

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Alteraciones neuronales y gliales asociadas al tratamiento con  
el quimioterápico Cisplatino: abordajes terapéuticos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Beatriz Martín Sánchez**

**DIRIGIDA POR**

**Eva M. Marco López**

**Alberto Lázaro Fernández**

**Meritxell López-Gallardo**

**Madrid**

**© Beatriz Martín Sánchez, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

ALTERACIONES NEURONALES Y GLIALES ASOCIADAS AL TRATAMIENTO CON  
EL QUIMIOTERÁPICO CISPLATINO: ABORDAJES TERAPÉUTICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

BEATRIZ MARTÍN SÁNCHEZ

DIRECTORES

DRA. EVA MARIA MARCO LÓPEZ  
DR. ALBERTO LÁZARO FERNÁNDEZ  
DRA. MERITXELL LÓPEZ GALLARDO



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



## **TESIS DOCTORAL**

# Alteraciones neuronales y gliales asociadas al tratamiento con el quimioterápico Cisplatino: Abordajes terapéuticos

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR PRESENTADA POR  
BEATRIZ MARTÍN SÁNCHEZ

DIRECTORES

DRA. EVA MARÍA MARCO LÓPEZ

DR. ALBERTO LÁZARO FERNÁNDEZ

DRA. MERITXELL LÓPEZ- GALLARDO





"I gave my blood, sweat and tears for this."

- Taylor Swift

"I like to beat everything, you know? Beat depression, get on with life. Try and beat what I've got."

- Sir Henry Cecil

"It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts."

- Sir Arthur Conan Doyle, Sherlock Holmes



TPWK

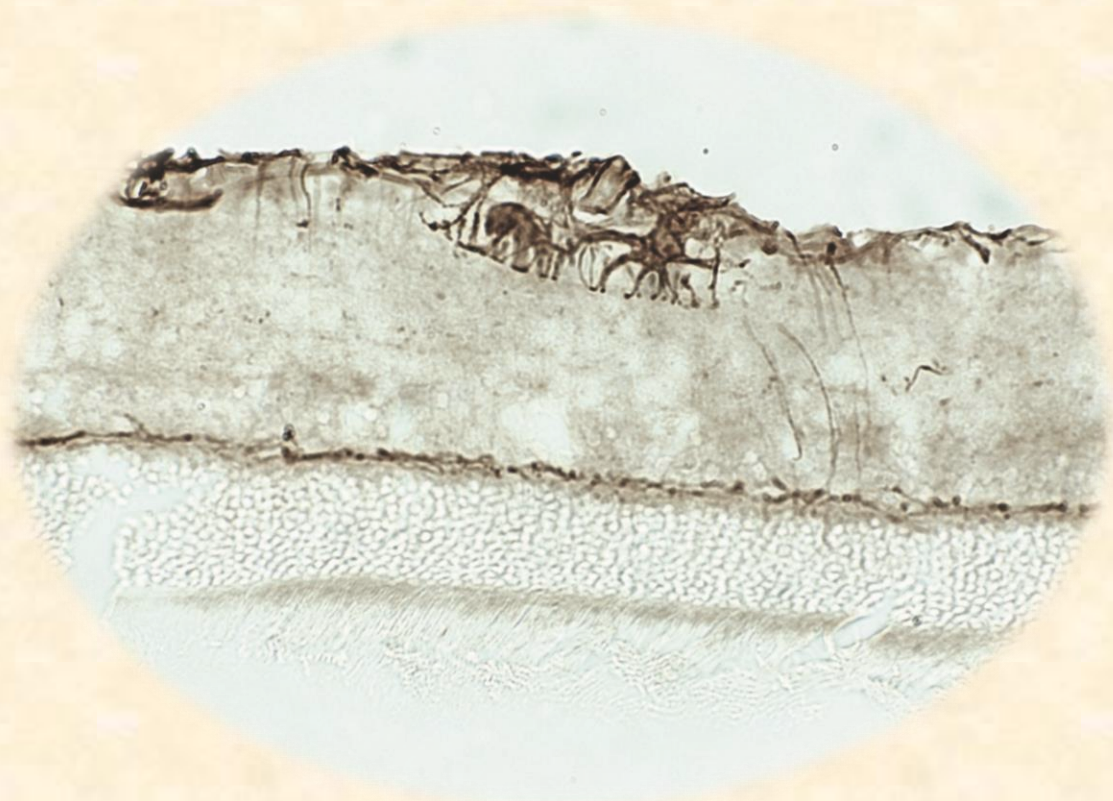
A Nova.

A mi familia elegida.

A los caballos y las ratas.



# AGRADECIMIENTOS



Cuando pensamos en el desarrollo de la tesis nos imaginamos un proceso que solo depende de uno mismo, pero para mí no habría sido posible acabarla si no fuera por el apoyo de amigos, compañeros y familiares. Esta tesis es tan mía como vuestra. A modo de anécdota os compartiré que es hasta cursi decirlo, pero comencé estos agradecimientos en mi segundo año de doctorado y aunque hay partes que han sido modificadas me parece el documento en vivo más fiel de la gente que ha estado siempre, los que se han ido uniendo y de los que ya no siguen en mi vida (de la ausencia también hay que sacar una lección en la vida).

En primer lugar, por supuesto, quería agradecer **a mi grupo de investigación** a los que les debo tanto profesional y personalmente. Lo mejor que me llevo son todos los grandes momentos que hemos pasado juntos, el aprendizaje personal y por supuesto todas y cada una de las veces que me habéis conseguido sacar una sonrisa en los días que no todo iba tan bien.

A mis directores de tesis y tutores, las **Dras. Meritxell López, Eva Marco** y el **Dr. Alberto Lázaro** quiero agradecerles no solo el darme la oportunidad de desarrollar mi doctorado, y formarme como científica si no también el haberme aportado una serie de valores que me voy a llevar de por vida y sobre todo el esfuerzo sobrehumano que han hecho, cuando estábamos hasta las tantas fines incluidos para sacar la tesis adelante. Han moldeado la científica que soy y seré en un futuro, gracias a su buen hacer me han enseñado a mirar siempre por el bien de los animales y la ciencia, una virtud lamentablemente de unos pocos y que luchan a capa y espada. El rigor científico que hoy en día me caracteriza y el toc en el diseño de los Excel se lo debo todo a ellos también (*"I'll be there for you"- The Rembrandts*).

