre en paralelo con una elevación anormal de la PIO. Por lo tanto, las medidas de PIO y los registros electroretinográficos proporcionan un método diagnóstico eficaz no invasivo para la evaluación de la población CGR "*in vivo*" durante la progresión de la patología con el objetivo de establecer el momento ideal para comenzar un posible tratamiento para el glaucoma.
2. Mediante estudios morfométricos de retinas "a plano" se ha caracterizado el patrón de muerte de las CGR. Además se ha contabilizado el número de CGR en los ratones glaucomatosos con respecto a la cepa control. Los mapas de isodensidad demuestran la gran variabilidad de la **pérdida neuronal de las CGR** presente en la degeneración retiniana. Así como, la heterogeneidad y asimetría entre animales como entre ambas retinas del mismo ejemplar DBA/2J.
3. El estudio morfológico y cuantitativo de la retina del ratón glaucomatoso revela diferentes **alteraciones morfológicas**. Estos hallazgos indican que eventos como la pérdida de conectividad sináptica, la gliosis reactiva, el deterioro axonal y la pérdida del marcador específico de las CGR podrían estar involucrados en la patogénesis de glaucoma originando la disfunción visual.
4. El análisis de la retina del ratón glaucomatoso muestra **alteraciones** de diferentes componentes involucrados en el sistema purinérgico (**P2X7, VNUT, NPP1**) así como de los niveles de nucleótidos **ATP** y **Ap₄A**. Se han observado incrementos en la expresión del receptor, del transportador y de la ecto-nucleotidasa, así como de la liberación de ATP extracelular a los 15 meses de edad en los ratones glaucomatosos, a diferencia de lo encontrado para los niveles de Ap₄A.
5. Se han detectado **alteraciones** en diferentes componentes de **señalización intracelular** involucrados en procesos de apoptosis en el modelo de ratón DBA/2J. Este estudio proporciona una evidencia de las alteraciones moleculares de la retina, involucradas en el daño glaucomatoso. Las rutas de señalización de **MAPK** podrían

estar involucradas en la activación mediada por P2X7. Se han encontrado niveles de proteínas alterados (p38 y JNK) pudiendo estar relacionado con el deterioro de la retina interna mediante cascadas apoptóticas.

6. Se ha demostrado que la **pérdida neuronal** originada en este modelo de glaucoma se produce **mediante una activación de la caspasa-3**, desencadenando un proceso de muerte celular por apoptosis.

7. La **línea celular R28 E1A-NR.3** resulta de gran utilidad para estudiar los mecanismos de señalización intracelular en distintos procesos celulares y moleculares, entre ellos la muerte celular programada. Se ha comprobado el aumento en la fosforilación de las proteínas p38 y JNK, vía activación del receptor P2X7 mediante el agonista BzATP y, la consecuente activación de la caspasa-3 desencadenando un proceso apoptótico. Se ha observado cómo es revertida la activación de las MAPK mediante el antagonismo del receptor P2X7 por BBG.

8. Tras la demostración del efecto neuroprotector del **BBG *in vitro***, el **tratamiento *in vivo* en los ratones glaucomatosos**, no revierte el déficit funcional de las CGR en las condiciones establecidas. Sin embargo, se reducen significativamente los niveles de expresión de las proteínas correspondientes a las rutas de señalización intracelular involucradas que desencadenan procesos apoptóticos. Todo esto podría indicar que un reajuste en la dosis y frecuencia de la administración podría representar una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de la degeneración glaucomatosa.

9. Finalmente, en el estudio comparativo entre el modelo de degeneración glaucomatosa y el **modelo** de ratón de **enfermedad de Alzheimer**, se encuentran ciertas similitudes. Se ha detectado una disfunción visual de la retina así como un aumento de los niveles de proteína β -amiloide y P2X7 en ambos modelos patológicos. Dicho paralelismo podría apuntar a posibles dianas terapéuticas orientadas al tratamiento del glaucoma como una enfermedad neurodegenerativa como tal y, poder evolucionar hacia tratamientos más efectivos. De esta manera, se podrían establecer nuevas alternativas farmacológicas.

10. En resumen, la progresión de los cambios oculares en el modelo animal del ratón DBA/2J, puede ser bien caracterizada en edades avanzadas, momento en el que todas

las manifestaciones fenotípicas originadas por las mutaciones están completamente desarrolladas. La selección de los ratones y del estadio adecuado para el estudio de la enfermedad, permitiría agrupar poblaciones en función del avance del deterioro retiniano, para poder evaluar los posibles mecanismos patológicos que desencadenen la muerte celular reduciendo, de esta manera, las diferencias inter-animal que se producen durante la progresión de la patología.

A pesar de todas las limitaciones terapéuticas que presenta el modelo de ratón DBA/2J, debe tenerse en cuenta la similitud de las alteraciones oculares que tienen lugar en pacientes glaucomatosos y la “dispersión real” de la sintomatología. El modelo de ratón DBA/2J, simula muchas de las características descritas en el glaucoma, tales como aumento de PIO, degeneración de CGR, excavación del nervio óptico y vulnerabilidad metabólica debido a daño oxidativo, entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio M. P., Burnstock G., Boeynaems J. M., Barnard E. A., Boyer J. L., Kennedy C., Knight G. E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K. A., Weisman G. A. (2006) "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy". *Pharmacol Rev* 58(3):281-341.
- Abbracchio M. P., Burnstock G., Verkhratsky A., Zimmermann H. (2009) "Purinergic signalling in the nervous system: an overview". *Trends Neurosci* 32(1):19-29.
- Acuna-Castillo C., Morales B., Huidobro-Toro J. P. (2000) "Zinc and copper modulate differentially the P2X4 receptor". *J Neurochem* 74(4):1529-1537.
- Adinolfi E., Kim M., Young M. T., Di Virgilio F., Surprenant A. (2003) "Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors". *J Biol Chem* 278(39):37344-37351.
- Aga M., Johnson C. J., Hart A. P., Guadarrama A. G., Suresh M., Svaren J., Bertics P. J., Darien B. J. (2002) "Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7)". *J Leukoc Biol* 72(1):222-232.
- Aga M., Watters J. J., Pfeiffer Z. A., Wiesz G. J., Sommer J. A., Bertics P. J. (2004) "Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages". *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4):C923-930.
- Agapova O. A., Ricard C. S., Salvador-Silva M., Hernandez M. R. (2001) "Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes". *Glia* 33(3):205-216.
- Agarwal R., Gupta S. K., Agarwal P., Saxena R., Agrawal S. S. (2009) "Current concepts in the pathophysiology of glaucoma". *Indian J Ophthalmol* 57(4):257-266.
- Agudo-Barriuso M., Nadal-Nicolás, F. M., Parrilla-Reverter, G., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., (2011) "Anatomical and molecular responses triggered in the retina by axonal injury.". *The mystery of glaucoma* 6.4(99)-114.
- Agudo M., Perez-Marin M. C., Lonngren U., Sobrado P., Conesa A., Canovas I., Salinas-Navarro M., Miralles-Imperial J., Hallbook F., Vidal-Sanz M. (2008) "Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush". *Mol Vis* 14(1050-1063).
- Agudo M., Perez-Marin M. C., Sobrado-Calvo P., Lonngren U., Salinas-Navarro M., Canovas I., Nadal-Nicolas F. M., Miralles-Imperial J., Hallbook F., Vidal-Sanz M. (2009) "Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(1):424-431.
- Aihara M., Lindsey J. D., Weinreb R. N. (2003) "Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure". *Exp Eye Res* 77(6):681-686.
- Alarcon-Martinez L., Aviles-Trigueros M., Galindo-Romero C., Valiente-Soriano J., Agudo-Barriuso M., Villa Pde L., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2010) "ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection". *Vision Res* 50(21):2176-2187.
- Alarcon-Martinez L., de la Villa P., Aviles-Trigueros M., Blanco R., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2009) "Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats". *Mol Vis* 15(2373-2383).
- Almasieh M., Wilson A. M., Morquette B., Cueva Vargas J. L., Di Polo A. (2012) "The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma". *Prog Retin Eye Res* 31(2):152-181.
- Anderson M. G., Libby R. T., Mao M., Cosma I. M., Wilson L. A., Smith R. S., John S. W. (2006) "Genetic context determines susceptibility to intraocular pressure elevation in a mouse pigmentary glaucoma". *BMC Biol* 4(20).
- Anderson M. G., Smith R. S., Hawes N. L., Zabaleta A., Chang B., Wiggs J. L., John S. W. (2002) "Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice". *Nat Genet* 30(1):81-85.
- Archer S., Hirano J., Diss J. K., Fraser S. P., Djamgoz M. B. (1998) "Expression and localization in the fish retina of a homologue of the Alzheimer's related PS1 gene". *Neuroreport* 9(9):2049-2056.
- Armstrong J. N., Brust T. B., Lewis R. G., MacVicar B. A. (2002) "Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission

- through p38 mitogen-activated protein kinase". *J Neurosci* 22(14):5938-5945.
- Aschrafi A., Sadtler S., Niculescu C., Rettinger J., Schmalzing G. (2004) "Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes". *J Mol Biol* 342(1):333-343.
- Atorf J., Scholz M., Garreis F., Lehmann J., Brauer L., Kremers J. (2013) "Functional protective effects of long-term memantine treatment in the DBA/2J mouse". *Doc Ophthalmol* 126(3):221-232.
- Attems J., Jellinger K. A. (2006) "Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment". *Clin Neuropathol* 25(6):265-271.
- Bahima L., Aleu J., Elias M., Martin-Satue M., Muhaisen A., Blasi J., Marsal J., Solsona C. (2006) "Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes". *J Cell Physiol* 206(1):95-102.
- Balkema G. W., Drager U. C. (1990) "Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice". *Vis Neurosci* 4(6):595-604.
- Baltan S., Inman D. M., Danilov C. A., Morrison R. S., Calkins D. J., Horner P. J. (2010) "Metabolic vulnerability disposes retinal ganglion cell axons to dysfunction in a model of glaucomatous degeneration". *J Neurosci* 30(16):5644-5652.
- Barajas-Lopez C., Montano L. M., Espinosa-Luna R. (2002) "Inhibitory interactions between 5-HT₃ and P2X channels in submucosal neurons". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(6):G1238-1248.
- Barbe M. T., Monyer H., Bruzzone R. (2006) "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels". *Physiology (Bethesda)* 21(103-114).
- Barinaga M. (1993) "Death gives birth to the nervous system. But how?". *Science* 259(5096):762-763.
- Barnstable C. J., Drager U. C. (1984) "Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina". *Neuroscience* 11(4):847-855.
- Barrera N. P., Henderson R. M., Murrell-Lagnado R. D., Edwardson J. M. (2007) "The stoichiometry of P2X₂/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels". *Biophys J* 93(2):505-512.
- Barrera N. P., Ormond S. J., Henderson R. M., Murrell-Lagnado R. D., Edwardson J. M. (2005) "Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X₂ receptors are trimers but that P2X₆ receptor subunits do not oligomerize". *J Biol Chem* 280(11):10759-10765.
- Bayer A. U., Ferrari F., Erb C. (2002a) "High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease". *Eur Neurol* 47(3):165-168.
- Bayer A. U., Keller O. N., Ferrari F., Maag K. P. (2002b) "Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease". *Am J Ophthalmol* 133(1):135-137.
- Bayer A. U., Neuhardt T., May A. C., Martus P., Maag K. P., Brodie S., Lutjen-Drecoll E., Podos S. M., Mittag T. (2001) "Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6):1258-1265.
- Becker D., Woltersdorf R., Boldt W., Schmitz S., Braam U., Schmalzing G., Markwardt F. (2008) "The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity". *J Biol Chem* 283(37):25725-25734.
- Bennet D. W., Drury A. N. (1931) "Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds". *J Physiol* 72(3):288-320.
- Bernstein S. L., Koo J. H., Slater B. J., Guo Y., Margolis F. L. (2006) "Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression". *Mol Vis* 12(147-155).
- Berson D. M. (2003) "Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors". *Trends Neurosci* 26(6):314-320.
- Berson D. M., Castrucci A. M., Provencio I. (2010) "Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice". *J Comp Neurol* 518(13):2405-2422.
- Berson D. M., Dunn F. A., Takao M. (2002) "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock". *Science* 295(5557):1070-1073.
- Bessero A. C., Chiodini F., Rungger-Brandle E., Bonny C., Clarke P. G. (2010) "Role of the c-Jun N-terminal kinase pathway in retinal excitotoxicity, and neuroprotection by its inhibition". *J Neurochem* 113(5):1307-1318.
- Bianchi B. R., Lynch K. J., Touma E., Niforatos W., Burgard E. C., Alexander K. M., Park H. S., Yu H., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis M. F., van Biesen T. (1999) "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor

- subtypes". *Eur J Pharmacol* 376(1-2):127-138.
- Blanks J. C., Schmidt S. Y., Torigoe Y., Porrello K. V., Hinton D. R., Blanks R. H. (1996a) "Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL". *Neurobiol Aging* 17(3):385-395.
- Blanks J. C., Torigoe Y., Hinton D. R., Blanks R. H. (1996b) "Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina". *Neurobiol Aging* 17(3):377-384.
- Bo X., Jiang L. H., Wilson H. L., Kim M., Burnstock G., Surprenant A., North R. A. (2003) "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor". *Mol Pharmacol* 63(6):1407-1416.
- Bodin P., Burnstock G. (2001) "Purinergic signalling: ATP release". *Neurochem Res* 26(8-9):959-969.
- Boehm M. R., Oellers P., Thanos S. (2011) "Inflammation and immunology of the vitreoretinal compartment". *Inflamm Allergy Drug Targets* 10(4):283-309.
- Bogoyevitch M. A., Court N. W. (2004) "Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8". *Cell Signal* 16(12):1345-1354.
- Boland M. V., Quigley H. A. (2007) "Risk factors and open-angle glaucoma: classification and application". *J Glaucoma* 16(4):406-418.
- Boue-Grabot E., Archambault V., Seguela P. (2000) "A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels". *J Biol Chem* 275(14):10190-10195.
- Boue-Grabot E., Emerit M. B., Toulme E., Seguela P., Garret M. (2004) "Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels". *J Biol Chem* 279(8):6967-6975.
- Brancho D., Tanaka N., Jaeschke A., Ventura J. J., Kelkar N., Tanaka Y., Kyuuma M., Takeshita T., Flavell R. A., Davis R. J. (2003) "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo". *Genes Dev* 17(16):1969-1978.
- Brandle U., Kohler K., Wheeler-Schilling T. H. (1998) "Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina". *Brain Res Mol Brain Res* 62(1):106-109.
- Bringmann A., Pannicke T., Moll V., Milenkovic I., Faude F., Enzmann V., Wolf S., Reichenbach A. (2001) "Upregulation of P2X(7) receptor currents in Muller glial cells during proliferative vitreoretinopathy". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(3):860-867.
- Brown T. M., Tsujimura S., Allen A. E., Wynne J., Bedford R., Vickery G., Vugler A., Lucas R. J. (2012) "Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans". *Curr Biol* 22(12):1134-1141.
- Buckingham B. P., Inman D. M., Lambert W., Oglesby E., Calkins D. J., Steele M. R., Vetter M. L., Marsh-Armstrong N., Horner P. J. (2008) "Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma". *J Neurosci* 28(11):2735-2744.
- Budagian V., Bulanova E., Brovko L., Orinska Z., Fayad R., Paus R., Bulfone-Paus S. (2003) "Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B". *J Biol Chem* 278(3):1549-1560.
- Buettner R., Papoutsoglou G., Scemes E., Spray D. C., Dermietzel R. (2000) "Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3201-3206.
- Bui B. V., Edmunds B., Cioffi G. A., Fortune B. (2005) "The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1):202-213.
- Bui B. V., Fortune B. (2004) "Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram". *J Physiol* 555(Pt 1):153-173.
- Bulanova E., Budagian V., Orinska Z., Hein M., Petersen F., Thon L., Adam D., Bulfone-Paus S. (2005) "Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells". *J Immunol* 174(7):3880-3890.
- Burnstock G. (1972) "Purinergic nerves". *Pharmacol Rev* 24(3):509-581.
- Burnstock G. (1976) "Do some nerve cells release more than one transmitter?". *Neuroscience* 1(4):239-248.
- Burnstock G. (1997) "The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules". *Neuropharmacology* 36(9):1127-1139.
- Burnstock G. (2006) "Historical review: ATP as a neurotransmitter". *Trends Pharmacol Sci* 27(3):166-176.
- Burnstock G. (2007) "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission". *Physiol Rev* 87(2):659-797.

- Burnstock G. (2008) "Purinergetic signalling and disorders of the central nervous system". *Nat Rev Drug Discov* 7(7):575-590.
- Burnstock G. (2013) "Introduction to purinergetic signalling in the brain". *Adv Exp Med Biol* 986(1-12).
- Burnstock G. (2014) "Purinergetic signalling: from discovery to current developments". *Exp Physiol* 99(1):16-34.
- Burnstock G., Campbell G., Satchell D., Smythe A. (1970) "Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut". *Br J Pharmacol* 40(4):668-688.
- Burnstock G., Kennedy C. (1985) "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?". *Gen Pharmacol* 16(5):433-440.
- Caprioli J., Spaeth G. L. (1985) "Comparison of the optic nerve head in high- and low-tension glaucoma". *Arch Ophthalmol* 103(8):1145-1149.
- Carracedo G., Peral A., Pintor J. (2010) "Diadenosine polyphosphates in tears of Sjogren syndrome patients". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(11):5452-5459.
- Carrasquero L. M., Delicado E. G., Bustillo D., Gutierrez-Martin Y., Artalejo A. R., Miras-Portugal M. T. (2009) "P2X7 and P2Y13 purinergetic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes". *J Neurochem* 110(3):879-889.
- Carrasquero L. M., Delicado E. G., Sanchez-Ruiloba L., Iglesias T., Miras-Portugal M. T. (2010) "Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes". *Glia* 58(8):984-995.
- Casson R. J., Wood J. P., Osborne N. N. (2004) "Hypoglycaemia exacerbates ischaemic retinal injury in rats". *Br J Ophthalmol* 88(6):816-820.
- Castany M., Jordi I., Catala J., Gual A., Morales M., Gasull X., Pintor J. (2011) "Glaucoma patients present increased levels of diadenosine tetraphosphate, Ap(4)A, in the aqueous humour". *Exp Eye Res* 92(3):221-226.
- Castro E., Tome A. R., Miras-Portugal M. T., Rosario L. M. (1994) "Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells". *Pflugers Arch* 426(6):524-533.
- Catanzaro J. M., Hueston C. M., Deak M. M., Deak T. (2014) "The impact of the P2X7 receptor antagonist A-804598 on neuroimmune and behavioral consequences of stress". *Behav Pharmacol* 25(5-6):582-598.
- Cellini M., Possati G. L., Profazio V., Sbrocca M., Caramazza N., Caramazza R. (1997) "Color Doppler imaging and plasma levels of endothelin-1 in low-tension glaucoma". *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 224:11-13.
- Clyne J. D., LaPointe L. D., Hume R. I. (2002) "The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH". *J Physiol* 539(Pt 2):347-359.
- Coddou C., Yan Z., Obsil T., Huidobro-Toro J. P., Stojilkovic S. S. (2011) "Activation and regulation of purinergetic P2X receptor channels". *Pharmacol Rev* 63(3):641-683.
- Cohen P. S., Schmidtmayerova H., Dennis J., Dubrovsky L., Sherry B., Wang H., Bukrinsky M., Tracey K. J. (1997) "The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication". *Mol Med* 3(5):339-346.
- Collingridge G. L., Olsen R. W., Peters J., Spedding M. (2009) "A nomenclature for ligand-gated ion channels". *Neuropharmacology* 56(1):2-5.
- Cone R. D., Grodzicker T., Jaramillo M. (1988) "A retrovirus expressing the 12S adenoviral E1A gene product can immortalize epithelial cells from a broad range of rat tissues". *Mol Cell Biol* 8(3):1036-1044.
- Cook S. P., Rodland K. D., McCleskey E. W. (1998) "A memory for extracellular Ca²⁺ by speeding recovery of P2X receptors from desensitization". *J Neurosci* 18(22):9238-9244.
- Cordeiro M. F. (2002) "Beyond Mitomycin: TGF-beta and wound healing". *Prog Retin Eye Res* 21(1):75-89.
- Coulombe P., Meloche S. (2007) "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions". *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1376-1387.
- Cowlen M. S., Zhang V. Z., Warnock L., Moyer C. F., Peterson W. M., Yerxa B. R. (2003) "Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization". *Exp Eye Res* 77(1):77-84.
- Crish S. D., Dapper J. D., MacNamee S. E., Balam P., Sidorova T. N., Lambert W. S., Calkins D. J. (2013) "Failure of axonal transport induces a spatially coincident increase in astrocyte BDNF prior to synapse loss in a central target". *Neuroscience* 229(55-70).

- Crish S. D., Sappington R. M., Inman D. M., Horner P. J., Calkins D. J. (2010) "Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11):5196-5201.
- Crooke A., Guzman-Aranguez A., Peral A., Abdurrahman M. K., Pintor J. (2008) "Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology". *Pharmacol Ther* 119(1):55-73.
- Crosson C. E., Yates P. W., Bhat A. N., Mukhin Y. V., Husain S. (2004) "Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells". *J Pharmacol Exp Ther* 309(2):484-489.
- Cuenca N., Pinilla I., Fernandez-Sanchez L., Salinas-Navarro M., Alarcon-Martinez L., Aviles-Trigueros M., de la Villa P., Miralles de Imperial J., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2010) "Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice". *Exp Eye Res* 91(2):273-285.
- Cuenda A., Rousseau S. (2007) "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases". *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1358-1375.
- Currie K. P., Fox A. P. (1996) "ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca²⁺ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells". *Neuron* 16(5):1027-1036.
- Cursiefen C., Wisse M., Cursiefen S., Junemann A., Martus P., Korth M. (2000) "Migraine and tension headache in high-pressure and normal-pressure glaucoma". *Am J Ophthalmol* 129(1):102-104.
- Chambers L. J., Stevens A. J., Moses A. P., Michel A. D., Walter D. S., Davies D. J., Livermore D. G., Fonfria E., Demont E. H., Vimal M., Theobald P. J., Beswick P. J., Gleave R. J., Roman S. A., Senger S. (2010) "Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X7 receptor". *Bioorg Med Chem Lett* 20(10):3161-3164.
- Chang B., Smith R. S., Hawes N. L., Anderson M. G., Zabaleta A., Savinova O., Roderick T. H., Heckenlively J. R., Davisson M. T., John S. W. (1999) "Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice". *Nat Genet* 21(4):405-409.
- Chauhan B. C., Drance S. M. (1992) "The relationship between intraocular pressure and visual field progression in glaucoma". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230(6):521-526.
- Chen J. Z., Kadlubar F. F. (2003) "A new clue to glaucoma pathogenesis". *Am J Med* 114(8):697-698.
- Chen S., Ma Q., Krafft P. R., Chen Y., Tang J., Zhang J., Zhang J. H. (2013) "P2X7 receptor antagonism inhibits p38 mitogen-activated protein kinase activation and ameliorates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats". *Crit Care Med* 41(12):e466-474.
- Chen X., Pierce B., Naing W., Grapperhaus M. L., Phillion D. P. (2010) "Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoropyrimidin-2-yl)b enzamide as a potent and CNS penetrable P2X7 receptor antagonist". *Bioorg Med Chem Lett* 20(10):3107-3111.
- Chessell I. P., Michel A. D., Humphrey P. P. (1998) "Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor". *Br J Pharmacol* 124(6):1314-1320.
- Cheunsuang O., Morris R. (2005) "Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors". *Glia* 52(3):228-233.
- Chidlow G., Casson R., Sobrado-Calvo P., Vidal-Sanz M., Osborne N. N. (2005) "Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study". *Mol Vis* 11(387-396).
- Chow J., Liton P. B., Luna C., Wong F., Gonzalez P. (2007) "Effect of cellular senescence on the P2Y-receptor mediated calcium response in trabecular meshwork cells". *Mol Vis* 13(1926-1933).
- Dahl G., Locovei S. (2006) "Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?". *IUBMB Life* 58(7):409-419.
- Danias J., Lee K. C., Zamora M. F., Chen B., Shen F., Filippopoulos T., Su Y., Goldblum D., Podos S. M., Mittag T. (2003) "Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(12):5151-5162.
- Dapper J. D., Crish S. D., Pang I. H., Calkins D. J. (2013) "Proximal inhibition of p38 MAPK stress signaling prevents distal axonopathy". *Neurobiol Dis* 59(26-37).
- Davis R. J. (2000) "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". *Cell* 103(2):239-252.
- de la Villa P. y. B., R. (2004) "Métodos electrofisiológicos para el estudio de la

- función retiniana y sus alteraciones": www.retinosis.org.
- Denizot F., Lang R. (1986) "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". *J Immunol Methods* 89(2):271-277.
- Denlinger L. C., Angelini G., Schell K., Green D. N., Guadarrama A. G., Prabhu U., Coursin D. B., Bertics P. J., Hogan K. (2005) "Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production". *J Immunol* 174(7):4424-4431.
- Dervan E. W., Chen H., Ho S. L., Brummel N., Schmid J., Toomey D., Haralambova M., Gould E., Wallace D. M., Prehn J. H., O'Brien C. J., Murphy D. (2010) "Protein microarray profiling of serum autoantibodies in pseudoexfoliation glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6):2968-2975.
- Dhulipala P. D., Wang Y. X., Kotlikoff M. I. (1998) "The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced". *Gene* 207(2):259-266.
- Di Virgilio F., Chiozzi P., Falzoni S., Ferrari D., Sanz J. M., Venketaraman V., Baricordi O. R. (1998) "Cytolytic P2X purinoceptors". *Cell Death Differ* 5(3):191-199.
- Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J. M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O. R. (2001) "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells". *Blood* 97(3):587-600.
- Diaz-Hernandez J. I., Gomez-Villafuertes R., Leon-Otegui M., Hontecillas-Prieto L., Del Puerto A., Trejo J. L., Lucas J. J., Garrido J. J., Gualix J., Miras-Portugal M. T., Diaz-Hernandez M. (2012) "In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases". *Neurobiol Aging* 33(8):1816-1828.
- Diaz-Hernandez J. I., Sebastian-Serrano A., Gomez-Villafuertes R., Diaz-Hernandez M., Miras-Portugal M. T. (2015) "Age-related nuclear translocation of P2X6 subunit modifies splicing activity interacting with splicing factor 3A1". *PLoS One* 10(4):e0123121.
- Diaz-Hernandez M., del Puerto A., Diaz-Hernandez J. I., Diez-Zaera M., Lucas J. J., Garrido J. J., Miras-Portugal M. T. (2008) "Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons". *J Cell Sci* 121(Pt 22):3717-3728.
- Diaz-Hernandez M., Diez-Zaera M., Sanchez-Nogueiro J., Gomez-Villafuertes R., Canals J. M., Alberch J., Miras-Portugal M. T., Lucas J. J. (2009) "Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration". *FASEB J* 23(6):1893-1906.
- Diaz-Hernandez M., Pereira M. F., Pintor J., Cunha R. A., Ribeiro J. A., Miras-Portugal M. T. (2002) "Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation". *J Pharmacol Exp Ther* 301(2):441-450.
- Diaz-Hernandez M., Pintor J., Castro E., Miras-Portugal M. T. (2001) "Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals". *Eur J Neurosci* 14(6):918-926.
- Diaz-Hernandez M., Sanchez-Nogueiro J., Miras-Portugal M. T. (2006) "Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals". *J Mol Neurosci* 30(1-2):177-180.
- Diaz-Hernandez M., Sanchez-Nogueiro J., Pintor J., Miras-Portugal M. T. (2004) "Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals". *J Pharmacol Exp Ther* 311(3):954-967.
- Dielemans I., Vingerling J. R., Wolfs R. C., Hofman A., Grobbee D. E., de Jong P. T. (1994) "The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in The Netherlands. The Rotterdam Study". *Ophthalmology* 101(11):1851-1855.
- Dieterich D. C., Trivedi N., Engelmann R., Gundelfinger E. D., Gordon-Weeks P. R., Kreutz M. R. (2002) "Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins". *Eur J Neurosci* 15(9):1433-1443.
- Ding C., Wang P., Tian N. (2011) "Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model". *Exp Eye Res* 92(6):512-520.
- Ding S., Sachs F. (1999) "Single channel properties of P2X2 purinoceptors". *J Gen Physiol* 113(5):695-720.
- Dkhissi O., Chanut E., Wasowicz M., Savoldelli M., Nguyen-Legros J., Minvielle F.,

- Versaux-Botteri C. (1999) "Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5):990-995.
- Doh S. H., Kim J. H., Lee K. M., Park H. Y., Park C. K. (2010) "Retinal ganglion cell death induced by endoplasmic reticulum stress in a chronic glaucoma model". *Brain Res* 1308(158-166).
- Donnelly-Roberts D. L., Jarvis M. F. (2007) "Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states". *Br J Pharmacol* 151(5):571-579.
- Donnelly-Roberts D. L., Namovic M. T., Faltynek C. R., Jarvis M. F. (2004) "Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells". *J Pharmacol Exp Ther* 308(3):1053-1061.
- Donovan M., Doonan F., Cotter T. G. (2011) "Differential roles of ERK1/2 and JNK in retinal development and degeneration". *J Neurochem* 116(1):33-42.
- Downs J. C., Roberts, M. D., and Sigal, I. A. (2011) "Glaucomatous cupping of the lamina cribosa: A review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism". *Experimental Eye Research* 93(133-144).
- Drager U. C., Hofbauer A. (1984) "Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina". *Nature* 309(5969):624-626.
- Drager U. C., Olsen J. F. (1981) "Ganglion cell distribution in the retina of the mouse". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20(3):285-293.
- Dreyer E. B., Zurakowski D., Schumer R. A., Podos S. M., Lipton S. A. (1996) "Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma". *Arch Ophthalmol* 114(3):299-305.
- Drouyer E., Dkhissi-Benyahya O., Chiquet C., WoldeMussie E., Ruiz G., Wheeler L. A., Denis P., Cooper H. M. (2008) "Glaucoma alters the circadian timing system". *PLoS One* 3(12):e3931.
- Drury A. N., Szent-Gyorgyi A. (1929) "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart". *J Physiol* 68(3):213-237.
- Dubyak G. R., el-Moatassim C. (1993) "Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides". *Am J Physiol* 265(3 Pt 1):C577-606.
- Dutescu R. M., Li Q. X., Crowston J., Masters C. L., Baird P. N., Culvenor J. G. (2009) "Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of Alzheimer's disease". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247(9):1213-1221.
- Ebneter A., Casson R. J., Wood J. P., Chidlow G. (2010) "Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(12):6448-6460.
- Edwards F. A., Gibb A. J., Colquhoun D. (1992) "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system". *Nature* 359(6391):144-147.
- Egan T. M., Samways D. S., Li Z. (2006) "Biophysics of P2X receptors". *Pflugers Arch* 452(5):501-512.
- el-Moatassim C., Dubyak G. R. (1993) "Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. Product inhibition of phospholipase D enzyme activity". *J Biol Chem* 268(21):15571-15578.
- El-Remessy A. B., Tang Y., Zhu G., Matragoon S., Khalifa Y., Liu E. K., Liu J. Y., Hanson E., Mian S., Fatteh N., Liou G. I. (2008) "Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation". *Mol Vis* 14(2190-2203).
- Eldred J. A., Sanderson J., Wormstone M., Reddan J. R., Duncan G. (2003) "Stress-induced ATP release from and growth modulation of human lens and retinal pigment epithelial cells". *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1213-1215.
- Eltzschig H. K., Eckle T., Mager A., Kuper N., Karcher C., Weissmuller T., Boengler K., Schulz R., Robson S. C., Colgan S. P. (2006) "ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function". *Circ Res* 99(10):1100-1108.
- Emre M., Orgul S., Haufschild T., Shaw S. G., Flammer J. (2005) "Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma". *Br J Ophthalmol* 89(1):60-63.
- English J., Pearson G., Wilsbacher J., Swantek J., Karandikar M., Xu S., Cobb M. H. (1999) "New insights into the control of MAP kinase pathways". *Exp Cell Res* 253(1):255-270.