Al **Dr. Ricardo Llorente** le agradezco la alegría que tiene siempre y sus chistes malos, aunque eran muy frustrantes muchas veces. Pero ahí ha estado cuando se le necesitaba para contar microglías o vestirse de romano. Por supuesto como informante también ha hecho sus pinitos, pero es un poco (bastante) malo. *Go chicken go!*

A mi fiel compañero en este viaje que es la tesis, el futuro “**Dr. San Felipe**”, nuestro Dieguis, siempre le tendré que agradecer mucho. Casi 7 años compartiendo día a día tanto los momentos buenos como los peores y aprendiendo mutuamente el uno del otro. Siempre hemos ido de la mano en todo el proceso de doctorandos, compartiendo miles de cafés, inexperiencias, cursos de autocuidado, "robos" de material, vaciles en prácticas de medicina, lotería y hasta frases dichas al unísono sin ensayar. Tu ya sabes todo lo que significas para mí, como hemos sido apoyo y consuelo el uno del otro cuando nos ha hecho falta y como espero que sigamos siéndolo. ¡Ayyyy mi Dieguis, *yo era ateo, pero ahora creo!*

A los peques del laboratorio **Sara y Miguel** gracias por ser los proveedores oficiales de Manolitos del laboratorio y los mayores angustias y dramas del laboratorio. Sara mi compi de stylismo y Mike el de los sándwiches odiosos, gracias por dejarme enseñaros todo lo que he podido en el laboratorio y fuera de él, por todos los buenos momentos, los viajes juntos y todas las diversiones y risas. Dejadme que os dé un último consejo predoctoral, ¡todos llegamos a los 30! (“*Treat People With Kindness*”- *Harry Styles*).

A los **compis**, gracias por todos los momentos compartidos, que espero y deseo que continúen en el futuro. A Elena, Lara y Deivid, por todos los momentos de sabiduría y risas y los tardeos en Moncloa, espero poder brindar con vosotras ese día, pero por favor sin Larios dose.

Gracias también a la **Dra. Marian González**, por toda la ayuda que me ha ofrecido en mis modelos de tesis y en todo lo que he ido necesitando. Deseo que en el futuro continúen la investigación y los éxitos y al grupo del **Instituto Castroviejo** por ayudarme en estos años de tesis y en especial a la Dra. Elena Salobar por su inestimable ayuda en la realización de las OCTs.

Este último año de tesis he tenido la oportunidad de trabajar como docente en la UEM y no quería dejar de agradecerles a todos mis compañeros la gran ayuda y apoyo que me han dado en este año de supervivencia. Gracias a la **Dra. Anabel Rodríguez** por confiar en mí y a **todo el personal docente de la pradera** por ofrecerme toda la ayuda posible, en especial a mis compis y amigos **Fran y Cris** y a mi compañera de asignatura **Esmeralda**, gracias por tu creatividad.

También me gustaría agradecer a todos los que han pasado por el laboratorio; pero, en especial a mi **Marians** que me enseñó a hacer inmunes y del que solo espero que siga siendo la alegría de la huerta hoy, mañana y siempre, y por supuesto a mi queridísima **Dra. Marta Moya**. El verano de 2019 en el animalario fue el mejor de mi vida. Te lo dije en tu tesis y me repito hoy, eres el espejo en el que me miro diariamente. No cambies nunca porque eres muy tú y hoy en día es difícil poder decir eso de alguien.

Agradecer también al departamento de fisiología de la facultad de medicina por todo lo que me habéis enseñado en las prácticas y por supuesto, a **Dani** cuya ayuda ha facilitado una y mil veces nuestro trabajo.

Como científica quisiera hacer un pequeño homenaje a mi recorrido académico y profesional y es por ello por lo que me gustaría agradecer brevemente a todas las personas que me han inculcado su pasión por la docencia y la investigación a lo largo de mi carrera: **Juan Carlos, Eva, Dr. Jesús Martín Freire y Dr. Guillermo Bodega Magro**. También agradecer a los grupos en los que he ido trabajando como son el **grupo de Células pluripotentes del CNIC** (Gracias Giovanna, Elisa, Nines y Carles) y el **HM Sanchinarro** (Gracias al laboratorio de genética, al personal de tardes de Abacid y a los comerciales). En especial a **Mar** que fue como mi madre en el HM Sanchinarro y con la que trabajar era siempre un verdadero placer y al **Señor César**, que es el más grande que he conocido jamás. No me he divertido trabajando de noche tantísimo como nuestras noches compartidas con sándwiches de máquina, empanada y el Real Madrid. Quedan pendientes unas cañitas y más conversaciones filosóficas.

Por último, no quiero olvidarme del **Dr. Alberto Tejedor**. No coincidimos demasiado, pero me consta que era una bellísima persona y un investigador muy generoso, capaz de inculcar su pasión por la ciencia a los estudiantes. Su legado está bien asegurado gracias a su grupo de investigación y a su hija la **Dra. Marta Tejedor** a la que quiero extrapolar todo lo dicho previamente de su padre.

Quisiera agradecer también a mis compis de juegos de estos años, **Josean, Josh, Carlos, Jorge y Moni** por todas las celebraciones compartidas y por seguir contando conmigo en ellas; a **Mak y Dani** (y al pequeño “*spiderman*”) por abrirme las puertas de vuestro hogar y al **grupo de teatro Plas-Plas**, por darme tablas para que hablar en público no me suponga tanto trauma. A **Judith** que entiende perfectamente mis quebraderos de cabeza y me ayuda a valorarme más.

Y por supuesto, a la gente del hipódromo, que domingo tras domingo me han hecho desconectar de la rutina. Gracias a **toda la gente buena** del hipódromo de Madrid, Paulita, Conchita, Dito, Rojanillo, etc; al **team Caviar** por presentarme a personas maravillosas y dejarme escribir mis primeros artículos de neófita en el Turf; a mi **cuadra Bernardo**, Alvarito e Inés, que desde el primer minuto me unió al mundillo turfero y que no dudan en prestar su ayuda aun cuando no saben ni lo que hay que hacer; y a los **propis de Belle Luchy**, que espero que disfruten de muchos éxitos. Y, ¿cómo no voy a hacer mención a la persona más sincera y generosa que he conocido en mucho tiempo? el **Sr. Antonio Rojano**. Gracias por tu cercanía y tu simpatía, por acogerme y aceptarme como una más siempre sin filtro alguno. De corazón te digo que no hay regalos suficientes para pagar lo valorada, apreciada y “en familia” que me has hecho sentir, no tengo palabras para expresar tanta gratitud. Por último, NO podía olvidarme ni de broma de mi otra cuadra favorita, **Cielo de Madrid** y de sus propietarios **Julián y Paz**, muchas gracias por todo y que sigan los éxitos, a por otros 40 años de Turf tocando el cielo de Madrid; y a mis chicos fav: **Pablo, Álvaro y Julián**. Gracias por los veranos de Carudel y Panthera y por nuestras muchas historietas. Pero en especial gracias por escucharme hablar de mis ratas, mi laboratorio y mis caballos durante horas y por aguantarme, que no es poco (*“Memories I hold to keep safe. And I love to love you, for God's sake”-5 Seconds of Summer*).