- Ennion S., Hagan S., Evans R. J. (2000) "The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors". *J Biol Chem* 275(38):29361-29367.
- Ennion S. J., Evans R. J. (2001) "Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens". *FEBS Lett* 489(2-3):154-158.
- Ennion S. J., Evans R. J. (2002) "Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface". *Mol Pharmacol* 61(2):303-311.
- Erb L., Liao Z., Seye C. I., Weisman G. A. (2006) "P2 receptors: intracellular signaling". *Pflugers Arch* 452(5):552-562.
- Fernandes K. A., Harder J. M., Fornarola L. B., Freeman R. S., Clark A. F., Pang I. H., John S. W., Libby R. T. (2012) "JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death". *Neurobiol Dis* 46(2):393-401.
- Fernandez-Sanchez L., de Sevilla Muller L. P., Brecha N. C., Cuenca N. (2014) "Loss of outer retinal neurons and circuitry alterations in the DBA/2J mouse". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(9):6059-6072.
- Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R. M., Curti A., Idzko M., Panther E., Di Virgilio F. (2006) "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release". *J Immunol* 176(7):3877-3883.
- Ferrari D., Wesselborg S., Bauer M. K., Schulze-Osthoff K. (1997) "Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65". *J Cell Biol* 139(7):1635-1643.
- Fields R. D., Burnstock G. (2006) "Purinergetic signalling in neuron-glia interactions". *Nat Rev Neurosci* 7(6):423-436.
- Filippopoulos T., Danias J., Chen B., Podos S. M., Mittag T. W. (2006) "Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2NNia mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(5):1968-1974.
- Fischbarg J. (2005) "The biology of the eye": *Elsevier Science*.
- Flammer J., Haefliger I. O., Orgul S., Resink T. (1999) "Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage?". *J Glaucoma* 8(3):212-219.
- Flammer J., Mozaffarieh M. (2007) "What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy?". *Surv Ophthalmol* 52 Suppl 2(S162-173).
- Franke H., Gunther A., Grosche J., Schmidt R., Rossner S., Reinhardt R., Faber-Zuschratter H., Schneider D., Illes P. (2004) "P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats". *J Neuropathol Exp Neurol* 63(7):686-699.
- Franke H., Klimke K., Brinckmann U., Grosche J., Francke M., Sperlagh B., Reichenbach A., Liebert U. G., Illes P. (2005) "P2X(7) receptor-mRNA and -protein in the mouse retina; changes during retinal degeneration in BALBCrds mice". *Neurochem Int* 47(4):235-242.
- Fredriksson R., Nordstrom K. J., Stephansson O., Hagglund M. G., Schioth H. B. (2008) "The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families". *FEBS Lett* 582(27):3811-3816.
- Freedman M. S., Lucas R. J., Soni B., von Schantz M., Munoz M., David-Gray Z., Foster R. (1999) "Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors". *Science* 284(5413):502-504.
- Fries J. E., Wheeler-Schilling T. H., Guenther E., Kohler K. (2004a) "Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10):3410-3417.
- Fries J. E., Wheeler-Schilling T. H., Kohler K., Guenther E. (2004b) "Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study". *Brain Res Mol Brain Res* 130(1-2):1-6.
- Frishman L. J. (2006) "Origins of the electroretinogram. "Principles and practice of clinical electrophysiology of vision"". Cambridge (Massachusetts, USA).
- Frishman L. J., Reddy M. G., Robson J. G. (1996) "Effects of background light on the human dark-adapted electroretinogram and psychophysical threshold". *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 13(3):601-612.
- Frishman L. J., Steinberg R. H. (1989) "Intraretinal analysis of the threshold dark-adapted ERG of cat retina". *J Neurophysiol* 61(6):1221-1232.
- Galindo-Romero C., Aviles-Trigueros M., Jimenez-Lopez M., Valiente-Soriano F. J., Salinas-Navarro M., Nadal-Nicolas F., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M. (2011) "Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time

- course analyses". *Exp Eye Res* 92(5):377-387.
- Galindo-Romero C., Jimenez-Lopez M., Garcia-Ayuso D., Salinas-Navarro M., Nadal-Nicolas F. M., Agudo-Barriuso M., Villegas-Perez M. P., Aviles-Trigueros M., Vidal-Sanz M. (2013a) "Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat". *Exp Eye Res* 108(84-93).
- Galindo-Romero C., Valiente-Soriano F. J., Jimenez-Lopez M., Garcia-Ayuso D., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M. (2013b) "Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(2):974-985.
- Gallego B. I., Salazar J. J., de Hoz R., Rojas B., Ramirez A. I., Salinas-Navarro M., Ortin-Martinez A., Valiente-Soriano F. J., Aviles-Trigueros M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Trivino A., Ramirez J. M. (2012) "IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma". *J Neuroinflammation* 9(92).
- Gass A., Flammer J., Linder L., Romerio S. C., Gasser P., Haefeli W. E. (1997) "Inverse correlation between endothelin-1-induced peripheral microvascular vasoconstriction and blood pressure in glaucoma patients". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(10):634-638.
- Gendron F. P., Chalimoniuk M., Strosznajder J., Shen S., Gonzalez F. A., Weisman G. A., Sun G. Y. (2003) "P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells". *J Neurochem* 87(2):344-352.
- Gerevich Z., Zadori Z., Muller C., Wirkner K., Schroder W., Rubini P., Illes P. (2007) "Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization". *Br J Pharmacol* 151(2):226-236.
- Gever J. R., Cockayne D. A., Dillon M. P., Burnstock G., Ford A. P. (2006) "Pharmacology of P2X channels". *Pflugers Arch* 452(5):513-537.
- Giasson B. I., Mushynski W. E. (1997) "Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit". *J Neurosci* 17(24):9466-9472.
- Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. (1991) "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease". *Nature* 349(6311):704-706.
- Goldblum D., Kipfer-Kauer A., Sarra G. M., Wolf S., Frueh B. E. (2007) "Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta immunoreactivity in DBA/2J glaucomatous mouse retinas". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(11):5085-5090.
- Golubnitschaja-Labudova O., Liu R., Decker C., Zhu P., Haefliger I. O., Flammer J. (2000) "Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma". *Curr Eye Res* 21(5):867-876.
- Gomez-Ramirez A. M., Villegas-Perez M. P., Miralles de Imperial J., Salvador-Silva M., Vidal-Sanz M. (1999) "Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(2):414-424.
- Gomez-Villafuertes R., del Puerto A., Diaz-Hernandez M., Bustillo D., Diaz-Hernandez J. I., Huerta P. G., Artalejo A. R., Garrido J. J., Miras-Portugal M. T. (2009) "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritegenesis in neuroblastoma cells". *FEBS J* 276(18):5307-5325.
- Gomez-Villafuertes R., Gualix J., Miras-Portugal M. T. (2001) "Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion". *J Neurochem* 77(1):84-93.
- Gomez-Villafuertes R., Pintor J., Gualix J., Miras-Portugal M. T. (2003) "GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes". *Neuropharmacology* 44(3):311-323.
- Gomez-Villafuertes R., Pintor J., Gualix J., Miras-Portugal M. T. (2004) "GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals". *J Pharmacol Exp Ther* 308(3):1148-1157.
- Gomez-Villafuertes R., Pintor J., Miras-Portugal M. T., Gualix J. (2014) "Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation". *J Neurochem* 131(3):290-302.

- Gonzalez-Menendez I., Contreras F., Cernuda-Cernuda R., Garcia-Fernandez J. M. (2009) "Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina". *Front Cell Neurosci* 3(3).
- Gonzalez-Menendez I., Contreras F., Cernuda-Cernuda R., Garcia-Fernandez J. M. (2010a) "No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina". *Histol Histopathol* 25(1):73-82.
- Gonzalez-Menendez I., Contreras F., Cernuda-Cernuda R., Provencio I., Garcia-Fernandez J. M. (2010b) "Postnatal development and functional adaptations of the melanopsin photoreceptive system in the albino mouse retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(9):4840-4847.
- Gordon J. L. (1986) "Extracellular ATP: effects, sources and fate". *Biochem J* 233(2):309-319.
- Gramlich O. W., Beck S., von Thun Und Hohenstein-Blaul N., Boehm N., Ziegler A., Vetter J. M., Pfeiffer N., Grus F. H. (2013) "Enhanced insight into the autoimmune component of glaucoma: IgG autoantibody accumulation and pro-inflammatory conditions in human glaucomatous retina". *PLoS One* 8(2):e57557.
- Greenwood D., Yao W. P., Housley G. D. (1997) "Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina". *Neuroreport* 8(5):1083-1088.
- Griehaber M. C., Flammer J. (2007) "Does the blood-brain barrier play a role in Glaucoma?". *Surv Ophthalmol* 52 Suppl 2(S115-121).
- Grossmann J. (2002) "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"". *Apoptosis* 7(3):247-260.
- Grozdanic S. D., Betts D. M., Sakaguchi D. S., Allbaugh R. A., Kwon Y. H., Kardon R. H. (2003) "Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4337-4346.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. (1985) "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties". *J Biol Chem* 260(6):3440-3450.
- Grytz R., Meschke G., Jonas J. B. (2011) "The collagen fibril architecture in the lamina cribrosa and peripapillary sclera predicted by a computational remodeling approach". *Biomech Model Mechanobiol* 10(3):371-382.
- Gu B. J., Sluyter R., Skarratt K. K., Shemon A. N., Dao-Ung L. P., Fuller S. J., Barden J. A., Clarke A. L., Petrou S., Wiley J. S. (2004) "An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor". *J Biol Chem* 279(30):31287-31295.
- Gualix J., Abal M., Pintor J., Garcia-Carmona F., Miras-Portugal M. T. (1996) "Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation". *J Biol Chem* 271(4):1957-1965.
- Gualix J., Fideu M. D., Pintor J., Rotllan P., Garcia-Carmona F., Miras-Portugal M. T. (1997) "Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla". *FASEB J* 11(12):981-990.
- Gualix J., Gomez-Villafuertes R., Diaz-Hernandez M., Miras-Portugal M. T. (2003) "Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain". *J Neurochem* 87(1):160-171.
- Gualix J., Pintor J., Miras-Portugal M. T. (1999) "Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles". *J Neurochem* 73(3):1098-1104.
- Guo C., Masin M., Qureshi O. S., Murrell-Lagnado R. D. (2007a) "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors". *Mol Pharmacol* 72(6):1447-1456.
- Guo L., Moss S. E., Alexander R. A., Ali R. R., Fitzke F. W., Cordeiro M. F. (2005) "Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1):175-182.
- Guo L., Salt T. E., Luong V., Wood N., Cheung W., Maass A., Ferrari G., Russo-Marie F., Sillito A. M., Cheetham M. E., Moss S. E., Fitzke F. W., Cordeiro M. F. (2007b) "Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment". *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33):13444-13449.
- Gupta N., Fong J., Ang L. C., Yucel Y. H. (2008) "Retinal tau pathology in human glaucomas". *Can J Ophthalmol* 43(1):53-60.
- Guzman-Aranguez A., Crooke A., Peral A., Hoyle C. H., Pintor J. (2007) "Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics". *Prog Retin Eye Res* 26(6):674-687.
- Guzman-Aranguez A., Diez L. M., Martin-Gil A., Gualix J., Miras-Portugal M. T., Pintor J. (2012) "Effect of diinosine polyphosphates on intraocular pressure in normotensive rabbits". *Exp Eye Res* 101(49-55).

- Guzman-Aranguez A., Santano C., Martin-Gil A., Fonseca B., Pintor J. (2013) "Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives". *J Pharmacol Exp Ther* 345(3):331-341.
- Hammam T., Montgomery D., Morris D., Imrie F. (2008) "Prevalence of serum autoantibodies and paraproteins in patients with glaucoma". *Eye (Lond)* 22(3):349-353.
- Hankins M. W., Peirson S. N., Foster R. G. (2008) "Melanopsin: an exciting photopigment". *Trends Neurosci* 31(1):27-36.
- Harada C., Nakamura K., Namekata K., Okumura A., Mitamura Y., Iizuka Y., Kashiwagi K., Yoshida K., Ohno S., Matsuzawa A., Tanaka K., Ichijo H., Harada T. (2006) "Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress-induced neural cell apoptosis in vivo". *Am J Pathol* 168(1):261-269.
- Harada T., Harada C., Nakamura K., Quah H. M., Okumura A., Namekata K., Saeki T., Aihara M., Yoshida H., Mitani A., Tanaka K. (2007) "The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma". *J Clin Invest* 117(7):1763-1770.
- Harazny J., Scholz M., Buder T., Lausen B., Kremers J. (2009) "Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse". *Doc Ophthalmol* 119(3):181-197.
- Harder J. M., Fernandes K. A., Libby R. T. (2012) "The Bcl-2 family member BIM has multiple glaucoma-relevant functions in DBA/2J mice". *Sci Rep* 2(530).
- Hardy L. A., Harvey I. J., Chambers P., Gillespie J. I. (2000) "A putative alternatively spliced variant of the P2X(1) purinoreceptor in human bladder". *Exp Physiol* 85(4):461-463.
- Hartwick A. T., Lalonde M. R., Barnes S., Baldrige W. H. (2004) "Adenosine A1-receptor modulation of glutamate-induced calcium influx in rat retinal ganglion cells". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10):3740-3748.
- Hattar S., Kumar M., Park A., Tong P., Tung J., Yau K. W., Berson D. M. (2006) "Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse". *J Comp Neurol* 497(3):326-349.
- Hattar S., Liao H. W., Takao M., Berson D. M., Yau K. W. (2002) "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity". *Science* 295(5557):1065-1070.
- Hattori M., Gouaux E. (2012) "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors". *Nature* 485(7397):207-212.
- Heiduschka P., Julien S., Schuettauf F., Schnichels S. (2010) "Loss of retinal function in aged DBA/2J mice - New insights into retinal neurodegeneration". *Exp Eye Res* 91(5):779-783.
- Hernandez M. R., Pena J. D. (1997) "The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy". *Arch Ophthalmol* 115(3):389-395.
- Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M. (1993) "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain". *Genes Dev* 7(11):2135-2148.
- Hodges R. R., Vrovljanis J., Scott R., Dartt D. A. (2011) "Identification of P2X(3) and P2X(7) purinergic receptors activated by ATP in rat lacrimal gland". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(6):3254-3263.
- Hodges R. R., Vrovljanis J., Shatos M. A., Dartt D. A. (2009) "Characterization of P2X7 purinergic receptors and their function in rat lacrimal gland". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12):5681-5689.
- Hofbauer A., Drager U. C. (1985) "Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus". *J Comp Neurol* 234(4):465-474.
- Hoffman P. N., Pollock S. C., Striph G. G. (1993) "Altered gene expression after optic nerve transection: reduced neurofilament expression as a general response to axonal injury". *Exp Neurol* 119(1):32-36.
- Holcombe D. J., Lengefeld N., Gole G. A., Barnett N. L. (2008) "Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model". *Br J Ophthalmol* 92(5):683-688.
- Holton F. A., Holton P. (1953) "The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings". *J Physiol* 119(4):50P-51P.
- Holton F. A., Holton P. (1954) "The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings". *J Physiol* 126(1):124-140.
- Holton P. (1959) "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves". *J Physiol* 145(3):494-504.
- Hollander H., Makarov F., Stefani F. H., Stone J. (1995) "Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals". *Ophthalmic Res* 27(5):296-309.