En penúltimo lugar me gustaría agradecer a mi **familia**, por guiar los pasos que me han hecho ser yo misma; a mis **padres**, por todos los sacrificios que han hecho por mí y por toda la ayuda que me han ofrecido cuando me ha hecho falta y por cuidar y querer tanto a Nova; a mi **hermano**, por sus buenos consejos y su saber vivir la vida, a mis **primos** y **tíos** que me hacen pasar vergüenza de vez en cuando, pero mucha felicidad casi siempre; y a los **peques de la familia**, que me recuerdan día a día que la ilusión y la imaginación son cosas que no se deben dar por sentado nunca (*“I can't wait to go home”-Ed Sheeran*). Y en especial a mis **abuelos**, por dejarme una huella irremplazable. No hay un solo día que no os recuerde. Espero que allá donde estéis, los cuatro os sintáis muy orgullosos de mí y que sigáis guiando mis pasos donde quiera que me lleven (*“Abuelo”- Huecco*).

Como no podría ser de otra manera y con permiso de mi familia me gustaría cerrar estos agradecimientos con unas palabras a mi otra familia, que me demuestran diariamente lo que es el amor incondicional. Sin vosotros no habría seguido adelante en muchas ocasiones. Me siento especialmente afortunada de tener la oportunidad de devolveros un poquito de vuestro cariño.

A mis pilares de apoyo: a **Cris**, quiero darle las gracias por darme fuerza en un momento personal muy difícil y por marcarme de por vida literal y metafóricamente y a **Natalia**, que siempre está dispuesta a apoyarme y a una sesión de terapia gratuita. Parece que no, pero todos esos días tostándonos y helándonos en Valdebebas han hecho de esta amistad una larga y duradera. Os quiero muchísimo a ambas (*“I had the time of my life fighting dragons with you” - Taylor Swift*).

A **Sole**, mi consejera argentina, que siempre ha estado ayudándome a darle otro punto de vista a la vida. Ojalá tener tu capacidad de Ave Fénix de adaptarme y resurgir de los malos momentos. Gracias no solo por enseñarme todo lo que sabes de caballos, sino también por las tardes de terapia gratuita a lomos de un caballo. Quiero compartir de nuevo algo especial contigo, hoy esta sección que creía que estaba completa la he reescrito para poder agradecerte la vuelta a la calma que me has dado con Gallo después de uno de los peores días de mi vida. Gracias por todo y sobre todo gracias por presentarme al mejor caballo del mundo, nuestro angelito Xaro y a la perra cariñosa y loca destructora de coches que es **Oliagu** (*“It’s nice to have a friend” - Taylor Swift*).

A mis dos estrellas del cielo, mi primer caballo un cabezota vago que sacaba todo su motor con orgullo cuando menos lo esperabas y que semana tras semana fue mi terapia, **Xaro** y mi primera yegua que para mí ha sido muy especial con nuestras “charlas” y lo que me ha curado solo con estar juntas, **Charra**. Y como no, a todos y cada uno de los caballos que he ido conociendo durante este tiempo (aunque a Catapum no le tengo demasiado amor jajaja): Jiqui, los Tangos, Mayo, Comanche, Lía, Conguito, Olaf, Junco (a ti si te perdono), Flecha, Pantoja, Gallo, etc. (*“There is something about the outside of a horse that is good for the inside of a man” - Winston Churchill*).

Last and definitely not least, a mi hamstercillo, **Rafita**. Jamás en mi vida podré tener mayor suerte que la que tuve cuando te conocí (allá por los tiempos del COVID, cuando empecé la tesis) y es que desde entonces has estado en cada momento de mi vida compartiendo mis logros y mis fallos, mis quejas, mis alegrías y mis llantos, mis muchísimos llantos. Mi *partner in crime* en el Panthera, en el Carudel, en el ECI, en la tienda de patitos, en el veterinario y hasta en el descampado rodeado de perros si hace falta (que había que verte en ese ambiente jajaja). No te voy a descubrir nada si te digo que te quiero lo indescriptible y que para mí eres único, “rocoso” y especial. Te voy a plagiar la frase, no quisiera ponerme novelesca, pero deseo de corazón que sigamos acompañándonos mutuamente en todos nuestros éxitos y fracasos siglos y siglos. Gracias por ser y estar siempre (*“I’ll spend forever, wondering if you knew, I was enchanted to meet you” - Taylor Swift*).

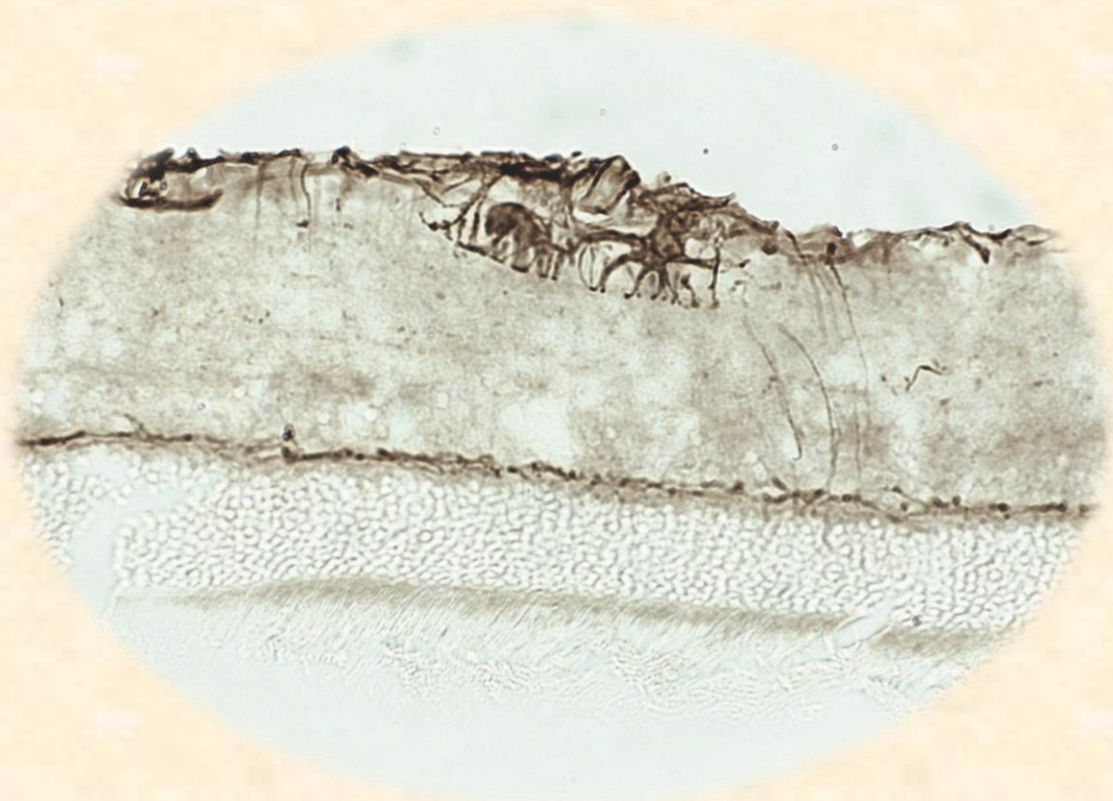
Por supuesto debía dedicarle el último párrafo de estos agradecimientos de tesis a mi puerra: **Novita**. Gracias por darme todo a cambio de nada. Para algunos puede ser solo un perro, pero para mí es mi *Ohana* (*“Wherever I go, you bring me home” - Harry Styles*).