- Hollo G., Lakatos P., Farkas K. (1998) "Cold pressor test and plasma endothelin-1 concentration in primary open-angle and capsular glaucoma". *J Glaucoma* 7(2):105-110.
- Honjo M., Tanihara H., Kido N., Inatani M., Okazaki K., Honda Y. (2000) "Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(2):552-560.
- Honore P., Donnelly-Roberts D., Namovic M. T., Hsieh G., Zhu C. Z., Mikusa J. P., Hernandez G., Zhong C., Gauvin D. M., Chandran P., Harris R., Medrano A. P., Carroll W., Marsh K., Sullivan J. P., Faltynek C. R. and Jarvis M. F. (2006) A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 1376-1385.
- Hosoya K., Ueda H., Kim K. J., Lee V. H. (1999) "Nucleotide stimulation of Cl(-) secretion in the pigmented rabbit conjunctiva". *J Pharmacol Exp Ther* 291(1):53-59.
- Housley G. D., Luo L., Ryan A. F. (1998) "Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization". *J Comp Neurol* 393(4):403-414.
- Howell G. R., Libby R. T., John S. W. (2008) "Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection". *Prog Brain Res* 173(303-321).
- Howell G. R., Libby R. T., Marchant J. K., Wilson L. A., Cosma I. M., Smith R. S., Anderson M. G., John S. W. (2007) "Absence of glaucoma in DBA/2J mice homozygous for wild-type versions of Gpnmb and Tyrp1". *BMC Genet* 8(45).
- Hoyle C. H., Pintor J. J. (2010) "Diadenosine tetraphosphate protects sympathetic terminals from 6-hydroxydopamine-induced degeneration in the eye". *Acta Physiol (Oxf)* 199(2):205-210.
- Hu B., Senkler C., Yang A., Soto F., Liang B. T. (2002) "P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP". *J Biol Chem* 277(18):15752-15757.
- Hu H., Lu W., Zhang M., Zhang X., Argall A. J., Patel S., Lee G. E., Kim Y. C., Jacobson K. A., Laties A. M., Mitchell C. H. (2010) "Stimulation of the P2X7 receptor kills rat retinal ganglion cells in vivo". *Exp Eye Res* 91(3):425-432.
- Huang P., Qi Y., Xu Y. S., Liu J., Liao D., Zhang S. S., Zhang C. (2010) "Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma". *J Glaucoma* 19(5):324-330.
- Huang W., Fileta J. B., Filippopoulos T., Ray A., Dobberfuhr A., Grosskreutz C. L. (2007) "Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9):4129-4135.
- Humphreys B. D., Dubyak G. R. (1996) "Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line". *J Immunol* 157(12):5627-5637.
- Humphreys B. D., Rice J., Kertesz S. B., Dubyak G. R. (2000) "Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor". *J Biol Chem* 275(35):26792-26798.
- Iandiev I., Wurm A., Pannicke T., Wiedemann P., Reichenbach A., Robson S. C., Zimmermann H., Bringmann A. (2007) "Ectonucleotidases in Muller glial cells of the rodent retina: Involvement in inhibition of osmotic cell swelling". *Purinergic Signal* 3(4):423-433.
- Inman D. M., Horner P. J. (2007) "Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma". *Glia* 55(9):942-953.
- Inman D. M., Sappington R. M., Horner P. J., Calkins D. J. (2006) "Quantitative correlation of optic nerve pathology with ocular pressure and corneal thickness in the DBA/2 mouse model of glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(3):986-996.
- Iseri P. K., Altinas O., Tokay T., Yuksel N. (2006) "Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease". *J Neuroophthalmol* 26(1):18-24.
- Ishii K., Kaneda M., Li H., Rockland K. S., Hashikawa T. (2003) "Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina". *J Comp Neurol* 459(3):267-277.

- Jacobson K. A. (2010) "P2X and P2Y Receptors". *Tocris Review N33 Tocris Bioscience*.
- Jacobson K. A., Boeynaems J. M. (2010) "P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications". *Drug Discov Today* 15(13-14):570-578.
- Jacobson K. A., Jayasekara M. P., Costanzi S. (2012) "Molecular Structure of P2Y Receptors: Mutagenesis, Modeling, and Chemical Probes". *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1(6).
- Jakobs T. C., Libby R. T., Ben Y., John S. W., Masland R. H. (2005) "Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice". *J Cell Biol* 171(2):313-325.
- Janciauskiene S., Krakau T. (2001) "Alzheimer's peptide: a possible link between glaucoma, exfoliation syndrome and Alzheimer's disease". *Acta Ophthalmol Scand* 79(3):328-329.
- Jeng S. M., Karger R. A., Hodge D. O., Burke J. P., Johnson D. H., Good M. S. (2007) "The risk of glaucoma in pseudoexfoliation syndrome". *J Glaucoma* 16(1):117-121.
- Jeon C. J., Strettoi E., Masland R. H. (1998) "The major cell populations of the mouse retina". *J Neurosci* 18(21):8936-8946.
- Jiang L. H., Kim M., Spelta V., Bo X., Surprenant A., North R. A. (2003) "Subunit arrangement in P2X receptors". *J Neurosci* 23(26):8903-8910.
- Jiang L. H., Mackenzie A. B., North R. A., Surprenant A. (2000) "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors". *Mol Pharmacol* 58(1):82-88.
- Jiang Y., Li Z., Schwarz E. M., Lin A., Guan K., Ulevitch R. J., Han J. (1997) "Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection". *J Biol Chem* 272(17):11096-11102.
- Jimenez-Pacheco A., Mesuret G., Sanz-Rodriguez A., Tanaka K., Mooney C., Conroy R., Miras-Portugal M. T., Diaz-Hernandez M., Henshall D. C., Engel T. (2013) "Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079". *Epilepsia* 54(9):1551-1561.
- Jo Y. H., Schlichter R. (1999) "Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons". *Nat Neurosci* 2(3):241-245.
- Joachim S. C., Bruns K., Lackner K. J., Pfeiffer N., Grus F. H. (2007a) "Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor". *Curr Eye Res* 32(6):501-509.
- Joachim S. C., Reichelt J., Berneiser S., Pfeiffer N., Grus F. H. (2008) "Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246(4):573-580.
- Joachim S. C., Wuenschig D., Pfeiffer N., Grus F. H. (2007b) "IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma". *Mol Vis* 13(1573-1579).
- John S. W., Smith R. S., Savinova O. V., Hawes N. L., Chang B., Turnbull D., Davisson M., Roderick T. H., Heckenlively J. R. (1998) "Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6):951-962.
- Johnson E. C., Morrison J. C. (2009) "Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma". *J Glaucoma* 18(5):341-353.
- Johnson E. C., Morrison J. C., Farrell S., Deppmeier L., Moore C. G., McGinty M. R. (1996) "The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix". *Exp Eye Res* 62(6):663-674.
- Johnson L. V., Leitner W. P., Rivest A. J., Staples M. K., Radeke M. J., Anderson D. H. (2002) "The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11830-11835.
- Johnson T. V., Tomarev S. I. (2010) "Rodent models of glaucoma". *Brain Res Bull* 81(2-3):349-358.
- Ju K. R., Kim H. S., Kim J. H., Lee N. Y., Park C. K. (2006) "Retinal glial cell responses and Fas/FasL activation in rats with chronic ocular hypertension". *Brain Res* 1122(1):209-221.
- Ju W. K., Kim K. Y., Angert M., Duong-Polk K. X., Lindsey J. D., Ellisman M. H., Weinreb R. N. (2009) "Memantine blocks mitochondrial OPA1 and cytochrome c release and subsequent apoptotic cell death in glaucomatous retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(2):707-716.
- Jumblatt J. E., Jumblatt M. M. (1998) "Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and

- human conjunctiva". *Exp Eye Res* 67(3):341-346.
- Jun D. J., Kim J., Jung S. Y., Song R., Noh J. H., Park Y. S., Ryu S. H., Kim J. H., Kong Y. Y., Chung J. M., Kim K. T. (2007) "Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors". *J Biol Chem* 282(52):37350-37358.
- Jung C., Shea T. B. (1999) "Regulation of neurofilament axonal transport by phosphorylation in optic axons in situ". *Cell Motil Cytoskeleton* 42(3):230-240.
- Kahlenberg J. M., Dubyak G. R. (2004) "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release". *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5):C1100-1108.
- Kakurai K., Sugiyama T., Kurimoto T., Oku H., Ikeda T. (2013) "Involvement of P2X(7) receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats". *Neurosci Lett* 534(237-241).
- Kaneda M., Ishii K., Morishima Y., Akagi T., Yamazaki Y., Nakanishi S., Hashikawa T. (2004) "OFF-cholinergic-pathway-selective localization of P2X2 purinoceptors in the mouse retina". *J Comp Neurol* 476(1):103-111.
- Kaneda M., Ishii T., Hosoya T. (2008) "Pathway-dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina". *Eur J Neurosci* 28(1):128-136.
- Kaneda M., Ito K., Shigematsu Y., Shimoda Y. (2010) "The OFF-pathway dominance of P2X(2)-purinoceptors is formed without visual experience". *Neurosci Res* 66(1):86-91.
- Kaushik S., Pandav S. S., Ram J. (2003) "Neuroprotection in glaucoma". *J Postgrad Med* 49(1):90-95.
- Kawamura H., Sugiyama T., Wu D. M., Kobayashi M., Yamanishi S., Katsumura K., Puro D. G. (2003) "ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina". *J Physiol* 551(Pt 3):787-799.
- Kawate T., Michel J. C., Birdsong W. T., Gouaux E. (2009) "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state". *Nature* 460(7255):592-598.
- Kermer P., Klocker N., Labes M., Bahr M. (1998) "Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo". *J Neurosci* 18(12):4656-4662.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer* 26(4):239-257.
- Khakh B. S., Fisher J. A., Nashmi R., Bowser D. N., Lester H. A. (2005) "An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X2 and alpha4beta2 nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy". *J Neurosci* 25(29):6911-6920.
- Kikuchi M., Tenneti L., Lipton S. A. (2000) "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells". *J Neurosci* 20(13):5037-5044.
- Kim H. S., Park C. K. (2005) "Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program". *Brain Res* 1057(1-2):17-28.
- Kim M., Jiang L. H., Wilson H. L., North R. A., Surprenant A. (2001) "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex". *EMBO J* 20(22):6347-6358.
- King B. F., Townsend-Nicholson A., Wildman S. S., Thomas T., Spyer K. M., Burnstock G. (2000) "Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes". *J Neurosci* 20(13):4871-4877.
- King B. F., Ziganshina L. E., Pintor J., Burnstock G. (1996) "Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH". *Br J Pharmacol* 117(7):1371-1373.
- Klapperstuck M., Buttner C., Schmalzing G., Markwardt F. (2001) "Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor". *J Physiol* 534(Pt 1):25-35.
- Klepeis V. E., Weinger I., Kaczmarek E., Trinkaus-Randall V. (2004) "P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration". *J Cell Biochem* 93(6):1115-1133.
- Kokotas H., Kroupis C., Chiras D., Grigoriadou M., Lamnissou K., Petersen M. B., Kitsos G. (2012) "Biomarkers in primary open angle glaucoma". *Clin Chem Lab Med* 50(12):2107-2119.
- Kolb H. (2003) "How the retina work.". *American Scientist* 91(8).
- Kong Q., Wang M., Liao Z., Camden J. M., Yu S., Simonyi A., Sun G. Y., Gonzalez F. A., Erb L., Seye C. I., Weisman G. A. (2005) "P2X(7) nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons". *Purinergic Signal* 1(4):337-347.

- Kong W. C., Cho E. Y. (1999) "Antibodies against neurofilament subunits label retinal ganglion cells but not displaced amacrine cells of hamsters". *Life Sci* 64(19):1773-1778.
- Kong Y. X., Crowston J. G., Vingrys A. J., Trounce I. A., Bui V. B. (2009) "Functional changes in the retina during and after acute intraocular pressure elevation in mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12):5732-5740.
- Kremmer S., Kreuzfelder E., Klein R., Bontke N., Henneberg-Quester K. B., Steuhl K. P., Grosse-Wilde H. (2001) "Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma". *Clin Exp Immunol* 125(2):211-215.
- Kuehn M. H., Kim C. Y., Ostojic J., Bellin M., Alward W. L., Stone E. M., Sakaguchi D. S., Grozdanic S. D., Kwon Y. H. (2006) "Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension". *Exp Eye Res* 83(3):620-628.
- Kukulski F., Levesque S. A., Sevigny J. (2011) "Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling". *Adv Pharmacol* 61(263-299).
- Kyriakis J. M., Avruch J. (2001) "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation". *Physiol Rev* 81(2):807-869.
- Lafuente Lopez-Herrera M. P., Mayor-Torroglosa S., Miralles de Imperial J., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2002) "Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine". *Exp Neurol* 178(2):243-258.
- Lafuente M. P., Villegas-Perez M. P., Selles-Navarro I., Mayor-Torroglosa S., Miralles de Imperial J., Vidal-Sanz M. (2002) "Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult". *Neuroscience* 109(1):157-168.
- Lalo U., Pankratov Y., Wichert S. P., Rossner M. J., North R. A., Kirchhoff F., Verkhratsky A. (2008) "P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes". *J Neurosci* 28(21):5473-5480.
- Lam B. L. (2005) "Electrophysiology of vision : clinical testing and applications". Boca Raton: *Taylor & Francis*.
- Lam T. T., Ablner A. S., Kwong J. M., Tso M. O. (1999) "N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(10):2391-2397.
- Lam T. T., Kwong J. M., Tso M. O. (2003) "Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2):638-645.
- Lazarowski E. (2006) "Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells". *Novartis Found Symp* 276(73-84; discussion 84-90, 107-112, 275-181).
- Lazarowski E. R. (2010) "Quantification of extracellular UDP-galactose". *Anal Biochem* 396(1):23-29.
- Lazarowski E. R., Boucher R. C., Harden T. K. (2003) "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules". *Mol Pharmacol* 64(4):785-795.
- Le Feuvre R., Brough D., Rothwell N. (2002) "Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration". *Eur J Pharmacol* 447(2-3):261-269.
- Le K. T., Paquet M., Nouel D., Babinski K., Seguela P. (1997) "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system". *FEBS Lett* 418(1-2):195-199.
- Lechner S. G., Boehm S. (2004) "Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors". *Purinergic Signal* 1(1):31-41.
- Lenertz L. Y., Gavala M. L., Hill L. M., Bertics P. J. (2009) "Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking". *Purinergic Signal* 5(2):175-187.
- Leon D., Hervas C., Miras-Portugal M. T. (2006) "P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons". *Eur J Neurosci* 23(11):2999-3013.
- Levkovitch-Verbin H., Harizman N., Dardik R., Nisgav Y., Vander S., Melamed S. (2007) "Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma". *Exp Eye Res* 85(2):250-258.
- Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Martin K. R., Harizman N., Valenta D. F., Pease M. E., Melamed S. (2005) "The transcription factor c-jun is activated in retinal ganglion cells in experimental rat glaucoma". *Exp Eye Res* 80(5):663-670.
- Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Martin K. R., Valenta D., Baumrind L. A., Pease M. E. (2002) "Translimbal laser photocoagulation to the trabecular