Para acabar me gustaría dar las gracias a los animales de investigación. Posiblemente el pilar más importante de los avances científicos. Espero y deseo que en el futuro la tecnología avance lo suficiente como para poder dejaros tranquilas. Gracias por dar vuestra vida por “nosotros”.

*Muchas gracias a todos por creer en mí aun cuando ni yo misma lo hacía.*

*Beatriz*

# ÍNDICE



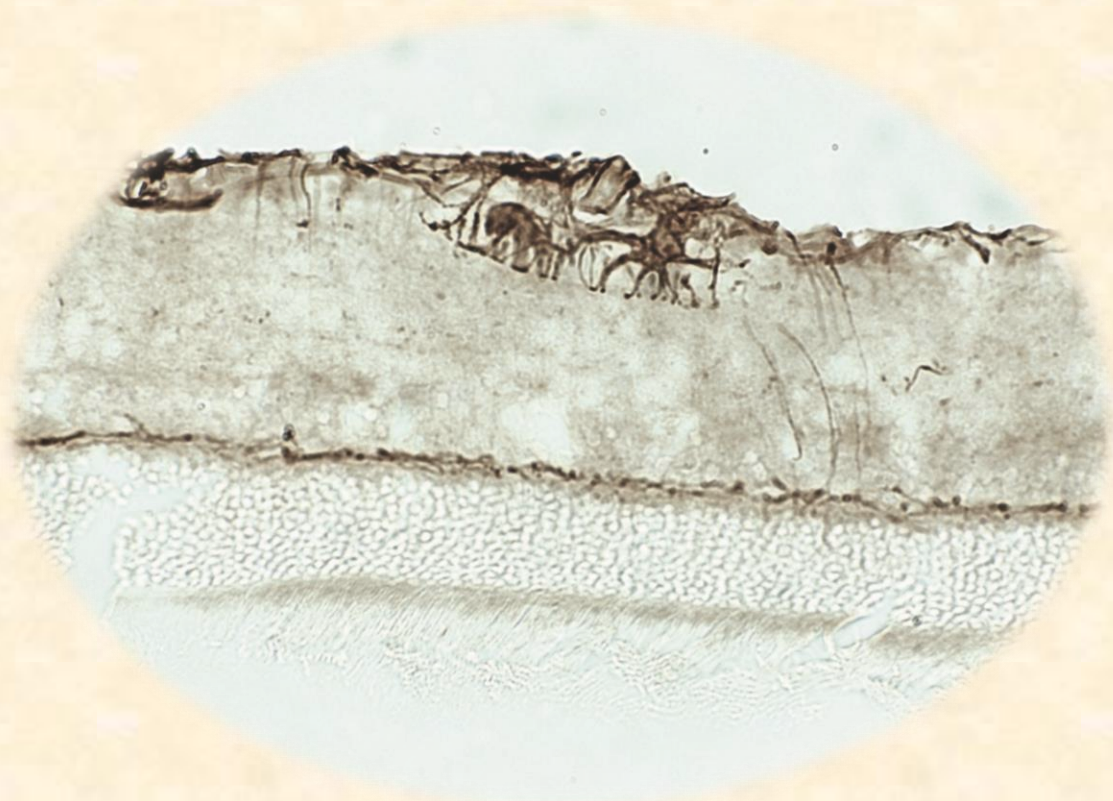
# ÍNDICE

## Abreviaturas

Resumen	7
Abstract	13
Introducción	19
1. Procesamiento de la información visual	19
1.1. La retina	23
1.2. La vía visual en roedores	34
1.3. Colículo Superior	38
1.4. Núcleo Geniculado Lateral	45
1.5. Corteza Visual Primaria	52
2. Tratamiento con quimioterápicos	59
2.1. Cisplatino	59
2.2. Mecanismo de acción	60
2.3. Efectos adversos	62
2.3. Neurotoxicidad	63
2.5. Modelos preclínicos	69
2.6. Fármacos protectores frente a la toxicidad asociada al CIS	72
3. Cilastatina, un fármaco para la prev. del daño asociado al tratamiento con cisplatino	74
3.1. Cilastatina, imipenem y enzima dehidrodipeptidasa renal	74
3.2. Efectos protectores de cilastatina. Estudios preclínicos	75
3.3. Mecanismo de acción de cilastatina	76
3.4. Cil. un prometedor fármaco para su uso en la clínica	77
Estado actual de la cuestión	81
Hipótesis	82
Objetivos	82
Material y métodos	87
1. Animales	87
2. Fármacos	88

2.1. Cisplatino _____	88
2.2. Cilastatina _____	88
3. Diseño experimental _____	89
4. Estudio in vivo: Tomografía de coherencia óptica (TCO) _____	91
5. Obtención de suero sanguíneo y análisis bioquímicos _____	93
6. Obtención de las muestras de tejido _____	94
7. Análisis Inmunohistoquímicos _____	99
7.1. Inmunofluorescencia _____	101
8. Análisis Cuantitativo _____	103
8.1. Espesor de la retina: Datos obtenidos de la TCO _____	103
8.2. Análisis cuant. de los marcadores celulares de retina ____	105
8.3. Análisis cuant. de los marcadores celulares de la vía vis. __	109
9. Colocalizaciones por inmunofluorescencia _____	113
10. Análisis estadísticos _____	113
Resultados _____	117
Evolución del peso corporal _____	117
Parámetros bioquímicos: Función renal _____	119
Estudio in vivo. Resultados de la TCO _____	120
Estudio inmunohistoquímico de la retina _____	123
Análisis de células ganglionares _____	123
Análisis de células macrogliales _____	126
Análisis de células microgliales _____	130
Estudio de la localización de marcadores del inflammasoma en la retina ____	135
Estudio inmunohistoquímico de la vía visual _____	138
Análisis de neuronas _____	138
Análisis de células macrogliales _____	140
Análisis de células microgliales _____	142
Discusión _____	149
Conclusiones _____	171
Bibliografía _____	175
Índice de figuras y tablas _____	195

# ABREVIATURAS



# ABREVIATURAS

A continuación, se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y su definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

- AS1: área sectorial 1
- AS2: área sectorial 2
- BHE: barrera hematoencefálica
- BHR: barrera hematorretiniana
- Brn3a: homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3
- C0: área central
- CGR: células ganglionares de la retina
- CIS: cisplatino
- CIL: Cilastatina
- CS: colículo superior
  - sCS: colículo superior superficial
  - iCS: colículo superior intermedio
  - dCS: colículo superior profundo
  - uSGS: *upper stratum griseum superficiale*
  - lSGS: *lower stratum griseum superficiale*
  - SO: *stratum opticum*
  - SGI: *stratum griseum intermedium*
- D.E.: desviación estándar
- D.O.: densidad óptica
- DHP-I: enzima dehidropeptidasa I
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial
- Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado
- NeuN: proteína de unión a hexaribonucleótidos-3
- NGL: núcleo geniculado lateral
  - dNGL: núcleo geniculado lateral dorsal
  - IGL: folículo intergeniculado
  - vNGL: núcleo geniculado lateral ventral
- NLRP3: dominio pirina 3 de la familia NLR
- NO: nervio óptico

## ABREVIATURAS

---

NUS: nitrógeno ureico en sangre  
ROIS: regiones de interés  
OAT: transportadores de aniones orgánicos  
OCT2: transportador de cationes orgánicos 2  
PFA: paraformaldehído  
SNC: sistema nervioso central  
SNP: sistema nervioso periférico  
TCO: tomografía de coherencia óptica  
TLR4: receptor tipo *Toll* 4  
V1: corteza visual 1ª

### Capas de la retina

CCG: capa de células ganglionares  
CNE: capa nuclear externa  
CPE: capa plexiforme externa  
CNI: capa nuclear interna  
CPI: capa plexiforme interna  
SE: segmento externo

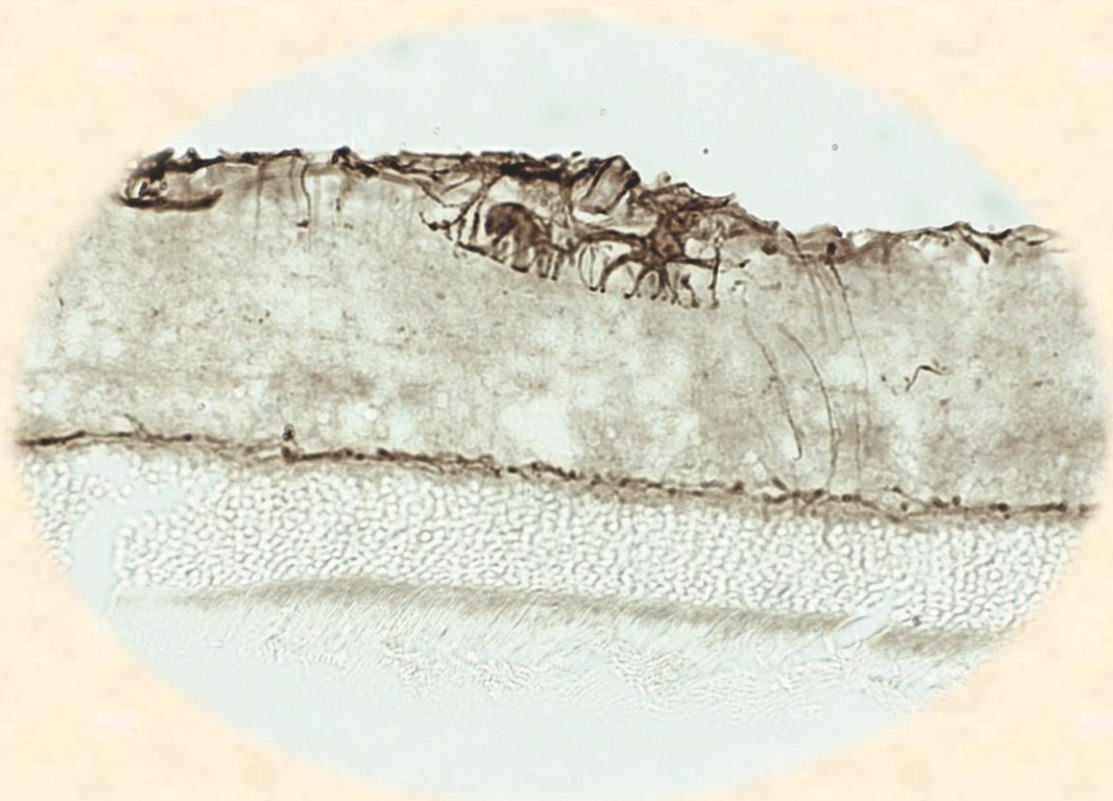
### Áreas de la retina

C: central  
CC: central central  
CI: central inferior  
CS: central superior  
N: nasal  
NC: nasal central  
NI: nasal inferior  
NS: nasal superior  
T: temporal  
TC: temporal central  
TI: temporal inferior  
TS: temporal superior

### Morfotipos microgliales de la retina

HZ: horizontal  
RD: radial  
VT: vertical

# RESUMEN



## **ALTERACIONES NEURONALES Y GLIALES ASOCIADAS AL TRATAMIENTO CON EL QUIMIOTERÁPICO CISPLATINO: ABORDAJES TERAPÉUTICO.**

El cáncer actualmente es la principal causa de muerte a nivel mundial, a pesar de los avances logrados en su tratamiento. El uso de quimioterápicos sigue siendo una estrategia ampliamente empleada, y el cisplatino (CIS) es uno de los fármacos quimioterápicos más utilizados en la clínica en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, principalmente sólidos. La administración de CIS resulta muy efectiva, pero su aplicación está limitada por la toxicidad asociada, fundamentalmente nefrotoxicidad y ototoxicidad. Más recientemente, se han descrito casos de neurotoxicidad, tanto del sistema nervioso periférico como a nivel del sistema nervioso central (SNC), y en los últimos años se han descrito también anomalías en la visión, y en la retina. Actualmente, no existen medidas preventivas eficaces contra la toxicidad del CIS más allá de la reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento, lo cual puede afectar de forma crítica a la evolución del cáncer. Es, por tanto, una necesidad urgente encontrar agentes protectores que prevengan o atenúen los efectos tóxicos asociados al CIS. En este contexto, surge un nuevo fármaco, la cilastatina (CIL), un agente con propiedades nefroprotectoras frente a la toxicidad por CIS, al actuar inhibiendo la enzima DHP-I localizada en las células de los túbulos proximales renales. La CIL ha demostrado importantes propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti apoptóticas a nivel renal; y, más recientemente, en nuestro grupo de investigación, hemos demostrado, por primera vez, que CIL es capaz de ejercer acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras en la retina, en un modelo experimental de glaucoma.