- meshwork as a model of glaucoma in rats". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(2):402-410.
- Levy-Lahad E., Wijsman E. M., Nemens E., Anderson L., Goddard K. A., Weber J. L., Bird T. D., Schellenberg G. D. (1995) "A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1". *Science* 269(5226):970-973.
- Lewis C., Neidhart S., Holy C., North R. A., Buell G., Surprenant A. (1995) "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons". *Nature* 377(6548):432-435.
- Li A., Zhang X., Zheng D., Ge J., Laties A. M., Mitchell C. H. (2011) "Sustained elevation of extracellular ATP in aqueous humor from humans with primary chronic angle-closure glaucoma". *Exp Eye Res* 93(4):528-533.
- Li R. S., Tay D. K., Chan H. H., So K. F. (2006) "Changes of retinal functions following the induction of ocular hypertension in rats using argon laser photocoagulation". *Clin Experiment Ophthalmol* 34(6):575-583.
- Li Y., Kuang K., Yerxa B., Wen Q., Rosskothan H., Fischbarg J. (2001) "Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y2(2) receptor agonists stimulate Cl(-) and fluid secretion". *Am J Physiol Cell Physiol* 281(2):C595-602.
- Li Y., Schlamp C. L., Nickells R. W. (1999) "Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5):1004-1008.
- Li Y., Schlamp C. L., Poulsen G. L., Jackson M. W., Griep A. E., Nickells R. W. (2002) "p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate". *Mol Vis* 8(341-350).
- Libby R. T., Anderson M. G., Pang I. H., Robinson Z. H., Savinova O. V., Cosma I. M., Snow A., Wilson L. A., Smith R. S., Clark A. F., John S. W. (2005) "Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration". *Vis Neurosci* 22(5):637-648.
- Lin J. W., Sugimori M., Llinas R. R., McGuinness T. L., Greengard P. (1990) "Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse". *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21):8257-8261.
- Liu B., Fang M., Lu Y., Lu Y., Mills G. B., Fan Z. (2001) "Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells". *Br J Cancer* 85(2):303-311.
- Liu B., Neufeld A. H. (2000) "Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head". *Glia* 30(2):178-186.
- Liu X., Surprenant A., Mao H. J., Roger S., Xia R., Bradley H., Jiang L. H. (2008) "Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper". *Mol Pharmacol* 73(1):252-259.
- Locovei S., Bao L., Dahl G. (2006) "Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20):7655-7659.
- London A., Benhar I., Schwartz M. (2013) "The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders". *Nat Rev Neurol* 9(1):44-53.
- Lorca R. A., Coddou C., Gazitua M. C., Bull P., Arredondo C., Huidobro-Toro J. P. (2005) "Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation". *J Neurochem* 95(2):499-512.
- Lu W., Hu H., Seigny J., Gabelt B. T., Kaufman P. L., Johnson E. C., Morrison J. C., Zode G. S., Sheffield V. C., Zhang X., Laties A. M., Mitchell C. H. (2015) "Rat, mouse, and primate models of chronic glaucoma show sustained elevation of extracellular ATP and altered purinergic signaling in the posterior eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(5):3075-3083.
- Lucas R. J., Hattar S., Takao M., Berson D. M., Foster R. G., Yau K. W. (2003) "Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice". *Science* 299(5604):245-247.
- Luo C., Yang X., Kain A. D., Powell D. W., Kuehn M. H., Tezel G. (2010) "Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(11):5697-5707.
- Luthje J., Ogilvie A. (1983) "The presence of diadenosine 5',5''-P1,P3-triphosphate (Ap3A) in human platelets". *Biochem Biophys Res Commun* 115(1):253-260.
- Lynch K. J., Touma E., Niforatos W., Kage K. L., Burgard E. C., van Biesen T., Kowaluk E. A., Jarvis M. F. (1999) "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors". *Mol Pharmacol* 56(6):1171-1181.

- Mabuchi F., Aihara M., Mackey M. R., Lindsey J. D., Weinreb R. N. (2003) "Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4321-4330.
- Mabuchi F., Lindsey J. D., Aihara M., Mackey M. R., Weinreb R. N. (2004) "Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(6):1841-1845.
- Maminishkis A., Jalickee S., Blaug S. A., Rymer J., Yerxa B. R., Peterson W. M., Miller S. S. (2002) "The P2Y(2) receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11):3555-3566.
- Manabe S., Lipton S. A. (2003) "Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1):385-392.
- Marc R. E. (2004) "Retinal Neurotransmitters". En: "The Visual Neuroscience" (Werner, C. y.), pp 315-330: MIT Press.
- Marco-Gomariz M. A., Hurtado-Montalban N., Vidal-Sanz M., Lund R. D., Villegas-Perez M. P. (2006) "Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats". *J Comp Neurol* 498(2):163-179.
- Markovskaya A., Crooke A., Guzman-Aranguiz A. I., Peral A., Ziganshin A. U., Pintor J. (2008) "Hypotensive effect of UDP on intraocular pressure in rabbits". *Eur J Pharmacol* 579(1-3):93-97.
- Marmor M. F., Fulton A. B., Holder G. E., Miyake Y., Brigell M., Bach M., International Society for Clinical Electrophysiology of V. (2009) "ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update)". *Doc Ophthalmol* 118(1):69-77.
- Marmor M. F., Holder G. E., Seeliger M. W., Yamamoto S., International Society for Clinical Electrophysiology of V. (2004) "Standard for clinical electroretinography (2004 update)". *Doc Ophthalmol* 108(2):107-114.
- Marquez-Klaka B., Rettinger J., Bhargava Y., Eisele T., Nicke A. (2007) "Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor". *J Neurosci* 27(6):1456-1466.
- Martin-Gil A., de Lara M. J., Crooke A., Santano C., Peral A., Pintor J. (2012) "Silencing of P2Y(2) receptors reduces intraocular pressure in New Zealand rabbits". *Br J Pharmacol* 165(4b):1163-1172.
- Martínez A. (2013) "Papel de las alteraciones hemodinámicas sistémicas y oculares en el glaucoma.". *Rev Esp Glau Hipert Ocul* 3(6 - 16).
- Martinez A., Sanchez M. (2005) "Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma". *Acta Ophthalmol Scand* 83(6):716-722.
- Maruyama I., Ohguro H., Ikeda Y. (2000) "Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(7):1657-1665.
- Masland R. H. (2001) "Neuronal diversity in the retina". *Curr Opin Neurobiol* 11(4):431-436.
- Mayo C., Ren R., Rich C., Stepp M. A., Trinkaus-Randall V. (2008) "Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(10):4384-4391.
- McCulloch D. L., Marmor M. F., Brigell M. G., Hamilton R., Holder G. E., Tzekov R., Bach M. (2015) "ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update)". *Doc Ophthalmol* 130(1):1-12.
- McDonald P. H., Chow C. W., Miller W. E., Laporte S. A., Field M. E., Lin F. T., Davis R. J., Lefkowitz R. J. (2000) "Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3". *Science* 290(5496):1574-1577.
- McKerracher L., Vallee R. B., Aguayo A. J. (1989) "Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina". *Vis Neurosci* 2(4):349-356.
- McKerracher L., Vidal-Sanz M., Essagian C., Aguayo A. J. (1990) "Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats". *J Neurosci* 10(8):2834-2841.
- McKinnon S. J., Lehman D. M., Kerrigan-Baumrind L. A., Merges C. A., Pease M. E., Kerrigan D. F., Ransom N. L., Tahzib N. G., Reitsamer H. A., Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Zack D. J. (2002) "Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(4):1077-1087.
- McKinnon S. J., Schlamp C. L., Nickells R. W. (2009) "Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma". *Exp Eye Res* 88(4):816-824.
- Mediero A., Crooke A., Pintor J. (2010) "Dienosine polyphosphates, Ap4A and Ap3A, increase epithelial cell proliferation

- during corneal wound healing". *J Emmetropia* 1(81-87).
- Mermoud A., Baerveldt G., Mickler D. S., Wu G. S., Rao N. A. (1994) "Animal model for uveitic glaucoma". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232(9):553-560.
- Meyer C. H., Hotta K., Peterson W. M., Toth C. A., Jaffe G. J. (2002) "Effect of INS37217, a P2Y(2) receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11):3567-3574.
- Milenkovic I., Weick M., Wiedemann P., Reichenbach A., Bringmann A. (2003) "P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(3):1211-1220.
- Millan J. L. (2006) "Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes". *Purinergic Signal* 2(2):335-341.
- Miller R. F., Dowling J. E. (1970) "Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram". *J Neurophysiol* 33(3):323-341.
- Mitchell C. H. (2001) "Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space". *J Physiol* 534(Pt 1):193-202.
- Mitchell C. H., Carre D. A., McGlinn A. M., Stone R. A., Civan M. M. (1998) "A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7174-7178.
- Mitchell C. H., Lu W., Hu H., Zhang X., Reigada D., Zhang M. (2009) "The P2X(7) receptor in retinal ganglion cells: A neuronal model of pressure-induced damage and protection by a shifting purinergic balance". *Purinergic Signal* 5(2):241-249.
- Mitchell C. H., Reigada D. (2008) "Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE". *Purinergic Signal* 4(2):101-107.
- Mizuno K., Koide T., Yoshimura M., Araie M. (2001) "Neuroprotective effect and intraocular penetration of nipradilol, a beta-blocker with nitric oxide donative action". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(3):688-694.
- Moll V., Weick M., Milenkovic I., Kodal H., Reichenbach A., Bringmann A. (2002) "P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial DNA synthesis". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(3):766-773.
- Monif M., Burnstock G., Williams D. A. (2010) "Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor". *Int J Biochem Cell Biol* 42(11):1753-1756.
- Moreno M. C., Sande P., Marcos H. A., de Zavalía N., Keller Sarmiento M. I., Rosenstein R. E. (2005) "Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity". *FASEB J* 19(9):1161-1162.
- Morgan J. E. (2000) "Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage". *Eye (Lond)* 14 (Pt 3B):437-444.
- Morgan J. y. W., R. (2008) "Development of cell types and synaptic connections in the retina". En: "The Organization of the Retina and Visual System" (Kolb, H., Nelson, R., Fernandez, E. y Jones, B.) <http://retina.umh.es/webvision/Wong.html>.
- Mori M., Heuss C., Gahwiler B. H., Gerber U. (2001) "Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures". *J Physiol* 535(Pt 1):115-123.
- Morizane C., Adachi K., Furutani I., Fujita Y., Akaike A., Kashii S., Honda Y. (1997) "N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester protects retinal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in vivo". *Eur J Pharmacol* 328(1):45-49.
- Morrison J. C., Moore C. G., Deppmeier L. M., Gold B. G., Meshul C. K., Johnson E. C. (1997) "A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage". *Exp Eye Res* 64(1):85-96.
- Mosmann T. (1983) "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Mrosovsky N., Hattar S. (2003) "Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice". *Chronobiol Int* 20(6):989-999.
- Munemasa Y., Ohtani-Kaneko R., Kitaoka Y., Kumai T., Kitaoka Y., Hayashi Y., Watanabe M., Takeda H., Hirata K., Ueno S. (2006) "Pro-apoptotic role of c-Jun in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina". *J Neurosci Res* 83(5):907-918.
- Munemasa Y., Ohtani-Kaneko R., Kitaoka Y., Kuribayashi K., Isenoumi K., Kogo J., Yamashita K., Kumai T., Kobayashi S., Hirata K., Ueno S. (2005) "Contribution of mitogen-activated protein kinases to

- NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina". *Brain Res* 1044(2):227-240.
- Murakami T., Fujihara T., Horibe Y., Nakamura M. (2004) "Diquafosol elicits increases in net Cl⁻ transport through P2Y2 receptor stimulation in rabbit conjunctiva". *Ophthalmic Res* 36(2):89-93.
- Murakami T., Fujihara T., Nakamura M., Nakata K. (2000) "P2Y(2) receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits". *Curr Eye Res* 21(4):782-787.
- Murrell-Lagnado R. D., Qureshi O. S. (2008) "Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)". *Mol Membr Biol* 25(4):321-331.
- Nadal-Nicolas F. M., Jimenez-Lopez M., Sobrado-Calvo P., Nieto-Lopez L., Canovas-Martinez I., Salinas-Navarro M., Vidal-Sanz M., Agudo M. (2009) "Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(8):3860-3868.
- Nag T. C., Wadhwa S. (2001) "Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina". *J Biosci* 26(2):179-191.
- Nagaraju M., Saleh M., Porciatti V. (2007) "IOP-dependent retinal ganglion cell dysfunction in glaucomatous DBA/2J mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(10):4573-4579.
- Nagaya N., Tittle R. K., Saar N., Dellal S. S., Hume R. I. (2005) "An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors". *J Biol Chem* 280(28):25982-25993.
- Nakazawa T., Nakazawa C., Matsubara A., Noda K., Hisatomi T., She H., Michaud N., Hafezi-Moghadam A., Miller J. W., Benowitz L. I. (2006) "Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma". *J Neurosci* 26(49):12633-12641.
- Naskar R., Vorwerk C. K., Dreyer E. B. (2000) "Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(7):1940-1944.
- Naskar R., Wissing M., Thanos S. (2002) "Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9):2962-2968.
- Nassar K., Tura A., Luke J., Luke M., Grisanti S., Grisanti S. (2015) "A p38 MAPK Inhibitor Improves Outcome After Glaucoma Filtration Surgery". *J Glaucoma* 24(2):165-178.
- Neal M., Cunningham J. (1994) "Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones". *Br J Pharmacol* 113(4):1085-1087.
- Nebreda A. R., Porras A. (2000) "p38 MAP kinases: beyond the stress response". *Trends Biochem Sci* 25(6):257-260.
- Neufeld A. H. (1999a) "Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma". *Arch Ophthalmol* 117(8):1050-1056.
- Neufeld A. H. (1999b) "Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma". *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1(S129-135).
- Neufeld A. H., Hernandez M. R., Gonzalez M. (1997) "Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head". *Arch Ophthalmol* 115(4):497-503.
- Newman E. A. (2003) "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP". *J Neurosci* 23(5):1659-1666.
- Nicke A. (2008) "Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits". *Biochem Biophys Res Commun* 377(3):803-808.
- Nicke A., Baumert H. G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E., Schmalzing G. (1998) "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels". *EMBO J* 17(11):3016-3028.
- Nicke A., Kerschensteiner D., Soto F. (2005) "Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits". *J Neurochem* 92(4):925-933.
- Nickells R. W. (1996) "Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe". *J Glaucoma* 5(5):345-356.
- Ning A., Cui J., To E., Ashe K. H., Matsubara J. (2008) "Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(11):5136-5143.
- Nishida K., Nomura Y., Kawamori K., Moriyama Y., Nagasawa K. (2014) "Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons". *Neurosci Lett* 579(75-79).
- Nixon R. A., Lewis S. E. (1986) "Differential turnover of phosphate groups on neurofilament subunits in mammalian neurons in vivo". *J Biol Chem* 261(35):16298-16301.
- Niyadurupola N., Sidaway P., Ma N., Rhodes J. D., Broadway D. C., Sanderson J. (2013) "P2X7 receptor activation mediates retinal

- ganglion cell death in a human retina model of ischemic neurodegeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(3):2163-2170.
- Niyadurupola N., Sidaway P., Osborne A., Broadway D. C., Sanderson J. (2011) "The development of human organotypic retinal cultures (HORCs) to study retinal neurodegeneration". *Br J Ophthalmol* 95(5):720-726.
- North R. A. (1996) "Families of ion channels with two hydrophobic segments". *Curr Opin Cell Biol* 8(4):474-483.
- North R. A. (2002) "Molecular physiology of P2X receptors". *Physiol Rev* 82(4):1013-1067.
- Noske W., Hensen J., Wiederholt M. (1997) "Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(9):551-552.
- Notomi S., Hisatomi T., Kanemaru T., Takeda A., Ikeda Y., Enaida H., Kroemer G., Ishibashi T. (2011) "Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death". *Am J Pathol* 179(6):2798-2809.
- Nour M., Quiambao A. B., Peterson W. M., Al-Ubaidi M. R., Naash M. I. (2003) "P2Y(2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4505-4514.
- Novak I., Jans I. M., Wohlfahrt L. (2010) "Effect of P2X(7) receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands". *J Physiol* 588(Pt 18):3615-3627.
- O'Brien C., Butt Z. (1999) "Blood flow velocity in the peripheral circulation of glaucoma patients". *Ophthalmologica* 213(3):150-153.
- Ojino K., Shimazawa M., Izawa H., Nakano Y., Tsuruma K., Hara H. (2015) "Involvement of endoplasmic reticulum stress in optic nerve degeneration after chronic high intraocular pressure in DBA/2J mice". *J Neurosci Res* 93(11):1675-1683.
- Okada Y., Maeno E. (2001) "Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130(3):377-383.
- Okuno T., Oku H., Sugiyama T., Goto W., Ikeda T. (2003) "Evaluation of nitric oxide synthesis in the optic nerve head in vivo using microdialysis and high-performance liquid chromatography and its interaction with endothelin-1". *Ophthalmic Res* 35(2):78-83.
- OMS O. M. d. I. S. (2004) "Causes and magnitude of blindness and visual impairment". *Fact Sheet N° 282 November*.
- Ono K., Han J. (2000) "The p38 signal transduction pathway: activation and function". *Cell Signal* 12(1):1-13.
- Ortega F., Perez-Sen R., Delicado E. G., Miras-Portugal M. T. (2009) "P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons". *Neurotox Res* 15(3):193-204.
- Ortega F., Perez-Sen R., Delicado E. G., Teresa Miras-Portugal M. (2011) "ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons". *Neuropharmacology* 61(8):1210-1221.
- Ortega F., Perez-Sen R., Miras-Portugal M. T. (2008) "Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons". *J Neurochem* 104(1):62-73.
- Ortega F., Perez-Sen R., Morente V., Delicado E. G., Miras-Portugal M. T. (2010) "P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons". *Cell Mol Life Sci* 67(10):1723-1733.
- Osborne N. N., DeSantis L., Bae J. H., Ugarte M., Wood J. P., Nash M. S., Chidlow G. (1999) "Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina". *Exp Eye Res* 69(3):331-342.
- Panchin Y. V. (2005) "Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative". *J Exp Biol* 208(Pt 8):1415-1419.
- Panda S., Provencio I., Tu D. C., Pires S. S., Rollag M. D., Castrucci A. M., Pletcher M. T., Sato T. K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S. A., Van Gelder R. N., Hogenesch J. B. (2003) "Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice". *Science* 301(5632):525-527.
- Panenska W., Jijon H., Herx L. M., Armstrong J. N., Feighan D., Wei T., Yong V. W., Ransohoff R. M., MacVicar B. A. (2001) "P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase". *J Neurosci* 21(18):7135-7142.