Estas evidencias nos llevaron a plantear la hipótesis de la presente Tesis Doctoral, que el CIS sería capaz de inducir neurotoxicidad a lo largo de toda la vía visual en un modelo animal, y que la CIL será capaz de prevenir y/o revertir el daño que el CIS provoca a nivel del SNC. Para ello, nos planteamos como objetivo general evaluar, en un modelo animal de rata, el posible daño neurotóxico de la administración de una única dosis del agente antineoplásico CIS en el sistema visual, desde la retina a la corteza visual primaria, y analizar en este modelo el potencial efecto protector de la CIL.

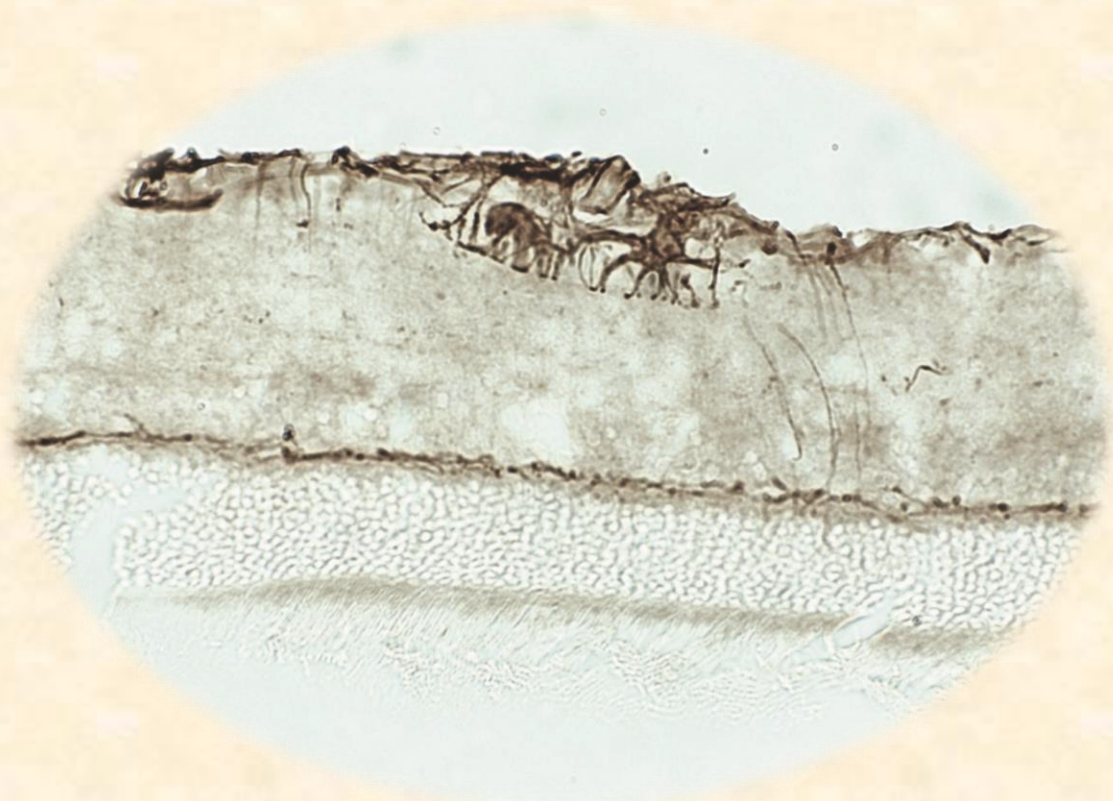
Con este objetivo administramos ratas *Wistar* macho con una dosis única de CIS (5 mg/kg, i.p.), o su VH (salino, 10 ml/kg), y, a continuación, concomitante, CIL (150 mg/kg, i.p.), o su VH (salino, 5ml/kg), que se administró durante un total de 5 días. A continuación, al día siguiente, se realizaron análisis mediante tomografía de coherencia óptica (TCO); se valoraron parámetros de toxicidad renal en suero; se realizaron análisis inmunohistoquímicos sobre las principales poblaciones celulares de la retina y de los principales núcleos de relevo de la vía visual: CS, colículo superior; NGL, núcleo geniculado lateral; y V1, corteza visual primaria; y se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia con el fin de conocer los posibles mecanismos subyacentes centrándonos en el inflammasoma mediado por NLRP3.

En la presente Tesis Doctoral, encontramos que la administración de CIS induce, en nuestro modelo animal, una marcada reducción del peso y fallo renal; la administración repetida de CIL fue capaz de revertir parcialmente la pérdida de peso y bloquear el daño renal asociado. Al evaluar los efectos del CIS en la retina, en el estudio preliminar de TCO encontramos un ligero engrosamiento en la zona más alejada del disco óptico (AS2), lo cual sugiere un posible edema, que fue prevenido y/o atenuado por la administración de CIL. El análisis inmunohistoquímico de la retina permitió describir que el efecto del CIS produjo un descenso de células Brn3a positivas, pero solo en la zona de retina central central y temporal superior; un aumento de la expresión de GFAP en el área nasal central y una disminución en todas las áreas temporales; y el principal efecto se observa fundamentalmente a nivel de las células de microglía cuya expresión se reduce, afectando principalmente a las células de morfología radial. La administración de CIL no modificó los efectos inducidos por la administración de CIS en la retina. En la vía visual el CIS produce una reducción significativa la expresión del marcador neuronal NeuN en la corteza visual primaria, y produce un incremento significativo en la expresión de Iba1 en las células microgliales en el CS y un aumento de células microgliales activas en el CS y la V1. La administración de CIL consiguió atenuar o revertir los efectos inducidos por el CIS en cuanto al número de células microgliales y a su mayor activación en el CS.

La presente Tesis Doctoral nos permite concluir que una única dosis de CIS induce un daño en la retina, que es ya observable mediante la técnica no invasiva de TCO, la cual ofrece una ventana de oportunidad para la evaluación de la retinotoxicidad asociada a la administración de CIS. Este es el primer estudio en el que se demuestra que una única dosis de CIS es capaz de afectar las poblaciones neuronales y microgliales en diversos núcleos de la vía visual. Aunque en estudios futuros será necesario reajustar la dosis de CIS, estos resultados tienen una gran relevancia clínica, ya que sugieren que, incluso a dosis bajas, el CIS puede inducir un daño en la vía visual, que podrá provocar una afectación de la visión. En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que la CIL podría ser un buen abordaje terapéutico para minimizar los efectos inflamatorios inducidos por CIS en los núcleos de relevo analizados de la vía visual, aunque no haya sido capaz de paliar el daño observado a nivel de la retina. En estudios futuros será necesario profundizar en los mecanismos moleculares implicados en estos efectos antiinflamatorios de CIL, y valorar el potencial terapéutico del mismo en otras patologías del SNC.



# ABSTRACT



## **NEURONAL AND GLIAL ALTERATIONS ASSOCIATED WITH TREATMENT WITH THE CHEMOTHERAPY DRUG CISPLATIN: THERAPEUTIC APPROACHES.**

Cancer is currently the leading cause of death worldwide even though great advances have been achieved in its treatment. Chemotherapy remains as one of the most employed anti-cancer strategies, and cisplatin (CIS) emerges as a common chemotherapeutic drug frequently used in the clinic for the management of various types of cancer, mainly solid cancers. Despite the anti-tumoral efficacy of CIS, its use is mostly limited by its associated toxicity, mainly nephrotoxicity and ototoxicity. More recently, CIS-associated neurotoxicity has also been reported, both in the peripheral and the central nervous system (CNS), and visual dysfunction and retinal anomalies have been additionally described. At present, there is no effective strategy to prevent CIS toxicity, but a dose reduction or even treatment disruption, both measures that can have detrimental consequences for the progression of the tumor. Finding protective drugs against CIS-associated toxicity emerges as an urgent clinical need. In this direction, a new drug, cilastatin (CIL), was proposed for the nephroprotective properties against CIS-induced toxicity, probably, by inhibiting the DHP-I enzyme located in renal proximal tubule cells. CIL has demonstrated significant anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic properties at the renal level, and, more recently, we have demonstrated, for the first time, CIL anti-inflammatory and neuroprotective actions in the retina, in an experimental model of glaucoma.

This body of evidence provided support to our hypothesis, that CIS would be able to induce neurotoxicity through the whole visual pathway; and that CIL might be able to prevent and/or reverse such CIS-induced neurotoxicity. Therefore, in the present Doctoral Thesis we aimed to characterize, in a rat animal model, the detrimental consequences of a single dose of the antineoplastic agent CIS in the visual system, from the retina to the primary visual cortex; and to evaluate the potential protective effect of CIL.

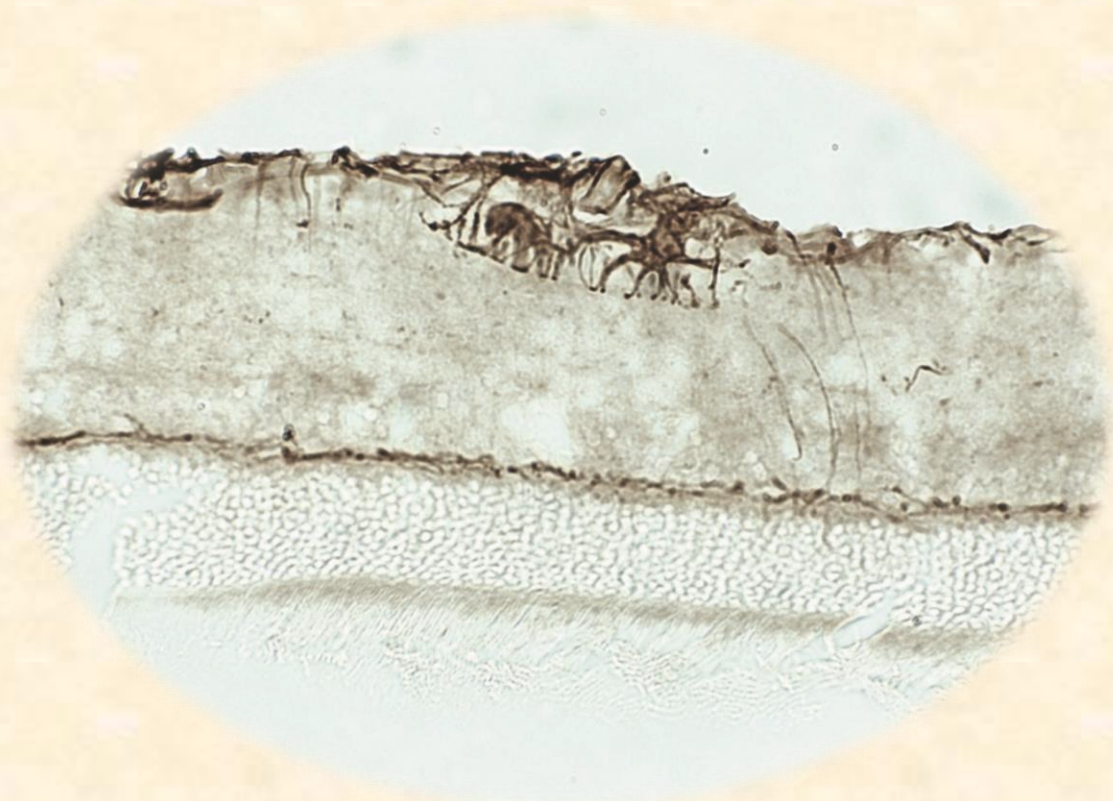
For this purpose, male *Wistar* rats were administered with a single dose of CIS (5 mg/kg, i.p.), or its VH (saline, 10 ml/kg), followed by concomitant CIL (150 mg/kg, i.p.), or its VV (saline, 5ml/kg) administered for a total of 5 days. The following day (24h after the last drug administration) effects were analyzed, in particular, changes measured by optical coherence tomography (OCT); renal toxicity by the analysis of serum parameters; immunohistochemical analyses in which the main cell populations were stained in the retina and in the main relay nuclei of the visual pathway: SC, superior colliculus; LGN, lateral geniculate nucleus; and V1, primary visual cortex; and immunofluorescence studies for the identification of possible underlying mechanisms with a focus on the NLRP3 inflammasome.