- Pang J. J., Wu S. M. (2011) "Morphology and immunoreactivity of retrogradely double-labeled ganglion cells in the mouse retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(7):4886-4896.
- Pankratov Y., Lalo U., Verkhatsky A., North R. A. (2006) "Vesicular release of ATP at central synapses". *Pflugers Arch* 452(5):589-597.
- Pannicke T., Fischer W., Biedermann B., Schädlich H., Grosche J., Faude F., Wiedemann P., Allgaier C., Illes P., Burnstock G., Reichenbach A. (2000) "P2X7 receptors in Müller glial cells from the human retina". *J Neurosci* 20(16):5965-5972.
- Parisi V., Restuccia R., Fattapposta F., Mina C., Bucci M. G., Pierelli F. (2001) "Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients". *Clin Neurophysiol* 112(10):1860-1867.
- Parnell M., Guo L., Abdi M., Cordeiro M. F. (2012) "Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models". *Int J Alzheimers Dis* 2012(786494).
- Parrilla-Reverter G., Agudo M., Nadal-Nicolas F., Alarcon-Martinez L., Jimenez-Lopez M., Salinas-Navarro M., Sobrado-Calvo P., Bernal-Garro J. M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2009a) "Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study". *Vision Res* 49(23):2808-2825.
- Parrilla-Reverter G., Agudo M., Sobrado-Calvo P., Salinas-Navarro M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2009b) "Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study". *Exp Eye Res* 89(1):32-41.
- Parvathani L. K., Tertyshnikova S., Greco C. R., Roberts S. B., Robertson B., Posmantur R. (2003) "P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *J Biol Chem* 278(15):13309-13317.
- Pease M. E., McKinnon S. J., Quigley H. A., Kerrigan-Baumrind L. A., Zack D. J. (2000) "Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(3):764-774.
- Peinado-Ramon P., Salvador M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (1996) "Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(4):489-500.
- Pelegrin P., Surprenant A. (2006) "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor". *EMBO J* 25(21):5071-5082.
- Pelegrin P., Surprenant A. (2007) "Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway". *J Biol Chem* 282(4):2386-2394.
- Pena J. D., Taylor A. W., Ricard C. S., Vidal I., Hernandez M. R. (1999) "Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads". *Br J Ophthalmol* 83(2):209-218.
- Pepys M. B. (2006) "Amyloidosis". *Annu Rev Med* 57(223-241).
- Peral A., Carracedo G., Acosta M. C., Gallar J., Pintor J. (2006) "Increased levels of diadenosine polyphosphates in dry eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(9):4053-4058.
- Peral A., Gallar J., Pintor J. (2009) "Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system". *Exp Eye Res* 89(1):63-70.
- Perez S. E., Lumayag S., Kovacs B., Mufson E. J., Xu S. (2009) "Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(2):793-800.
- Perrot R., Berges R., Bocquet A., Eyer J. (2008) "Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration". *Mol Neurobiol* 38(1):27-65.
- Perry V. H. (1981) "Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina". *Neuroscience* 6(5):931-944.
- Perry V. H., Morris R. J., Raisman G. (1984) "Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve?". *J Neurocytol* 13(5):809-824.
- Peterson W. M., Meggyesy C., Yu K., Miller S. S. (1997) "Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium". *J Neurosci* 17(7):2324-2337.
- Pfeiffer Z. A., Aga M., Prabhu U., Watters J. J., Hall D. J., Bertics P. J. (2004) "The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho". *J Leukoc Biol* 75(6):1173-1182.
- Pinazo-Duran M. D., Zanon-Moreno V., Garcia-Medina J. J., Gallego-Pinazo R. (2013)

- "Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma". *Curr Opin Pharmacol* 13(1):98-107.
- Pintor J. (1999) "Purinergic signalling in the eye". En: "Nervous control of the eye" (Burnstock, G., Sillito, A.,) Amsterdam: *Harwood Academic Publishers*.
- Pintor J. (2007) "[A molecular marker for dry eye]". *Arch Soc Esp Oftalmol* 82(3):129-130.
- Pintor J., Bautista A., Carracedo G., Peral A. (2004a) "UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea". *Ophthalmic Physiol Opt* 24(3):186-193.
- Pintor J., Carracedo G., Alonso M. C., Bautista A., Peral A. (2002a) "Presence of diadenosine polyphosphates in human tears". *Pflugers Arch* 443(3):432-436.
- Pintor J., Kowalewsky, H. J., Torres, M., Miras-Portugal, M. T. y Zimmermann, H. (1992) "Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the Torpedo electric organ.". *Neurosci Res Commun* 10(9-15).
- Pintor J., Martin-Gil, A., Fonseca, B. (2011) "Activation of TRPV4 induces the release of diadenosine tetraphosphate in the aqueous humour.". *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* (Póster).
- Pintor J., Pelaez T., Peral A. (2004b) "Adenosine tetraphosphate, Ap₄, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes". *J Pharmacol Exp Ther* 308(2):468-473.
- Pintor J., Peral A., Hoyle C. H., Redick C., Douglass J., Sims I., Yerxa B. (2002b) "Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits". *J Pharmacol Exp Ther* 300(1):291-297.
- Pintor J., Peral A., Pelaez T., Martin S., Hoyle C. H. (2003) "Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure". *J Pharmacol Exp Ther* 304(1):342-348.
- Pintor J., Porras A., Mora F., Miras-Portugal M. T. (1993) "Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap₄A and Ap₅A--from caudate putamen of conscious rat". *Neurosci Lett* 150(1):13-16.
- Pintor J., Porras A., Mora F., Miras-Portugal M. T. (1995) "Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat". *J Neurochem* 64(2):670-676.
- Pintor J., Rotllan P., Torres M., Miras-Portugal M. T. (1992) "Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release". *Anal Biochem* 200(2):296-300.
- Pintor J., Sanchez-Nogueiro J., Irazu M., Mediero A., Pelaez T., Peral A. (2004c) "Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye". *Purinergic Signal* 1(1):83-90.
- Pintor J., Torres M., Miras-Portugal M. T. (1991) "Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap₄A and Ap₅A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells". *Life Sci* 48(24):2317-2324.
- Pochet S., Gomez-Munoz A., Marino A., Dehaye J. P. (2003) "Regulation of phospholipase D by P2X7 receptors in submandibular ductal cells". *Cell Signal* 15(10):927-935.
- Poelchen W., Sieler D., Wirkner K., Illes P. (2001) "Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat". *Neuroscience* 102(3):593-602.
- Porciatti V., Chou T. H., Feuer W. J. (2010) "C57BL/6J, DBA/2J, and DBA/2J.Gpnm mice have different visual signal processing in the inner retina". *Mol Vis* 16(2939-2947).
- Porciatti V., Saleh M., Nagaraju M. (2007) "The pattern electroretinogram as a tool to monitor progressive retinal ganglion cell dysfunction in the DBA/2J mouse model of glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(2):745-751.
- Porras A., Zuluaga S., Black E., Valladares A., Alvarez A. M., Ambrosino C., Benito M., Nebreda A. R. (2004) "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli". *Mol Biol Cell* 15(2):922-933.
- Prasanna G., Hulet C., Desai D., Krishnamoorthy R. R., Narayan S., Brun A. M., Suburo A. M., Yorio T. (2005) "Effect of elevated intraocular pressure on endothelin-1 in a rat model of glaucoma". *Pharmacol Res* 51(1):41-50.
- Prasanna G., Krishnamoorthy R., Clark A. F., Wordinger R. J., Yorio T. (2002) "Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(8):2704-2713.
- Puthussery T., Fletcher E. (2009) "Extracellular ATP induces retinal photoreceptor apoptosis

- through activation of purinoceptors in rodents". *J Comp Neurol* 513(4):430-440.
- Puthussery T., Fletcher E. L. (2004) "Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina". *J Comp Neurol* 472(1):13-23.
- Puthussery T., Fletcher E. L. (2007) "Neuronal expression of P2X3 purinoceptors in the rat retina". *Neuroscience* 146(1):403-414.
- Puthussery T., Yee P., Vingrys A. J., Fletcher E. L. (2006) "Evidence for the involvement of purinergic P2X receptors in outer retinal processing". *Eur J Neurosci* 24(1):7-19.
- Quigley H. A. (1999) "Neuronal death in glaucoma". *Prog Retin Eye Res* 18(1):39-57.
- Quigley H. A., Broman A. T. (2006) "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020". *Br J Ophthalmol* 90(3):262-267.
- Quigley H. A., Nickells R. W., Kerrigan L. A., Pease M. E., Thibault D. J., Zack D. J. (1995) "Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(5):774-786.
- Quina L. A., Pak W., Lanier J., Banwait P., Gratwick K., Liu Y., Velasquez T., O'Leary D. D., Goulding M., Turner E. E. (2005) "Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways". *J Neurosci* 25(50):11595-11604.
- Ralevic V., Burnstock G. (1998) "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacol Rev* 50(3):413-492.
- Raman M., Chen W., Cobb M. H. (2007) "Differential regulation and properties of MAPKs". *Oncogene* 26(22):3100-3112.
- Ramirez A. I., Salazar J. J., de Hoz R., Rojas B., Gallego B. I., Salinas-Navarro M., Alarcon-Martinez L., Ortin-Martinez A., Aviles-Trigueros M., Vidal-Sanz M., Trivino A., Ramirez J. M. (2010) "Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(11):5690-5696.
- Ramirez J. M., Trivino A., Ramirez A. I., Salazar J. J., Garcia-Sanchez J. (1996) "Structural specializations of human retinal glial cells". *Vision Res* 36(14):2029-2036.
- Ramon y Cajal S. (1904) "Histología del sistema nervioso". *Nicolás Moya Madrid*.
- Rao V. R., Krishnamoorthy R. R., Yorio T. (2008) "Endothelin-1 mediated regulation of extracellular matrix collagens in cells of human lamina cribrosa". *Exp Eye Res* 86(6):886-894.
- Reichelt J., Joachim S. C., Pfeiffer N., Grus F. H. (2008) "Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension". *Curr Eye Res* 33(3):253-261.
- Reichstein D., Ren L., Filippopoulos T., Mittag T., Danias J. (2007) "Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma". *Exp Eye Res* 84(1):13-21.
- Reigada D., Lu W., Zhang M., Mitchell C. H. (2008) "Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels". *Neuroscience* 157(2):396-404.
- Reigada D., Lu W., Zhang X., Friedman C., Pendrak K., McGlinn A., Stone R. A., Laties A. M., Mitchell C. H. (2005) "Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium". *Am J Physiol Cell Physiol* 289(3):C617-624.
- Reimer R. J., Edwards R. H. (2004) "Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family". *Pflugers Arch* 447(5):629-635.
- Resta V., Novelli E., Di Virgilio F., Galli-Resta L. (2005) "Neuronal death induced by endogenous extracellular ATP in retinal cholinergic neuron density control". *Development* 132(12):2873-2882.
- Resta V., Novelli E., Vozzi G., Scarpa C., Caleo M., Ahluwalia A., Solini A., Santini E., Parisi V., Di Virgilio F., Galli-Resta L. (2007) "Acute retinal ganglion cell injury caused by intraocular pressure spikes is mediated by endogenous extracellular ATP". *Eur J Neurosci* 25(9):2741-2754.
- Rettinger J., Aschrafi A., Schmalzing G. (2000) "Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor". *J Biol Chem* 275(43):33542-33547.
- Rettinger J., Schmalzing G. (2004) "Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor". *J Biol Chem* 279(8):6426-6433.
- Reynolds C. H., Utton M. A., Gibb G. M., Yates A., Anderton B. H. (1997) "Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein". *J Neurochem* 68(4):1736-1744.
- Richardson P. J., Brown S. J. (1987) "ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals". *J Neurochem* 48(2):622-630.

- Rieck J. (2013) "The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(3):2393-2409.
- Rigosi E., Ensini M., Bottari D., Leone P., Galli-Resta L. (2010) "Loss of retinal capillary vasoconstrictor response to Endothelin-1 following pressure increments in living isolated rat retinas". *Exp Eye Res* 90(1):33-40.
- Ritch R. (1996) "A unification hypothesis of pigment dispersion syndrome". *Trans Am Ophthalmol Soc* 94(381-405; discussion 405-389).
- Roberts J. A., Evans R. J. (2004) "ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists". *J Biol Chem* 279(10):9043-9055.
- Roberts J. A., Evans R. J. (2006) "Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP". *J Neurochem* 96(3):843-852.
- Robson S. C., Sevigny J., Zimmermann H. (2006) "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance". *Purinergic Signal* 2(2):409-430.
- Rodríguez del Castillo A., Torres M., Delicado E. G., Miras-Portugal M. T. (1988) "Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules". *J Neurochem* 51(6):1696-1703.
- Rogaev E. I., Sherrington R., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Liang Y., Chi H., Lin C., Holman K., Tsuda T., et al. (1995) "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene". *Nature* 376(6543):775-778.
- Rojas B., Gallego B. I., Ramirez A. I., Salazar J. J., de Hoz R., Valiente-Soriano F. J., Aviles-Trigueros M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Trivino A., Ramirez J. M. (2014) "Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers". *J Neuroinflammation* 11(133).
- Rossetti L., Marchetti I., Orzalesi N., Scorpiglione N., Torri V., Liberati A. (1993) "Randomized clinical trials on medical treatment of glaucoma. Are they appropriate to guide clinical practice?". *Arch Ophthalmol* 111(1):96-103.
- Roth S., Shaikh A. R., Hennelly M. M., Li Q., Bindokas V., Graham C. E. (2003) "Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(12):5383-5395.
- Rotonda J., Nicholson D. W., Fazil K. M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E. P., Rasper D. M., Ruel R., Vaillancourt J. P., Thornberry N. A., Becker J. W. (1996) "The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis". *Nat Struct Biol* 3(7):619-625.
- Saleh M., Nagaraju M., Porciatti V. (2007) "Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(10):4564-4572.
- Salinas-Navarro M., Alarcon-Martinez L., Valiente-Soriano F. J., Jimenez-Lopez M., Mayor-Torroglosa S., Aviles-Trigueros M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2010) "Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration". *Exp Eye Res* 90(1):168-183.
- Salinas-Navarro M., Alarcon-Martinez L., Valiente-Soriano F. J., Ortin-Martinez A., Jimenez-Lopez M., Aviles-Trigueros M., Villegas-Perez M. P., de la Villa P., Vidal-Sanz M. (2009a) "Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice". *Mol Vis* 15(2578-2598).
- Salinas-Navarro M., Jimenez-Lopez M., Valiente-Soriano F. J., Alarcon-Martinez L., Aviles-Trigueros M., Mayor S., Holmes T., Lund R. D., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2009b) "Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution". *Vision Res* 49(6):637-647.
- Salinas-Navarro M., Mayor-Torroglosa S., Jimenez-Lopez M., Aviles-Trigueros M., Holmes T. M., Lund R. D., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. (2009c) "A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats". *Vision Res* 49(1):115-126.
- Sanderson J., Dartt D. A., Trinkaus-Randall V., Pintor J., Civan M. M., Delamere N. A., Fletcher E. L., Salt T. E., Grosche A., Mitchell C. H. (2014) "Purines in the eye: recent evidence for the physiological and

- pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Muller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland". *Exp Eye Res* 127(270-279).
- Sappington R. M., Calkins D. J. (2008) "Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(7):3004-3017.
- Sappington R. M., Carlson B. J., Crish S. D., Calkins D. J. (2010) "The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(1):207-216.
- Saszik S. M., Robson J. G., Frishman L. J. (2002) "The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse". *J Physiol* 543(Pt 3):899-916.
- Sawada A., Neufeld A. H. (1999) "Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure". *Exp Eye Res* 69(5):525-531.
- Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., Moriyama Y. (2008) "Identification of a vesicular nucleotide transporter". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15):5683-5686.
- Schlamp C. L., Johnson E. C., Li Y., Morrison J. C., Nickells R. W. (2001) "Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells". *Mol Vis* 7(192-201).
- Schlamp C. L., Li Y., Dietz J. A., Janssen K. T., Nickells R. W. (2006) "Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric". *BMC Neurosci* 7(66).
- Schmued L. C., Fallon J. H. (1986) "Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties". *Brain Res* 377(1):147-154.
- Schmued L. C., Kyriakidis K., Fallon J. H., Ribak C. E. (1989) "Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study". *J Neurocytol* 18(3):333-343.
- Scholz M., Buder T., Seeber S., Adamek E., Becker C. M., Lutjen-Drecoll E. (2008) "Dependency of intraocular pressure elevation and glaucomatous changes in DBA/2J and DBA/2J-Rj mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(2):613-621.
- Schuettauf F., Quinto K., Naskar R., Zurakowski D. (2002) "Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model". *Vision Res* 42(20):2333-2337.
- Schuettauf F., Rejda R., Walski M., Frontczak-Baniewicz M., Voelker M., Blatsios G., Shinoda K., Zagorski Z., Zrenner E., Grieb P. (2004) "Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse—a model for ocular hypertension". *Acta Neuropathol* 107(4):352-358.
- Seigel G. M. (1996) "Establishment of an E1A-immortalized retinal cell culture". *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32(2):66-68.
- Seigel G. M. (2014) "Review: R28 retinal precursor cells: the first 20 years". *Mol Vis* 20(301-306).
- Seigel G. M., Sun W., Wang J., Hershberger D. H., Campbell L. M., Salvi R. J. (2004) "Neuronal gene expression and function in the growth-stimulated R28 retinal precursor cell line". *Curr Eye Res* 28(4):257-269.
- Selles-Navarro I., Villegas-Perez M. P., Salvador-Silva M., Ruiz-Gomez J. M., Vidal-Sanz M. (1996) "Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(10):2002-2014.
- Sellick G. S., Rudd M., Eve P., Allinson R., Matutes E., Catovsky D., Houlston R. S. (2004) "The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(6):1065-1067.
- Shareef S. R., Garcia-Valenzuela E., Salierno A., Walsh J., Sharma S. C. (1995) "Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats". *Exp Eye Res* 61(3):379-382.
- Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J. F., Bruni A. C., Montesi M. P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R. J., Wasco W., Da Silva H. A., Haines J. L., Pericak-Vance M. A., Tanzi R. E., Roses A. D., Fraser P. E., Rommens J. M., St George-Hyslop P. H. (1995) "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease". *Nature* 375(6534):754-760.
- Shigematsu Y., Shimoda Y., Kaneda M. (2007) "Distribution of immunoreactivity for P2X3, P2X5, and P2X6-purinoreceptors in mouse retina". *J Mol Histol* 38(4):369-371.

- Siesky B. A. (2012) "Glaucoma and ocular blood flow: an anatomical perspective.". *Ex Rev Op* 7(325 - 340).
- Siliprandi R., Canella R., Carmignoto G., Schiavo N., Zanellato A., Zanoni R., Vantini G. (1992) "N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina". *Vis Neurosci* 8(6):567-573.
- Silveira L. C., Russelakis-Carneiro M., Perry V. H. (1994) "The ganglion cell response to optic nerve injury in the cat: differential responses revealed by neurofibrillar staining". *J Neurocytol* 23(2):75-86.
- Simon J., Kidd E. J., Smith F. M., Chessell I. P., Murrell-Lagnado R., Humphrey P. P., Barnard E. A. (1997) "Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor". *Mol Pharmacol* 52(2):237-248.
- Skaper S. D., Debetto P., Giusti P. (2010) "The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders". *FASEB J* 24(2):337-345.
- Smart M. L., Gu B., Panchal R. G., Wiley J., Cromer B., Williams D. A., Petrou S. (2003) "P2X7 receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region". *J Biol Chem* 278(10):8853-8860.
- Smith R. S., Zabaleta A., Kume T., Savinova O. V., Kidson S. H., Martin J. E., Nishimura D. Y., Alward W. L., Hogan B. L., John S. W. (2000) "Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development". *Hum Mol Genet* 9(7):1021-1032.
- Sneddon P., Westfall T. D., Todorov L. D., Todorova S. M., Westfall D. P., Nickel P., Kennedy C. (2000) "The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens". *Br J Pharmacol* 129(6):1089-1094.
- Sobrado-Calvo P., Vidal-Sanz M., Villegas-Perez M. P. (2007) "Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor". *J Comp Neurol* 501(6):866-878.
- Sokolova E., Skorinkin A., Fabbretti E., Masten L., Nistri A., Giniatullin R. (2004) "Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation". *Br J Pharmacol* 141(6):1048-1058.
- Soto D., Pintor J., Peral A., Gual A., Gasull X. (2005) "Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility". *J Pharmacol Exp Ther* 314(3):1042-1051.
- Soto I., Oglesby E., Buckingham B. P., Son J. L., Roberson E. D., Steele M. R., Inman D. M., Vetter M. L., Horner P. J., Marsh-Armstrong N. (2008) "Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model". *J Neurosci* 28(2):548-561.
- Soto I., Pease M. E., Son J. L., Shi X., Quigley H. A., Marsh-Armstrong N. (2011) "Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(1):434-441.
- Spires T. L., Hyman B. T. (2005) "Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals". *NeuroRx* 2(3):423-437.
- Sreedharan S., Shaik J. H., Olszewski P. K., Levine A. S., Schieth H. B., Fredriksson R. (2010) "Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression". *BMC Genomics* 11(17).
- St George-Hyslop P. H. (1992) "Genetic evidence for a novel familiar Alzheimer's disease locus on chromosome 14". *Nature Genetics* 2(330-334).
- Stasi K., Nagel D., Yang X., Wang R. F., Ren L., Podos S. M., Mittag T., Danias J. (2006) "Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(3):1024-1029.
- Sternberger N. H., Sternberger L. A., Ulrich J. (1985) "Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease". *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12):4274-4276.
- Stokely M. E., Brady S. T., Yorio T. (2002) "Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(10):3223-3230.
- Stoop R., Thomas S., Rassendren F., Kawashima E., Buell G., Surprenant A., North R. A. (1999) "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C". *Mol Pharmacol* 56(5):973-981.
- Strauss O. (2005) "The retinal pigment epithelium in visual function". *Physiol Rev* 85(3):845-881.

- Suadicani S. O., Brosnan C. F., Scemes E. (2006) "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling". *J Neurosci* 26(5):1378-1385.
- Sugiyama T., Kawamura H., Yamanishi S., Kobayashi M., Katsumura K., Puro D. G. (2005) "Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels". *Am J Physiol Cell Physiol* 288(3):C568-576.
- Sugiyama T., Lee S. Y., Horie T., Oku H., Takai S., Tanioka H., Kuriki Y., Kojima S., Ikeda T. (2013) "P2X(7) receptor activation may be involved in neuronal loss in the retinal ganglion cell layer after acute elevation of intraocular pressure in rats". *Mol Vis* 19(2080-2091).
- Sugiyama T., Oku H., Komori A., Ikeda T. (2006) "Effect of P2X7 receptor activation on the retinal blood velocity of diabetic rabbits". *Arch Ophthalmol* 124(8):1143-1149.
- Sugiyama T., Oku H., Shibata M., Fukuhara M., Yoshida H., Ikeda T. (2010) "Involvement of P2X7 receptors in the hypoxia-induced death of rat retinal neurons". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6):3236-3243.
- Sullivan R. K., Woldemussie E., Macnab L., Ruiz G., Pow D. V. (2006) "Evoked expression of the glutamate transporter GLT-1c in retinal ganglion cells in human glaucoma and in a rat model". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(9):3853-3859.
- Sun S. H., Lin L. B., Hung A. C., Kuo J. S. (1999) "ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors". *J Neurochem* 73(1):334-343.
- Surgucheva I., Weisman A. D., Goldberg J. L., Shnyra A., Surguchov A. (2008) "Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells". *Mol Vis* 14(1540-1548).
- Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R. A., Buell G. (1996) "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)". *Science* 272(5262):735-738.
- Suzuki T., Hide I., Ido K., Kohsaka S., Inoue K., Nakata Y. (2004) "Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia". *J Neurosci* 24(1):1-7.
- Syed N. H. a. K., CH. (2012) "Pharmacology of P2X receptors". *WIREs Membr Transp Signal* 1(16-30).
- Takeda K., Ichijo H. (2002) "Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system". *Genes Cells* 7(11):1099-1111.
- Tamm E. R., Russell P., Johnson D. H., Piatigorsky J. (1996) "Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(12):2402-2413.
- Tanaka N., Kamanaka M., Enslin H., Dong C., Wysk M., Davis R. J., Flavell R. A. (2002) "Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis". *EMBO Rep* 3(8):785-791.
- Tanihara H., Hangai M., Sawaguchi S., Abe H., Kageyama M., Nakazawa F., Shirasawa E., Honda Y. (1997) "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma". *Arch Ophthalmol* 115(6):752-756.
- Tezel G. (2006) "Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences". *Prog Retin Eye Res* 25(5):490-513.
- Tezel G. (2008) "TNF-alpha signaling in glaucomatous neurodegeneration". *Prog Brain Res* 173(409-421).
- Tezel G. (2011) "The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress". *Exp Eye Res* 93(2):178-186.
- Tezel G. (2013) "Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma". *Curr Opin Pharmacol* 13(1):23-31.
- Tezel G., Chauhan B. C., LeBlanc R. P., Wax M. B. (2003) "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7):3025-3033.
- Tezel G., Edward D. P., Wax M. B. (1999) "Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma". *Arch Ophthalmol* 117(7):917-924.
- Tezel G., Fourth A. P. O. R. I. C. W. G. (2009) "The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(3):1001-1012.
- Tezel G., Kass M. A., Kolker A. E., Becker B., Wax M. B. (1997) "Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma". *J Glaucoma* 6(2):83-89.
- Tezel G., Li L. Y., Patil R. V., Wax M. B. (2001) "TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous

- eyes". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(8):1787-1794.
- Tezel G., Seigel G. M., Wax M. B. (1998) "Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(12):2277-2287.
- Tezel G., Wax M. B. (2000a) "Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells". *J Neurosci* 20(23):8693-8700.
- Tezel G., Wax M. B. (2000b) "The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells". *J Neurosci* 20(10):3552-3562.
- Tezel G., Wax M. B. (2004) "The immune system and glaucoma". *Curr Opin Ophthalmol* 15(2):80-84.
- Tezel G., Yang X., Luo C., Kain A. D., Powell D. W., Kuehn M. H., Kaplan H. J. (2010) "Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(10):5071-5082.
- Tezel G., Yang X., Luo C., Peng Y., Sun S. L., Sun D. (2007) "Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(2):705-714.
- Thornberry N. A., Lazebnik Y. (1998) "Caspases: enemies within". *Science* 281(5381):1312-1316.
- Tielsch J. M., Sommer A., Katz J., Royall R. M., Quigley H. A., Javitt J. (1991) "Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey". *JAMA* 266(3):369-374.
- To C. H., Kong C. W., Chan C. Y., Shahidullah M., Do C. W. (2002) "The mechanism of aqueous humour formation". *Clin Exp Optom* 85(6):335-349.
- Tokumura A., Majima E., Kariya Y., Tominaga K., Kogure K., Yasuda K., Fukuzawa K. (2002) "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase". *J Biol Chem* 277(42):39436-39442.
- Torres G. E., Egan T. M., Voigt M. M. (1999) "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners". *J Biol Chem* 274(10):6653-6659.
- Torres G. E., Haines W. R., Egan T. M., Voigt M. M. (1998) "Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel". *Mol Pharmacol* 54(6):989-993.
- Toth-Zsomboki E., Oury C., Watanabe H., Nilius B., Vermylen J., Hoylaerts M. F. (2002) "The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function". *FEBS Lett* 524(1-3):15-19.
- Townsend-Nicholson A., King B. F., Wildman S. S., Burnstock G. (1999) "Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors". *Brain Res Mol Brain Res* 64(2):246-254.
- Trachte G. J., Binder S. B., Peach M. J. (1989) "Indirect evidence for separate vesicular neuronal origins of norepinephrine and ATP in the rabbit vas deferens". *Eur J Pharmacol* 164(3):425-433.
- Trivino A., Ramirez J. M., Salazar J. J., Ramirez A. I., Garcia-Sanchez J. (1996) "Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia". *Vision Res* 36(14):2015-2028.
- Tsukita S., Ishikawa H., Kurokawa M. (1981) "Isolation of 10-nm filaments from astrocytes in the mouse optic nerve". *J Cell Biol* 88(1):245-250.
- Uckermann O., Wolf A., Kutzera F., Kalisch F., Beck-Sickinger A. G., Wiedemann P., Reichenbach A., Bringmann A. (2006) "Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y". *J Neurosci Res* 83(4):538-550.
- Umez-Goto M., Kishi Y., Taira A., Hama K., Dohmae N., Takio K., Yamori T., Mills G. B., Inoue K., Aoki J., Arai H. (2002) "Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production". *J Cell Biol* 158(2):227-233.
- Urcola J. H., Hernandez M., Vecino E. (2006) "Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death". *Exp Eye Res* 83(2):429-437.
- Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D. W. (2009) "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family". *Hum Genomics* 3(3):281-290.
- Verhoef P. A., Estacion M., Schilling W., Dubyak G. R. (2003) "P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1

- beta release". *J Immunol* 170(11):5728-5738.
- Verwey N. A., Schuitemaker A., van der Flier W. M., Mulder S. D., Mulder C., Hack C. E., Scheltens P., Blankenstein M. A., Veerhuis R. (2008) "Serum amyloid p component as a biomarker in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease". *Dement Geriatr Cogn Disord* 26(6):522-527.
- Vessey K. A., Fletcher E. L. (2012) "Rod and cone pathway signalling is altered in the P2X7 receptor knock out mouse". *PLoS One* 7(1):e29990.
- Vial C., Roberts J. A., Evans R. J. (2004) "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels". *Trends Pharmacol Sci* 25(9):487-493.
- Vickers J. C., Lazzarini R. A., Riederer B. M., Morrison J. H. (1995) "Intraperikaryal neurofilamentous accumulations in a subset of retinal ganglion cells in aged mice that express a human neurofilament gene". *Exp Neurol* 136(2):266-269.
- Vidal-Sanz M., Bray G. M., Aguayo A. J. (1991) "Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons". *J Neurocytol* 20(11):940-952.
- Vidal-Sanz M., Bray G. M., Villegas-Perez M. P., Thanos S., Aguayo A. J. (1987) "Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat". *J Neurosci* 7(9):2894-2909.
- Vidal-Sanz M., Lafuente M., Sobrado-Calvo P., Selles-Navarro I., Rodriguez E., Mayor-Torroglosa S., Villegas-Perez M. P. (2000) "Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury". *Neurotox Res* 2(2-3):215-227.
- Vidal-Sanz M., Lafuente M. P., Mayor S., de Imperial J. M., Villegas-Perez M. P. (2001) "Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists". *Surv Ophthalmol* 45 Suppl 3(S261-267; discussion S273-266).
- Vidal-Sanz M., Salinas-Navarro M., Nadal-Nicolas F. M., Alarcon-Martinez L., Valiente-Soriano F. J., de Imperial J. M., Aviles-Trigueros M., Agudo-Barriuso M., Villegas-Perez M. P. (2012) "Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas". *Prog Retin Eye Res* 31(1):1-27.
- Vidal-Sanz M., Villegas-Perez M. P., Bray G. M., Aguayo A. J. (1988) "Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil". *Exp Neurol* 102(1):92-101.
- Villegas-Perez M. P., Lawrence J. M., Vidal-Sanz M., Lavail M. M., 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(1):58-77.
- Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Bray G. M., Aguayo A. J. (1988) "Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats". *J Neurosci* 8(1):265-280.
- Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Lund R. D. (1996) "Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy". *Neuroreport* 7(12):1995-1999.
- Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Bray G. M., Aguayo A. J. (1993) "Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats". *J Neurobiol* 24(1):23-36.
- Villemagne V. L., Pike K. E., Darby D., Maruff P., Savage G., Ng S., Ackermann U., Cowie T. F., Currie J., Chan S. G., Jones G., Tochon-Danguy H., O'Keefe G., Masters C. L., Rowe C. C. (2008) "A beta deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease". *Neuropsychologia* 46(6):1688-1697.
- Virginio C., Church D., North R. A., Surprenant A. (1997) "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor". *Neuropharmacology* 36(9):1285-1294.
- Virginio C., MacKenzie A., Rassendren F. A., North R. A., Surprenant A. (1999) "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels". *Nat Neurosci* 2(4):315-321.
- Viswanathan S., Frishman L. J., Robson J. G., Walters J. W. (2001) "The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2):514-522.
- Vollmayer P., Clair T., Goding J. W., Sano K., Servos J., Zimmermann H. (2003) "Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases". *Eur J Biochem* 270(14):2971-2978.
- von Kugelgen I., Starke K. (1991) "Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344(4):419-429.

- Wachtmeister L. (1998) "Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal". *Prog Retin Eye Res* 17(4):485-521.
- Wang J. J., Mitchell P., Smith W. (1997) "Is there an association between migraine headache and open-angle glaucoma? Findings from the Blue Mountains Eye Study". *Ophthalmology* 104(10):1714-1719.
- Wang L., Andersson M., Karlsson L., Watson M. A., Cousens D. J., Jern S., Erlinge D. (2003a) "Increased mitogenic and decreased contractile P2 receptors in smooth muscle cells by shear stress in human vessels with intact endothelium". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(8):1370-1376.
- Wang L., Cioffi G. A., Cull G., Dong J., Fortune B. (2002) "Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(4):1088-1094.
- Wang W. H., Millar J. C., Pang I. H., Wax M. B., Clark A. F. (2005) "Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(12):4617-4621.
- Wang X., Tay S. S., Ng Y. K. (2000) "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma". *Exp Brain Res* 132(4):476-484.
- Wang Y., Chang C. F., Morales M., Chiang Y. H., Harvey B. K., Su T. P., Tsao L. I., Chen S., Thiernemann C. (2003b) "Diadenosine tetraphosphate protects against injuries induced by ischemia and 6-hydroxydopamine in rat brain". *J Neurosci* 23(21):7958-7965.
- Wang Y. C., Cui Y., Cui J. Z., Sun L. Q., Cui C. M., Zhang H. A., Zhu H. X., Li R., Tian Y. X., Gao J. L. (2015) "Neuroprotective effects of brilliant blue G on the brain following traumatic brain injury in rats". *Mol Med Rep* 12(2):2149-2154.
- Ward M. M., Puthussery T., Fletcher E. L. (2008) "Localization and possible function of P2Y(4) receptors in the rodent retina". *Neuroscience* 155(4):1262-1274.
- Watts D. T. (1953) "Stimulation of uterine muscle by adenosine triphosphate". *Am J Physiol* 173(2):291-296.
- Wax M. B., Tezel G. (2002) "Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection". *Mol Neurobiol* 26(1):45-55.
- Wax M. B., Tezel G. (2009) "Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma". *Exp Eye Res* 88(4):825-830.
- Wax M. B., Tezel G., Saito I., Gupta R. S., Harley J. B., Li Z., Romano C. (1998) "Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma". *Am J Ophthalmol* 125(2):145-157.
- Weber A., Westhead E. W., Winkler H. (1983) "Specificity and properties of the nucleotide carrier in chromaffin granules from bovine adrenal medulla". *Biochem J* 210(3):789-794.
- Weishaupt J. H., Klocker N., Bahr M. (2005) "Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells". *J Mol Neurosci* 26(1):17-25.
- Weisman G. A., Camden J. M., Peterson T. S., Ajit D., Woods L. T., Erb L. (2012) "P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of P2X7 and P2Y(2) receptor interactions in neuroinflammation". *Mol Neurobiol* 46(1):96-113.
- Werb Z. (1997) "ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology". *Cell* 91(4):439-442.
- Wessendorf M. W. (1991) "Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake". *Brain Res* 553(1):135-148.
- Weston C. R., Davis R. J. (2007) "The JNK signal transduction pathway". *Curr Opin Cell Biol* 19(2):142-149.
- Wheeler-Schilling T. H., Marquardt K., Kohler K., Guenther E., Jabs R. (2001) "Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells". *Brain Res Mol Brain Res* 92(1-2):177-180.
- Wheeler-Schilling T. H., Marquardt K., Kohler K., Jabs R., Guenther E. (2000) "Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina". *Brain Res Mol Brain Res* 76(2):415-418.
- Wiederholt M. (1998) "Nitric oxide and endothelin in aqueous humor outflow regulation". En: "Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma" (Haefliger, I. O., Flammer, J.), pp 168 - 177 New York: Lippincott-Raven.
- Wildman S. S., Brown S. G., Rahman M., Noel C. A., Churchill L., Burnstock G., Unwin R. J., King B. F. (2002) "Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared

- with rat P2X(1)". *Mol Pharmacol* 62(4):957-966.
- Wilson G. N., Inman D. M., Denger-Criss C. M., Smith M. A., Criss S. D. (2015) "Early pro-inflammatory cytokine elevations in the DBA/2J mouse model of glaucoma". *J Neuroinflammation* 12(1):176.
- Wilson K. P., Black J. A., Thomson J. A., Kim E. E., Griffith J. P., Navia M. A., Murcko M. A., Chambers S. P., Aldape R. A., Raybuck S. A., et al. (1994) "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme". *Nature* 370(6487):270-275.
- WoldeMussie E., Ruiz G., Wijono M., Wheeler L. A. (2001) "Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(12):2849-2855.
- Woldemussie E., Wijono M., Ruiz G. (2004) "Muller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats". *Glia* 47(2):109-119.
- Worthington R. A., Smart M. L., Gu B. J., Williams D. A., Petrou S., Wiley J. S., Barden J. A. (2002) "Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function". *FEBS Lett* 512(1-3):43-46.
- Wuerker R. B., Kirkpatrick J. B. (1972) "Neuronal microtubules, neurofilaments, and microfilaments". *Int Rev Cytol* 33(45-75).
- Wurm A., Lipp S., Pannicke T., Linnertz R., Krugel U., Schulz A., Farber K., Zahn D., Grosse J., Wiedemann P., Chen J., Schoneberg T., Illes P., Reichenbach A., Bringmann A. (2010) "Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells". *J Neurochem* 112(5):1261-1272.
- Wyllie A. H. (1988) "Apoptosis". *ISI Atlas of Science Immunology* 1(192 - 196).
- Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. (1980) "Cell death: the significance of apoptosis". *Int Rev Cytol* 68(251-306).
- Xiang M., Zhou L., Macke J. P., Yoshioka T., Hendry S. H., Eddy R. L., Shows T. B., Nathans J. (1995) "The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons". *J Neurosci* 15(7 Pt 1):4762-4785.
- Xiang M., Zhou L., Peng Y. W., Eddy R. L., Shows T. B., Nathans J. (1993) "Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells". *Neuron* 11(4):689-701.
- Yamamoto R., Yoneda S., Hara H. (2004) "Neuroprotective effects of beta-secretase inhibitors against rat retinal ganglion cell death". *Neurosci Lett* 370(1):61-64.
- Yan X., Tezel G., Wax M. B., Edward D. P. (2000) "Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head". *Arch Ophthalmol* 118(5):666-673.
- Yang J., Patil R. V., Yu H., Gordon M., Wax M. B. (2001a) "T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma". *Am J Ophthalmol* 131(4):421-426.
- Yang J., Tezel G., Patil R. V., Romano C., Wax M. B. (2001b) "Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6):1273-1276.
- Yang J., Yang P., Tezel G., Patil R. V., Hernandez M. R., Wax M. B. (2001c) "Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2):365-371.
- Yang X., Luo C., Cai J., Powell D. W., Yu D., Kuehn M. H., Tezel G. (2011) "Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to TNF-alpha/TNFR1 signaling in the glaucomatous human retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(11):8442-8454.
- Yankner B. A. (1996) "Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease". *Neuron* 16(5):921-932.
- Yazulla S., Studholme K. M. (2004) "Vanilloid receptor like 1 (VRL1) immunoreactivity in mammalian retina: colocalization with somatostatin and purinergic P2X1 receptors". *J Comp Neurol* 474(3):407-418.
- Yoneda S., Hara H., Hirata A., Fukushima M., Inomata Y., Tanihara H. (2005) "Vitreous fluid levels of beta-amyloid((1-42)) and tau in patients with retinal diseases". *Jpn J Ophthalmol* 49(2):106-108.
- Young D. B. (1992) "Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity". *Curr Opin Immunol* 4(4):396-400.
- Yuan L., Neufeld A. H. (2000) "Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head". *Glia* 32(1):42-50.
- Yuan L., Neufeld A. H. (2001) "Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head". *J Neurosci Res* 64(5):523-532.
- Zhang M., Budak M. T., Lu W., Khurana T. S., Zhang X., Laties A. M., Mitchell C. H. (2006) "Identification of the A3 adenosine

- receptor in rat retinal ganglion cells". *Mol Vis* 12(937-948).
- Zhang W., Liu H. T. (2002) "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells". *Cell Res* 12(1):9-18.
- Zhang X., Cheng M., Chintala S. K. (2004) "Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7):2374-2383.
- Zhang X., Zhang M., Laties A. M., Mitchell C. H. (2005) "Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca²⁺ and kills retinal ganglion cells". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6):2183-2191.
- Zhou X., Li F., Kong L., Tomita H., Li C., Cao W. (2005) "Involvement of inflammation, degradation, and apoptosis in a mouse model of glaucoma". *J Biol Chem* 280(35):31240-31248.
- Zimmermann H. (1996) "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system". *Prog Neurobiol* 49(6):589-618.
- Zimmermann H. (2000) "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362(4-5):299-309.
- Zimmermann H., Mishra, S. K., Shukla, V., Langer, D., Gampe, K., Grimm, I., Delic, J. and Braun, N. (2007) "Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact". *Journal An R Acad Nac Farm* 73(2):1-30.

FE DE ERRATAS

Tesis Doctoral:

“Caracterización de un modelo murino de glaucoma. Implicación funcional de la señalización del receptor P2X7 en procesos neurodegenerativos de la retina”

Página 17: En el párrafo 2 línea 7, **sustituir:**

*...Como resultado, ya no se pueden mantener abiertos los canales de Na⁺ activados por GMPc y dejan entrar iones...por: ...Como resultado, ya no se pueden mantener abiertos los canales de Na⁺ activados por GMPc y dejan **de** entrar iones...*

Página 39: En la última línea del párrafo 4, **sustituir:**

...se detectaron placas β -amiloide, encontradas principalmente en las capas plexiformes y se detectaron un número mucho menor de placas en CPI, CGR y CNE...por: ...se detectaron placas β -amiloide, encontradas principalmente en las capas plexiformes y se detectaron un número mucho menor de placas en CGR y CNE.

Página 46: En la *tabla I* en familia de ecto-NPPasas sustituir $Np_{n-1}N$ por Np_{n-1} .

Página 119: En el párrafo 1 en lugar de *tabla XIV* se trata de la *tabla XVI*.

Página 122: En la última frase en lugar de *tabla XVI* se trata de la *tabla XIII* y *XIV*.

Página 132: En la última frase en lugar de *figura 7* se trata de la *figura 8*.

Página 180: En el párrafo 2 línea 7, se trata de la *figura 32B* en lugar de la *figura 33B*.

Página 161: En la *figura 16* **sustituir** ONL (del inglés “outer nuclear layer”) por CNE (capa nuclear externa), OPL (del inglés “outer plexiform layer”) por CPE (capa plexiforme externa), INL (del inglés “inner nuclear layer”) por CNI (capa nuclear interna), IPL (del inglés “inner plexiform layer”) por CPI (capa plexiforme interna) y GCL (del inglés “ganglion cell layer”) por CCG (capa células ganglionares).

Página 165: En la *figura 20* **sustituir** GCL (del inglés “ganglion cell layer”) por CCG (capa de células ganglionares).

Página 166: En la *figura 21* marcadores de peso molecular para VNUT (sustituir 75 por 68 kDa) y GAPDH (37 kDa) desplazados de la posición correcta.

Página 168: En la *figura 23* marcadores de peso molecular para NPP1 (150 kDa) y GAPDH (37 kDa) desplazados de la posición correcta.

Página 163: La imagen correspondiente al ratón C57BL/6J (15 meses) no corresponde a este ratón si no al ratón DBA/2J (3 meses). Error en la maquetación de la figura pero el marcaje observado en este estadio se mantiene.

Página 175: *Párrafo 2* repetido.

Página 180: En el *párrafo 2 línea 5*, **sustituir:**

...una pendiente prácticamente nula, aunque un alto grado de correlación; lo que tomado en conjunto...por: ...una pendiente prácticamente nula, con una baja correlación; lo que tomado en conjunto...

Página 196: En el pie de la *figura 46* no se indica la concentración de 1 μ M de A43.

Página 199: En el pie de la *figura 48* los ratones control corresponden a los ratones DBA/2J “no tratados” en lugar de ratones C57BL/6J y n=10 tal y como se indica en el texto.

Página 227: En el *párrafo 2 línea 3* **sustituir** IPL (del inglés “inner plexiform layer”) por CPI (capa plexiforme interna) y GCL (del inglés “ganglion cell layer”) por CCG (capa células ganglionares).

Página 230: En la *línea 12 página 230* **sustituir** GCL (del inglés “ganglion cell layer”) por CCG (capa células ganglionares)