In the present Doctoral Thesis, we found that the administration of a single dose of CIS induced, in our animal model, a reduction in body weight and nephrotoxicity, effects that were attenuated and/or blocked by the repeated administration of CIL. In the preliminary OCT study, we found a slight thickening of the retina, in the more distant area from the optic disc (AS2), possibly suggesting an oedema, that was prevented and/or attenuated by CIL administration. The immunohistochemical analysis of the retina showed that CIS induced a decrease in Brn3a-positive cells, only in the central central and superior temporal retinal areas; an increase in GFAP expression in the central nasal area but a decrease in all temporal areas; as well as a generalized reduction of microglia cells that mostly affected those with a radial morphology. CIL administration was not able to modify the CIS-induced retinal damage. In the visual pathway, CIS induced a significant reduction in the expression of the neuronal marker, NeuN, in V1; a remarkable increase in Iba1 expression in the SC and an increase in the activated microglial morphotypes in the SC and V1. CIL administration was able to attenuate or/and prevent CIS-induced increase in microglial cell number and activation in the SC.

The present Doctoral Thesis allowed us to conclude that a single dose of CIS induced retinal damage, which was already present in the OCT analysis, providing a novel technique for the non-invasive assessment of CIS-induced retinotoxicity. This is the first study to demonstrate that a single dose of CIS had an impact on neuronal and microglial cell populations in several nuclei of the visual pathway. Although in future studies CIS dose should be re-adjusted, present results provide evidence for CIS-induced damage of the visual pathway, even at low doses, and probably causing visual impairment. Present results give support to CIL as an effective therapeutic approach in the management of CIS-induced inflammatory response in the analyzed relay nuclei of the visual pathway, despite not being able to affect the reported damage in the retina. In future studies we will further investigate the molecular mechanisms involved in the protective anti-inflammatory effects of CIL, as well as whether CIL might be of interest in the management of other neuropathologies.



# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## 1. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISUAL

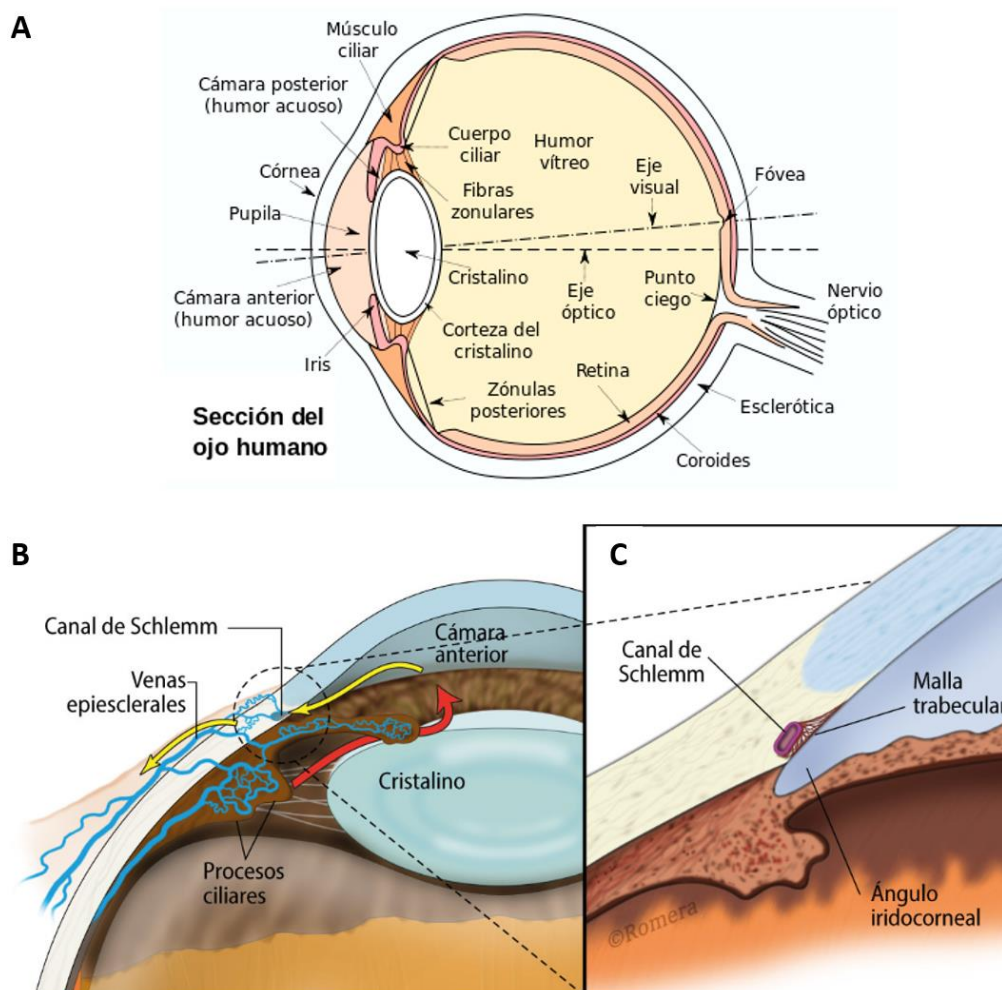
La vía visual está formada por el conjunto de estructuras pertenecientes al sistema nervioso central (SNC) que se encargan del procesamiento e integración de la información visual recibida. Está constituida por la retina, por una serie de núcleos de relevo y por la corteza visual. La información visual llega a los receptores sensoriales, los fotorreceptores de la retina, en forma de ondas electromagnéticas que, mediante el proceso de fototransducción, transforman en energía electroquímica en forma de impulsos nerviosos los cuales pueden ser procesados por el resto de los elementos de la vía visual.

El ojo está formado por una serie de estructuras que van a garantizar que la información lumínica del exterior llegue correctamente a los fotorreceptores (Fig.1). Las partes del ojo son bastante similares en humanos y roedores (Purves, 2023), desde el exterior al interior son:

- Párpados: que permiten proteger, limpiar y lubricar la superficie ocular.
- Córnea: es un tejido epitelial avascular transparente que conforma la primera lente del ojo, a través de la cual entrará la luz en el mismo. Se continúa con la esclerótica, la cual rodea a todo el globo ocular.
- Cámara anterior: es el espacio entre la córnea y el iris. Está rellena de humor acuoso que permite nutrir y oxigenar las estructuras del globo ocular carentes de aporte sanguíneo, como la córnea y el cristalino. Es producido por el cuerpo ciliar y secretado a través de los procesos ciliares, cuyas células epiteliales de revestimiento regulan su producción y composición. El humor acuoso se drena hacia la circulación sanguínea principalmente en la zona del ángulo iridocorneal, donde el humor acuoso atraviesa la malla trabecular y el canal de Schlemm, llegando al seno venoso.

- Iris: se encuentra entre el humor acuoso y el cristalino, delimitando la cámara anterior y posterior del ojo. Está formado por dos capas de músculo liso, una circular (músculo constrictor pupilar) y otra radial (músculo dilatador pupilar) que delimitan un orificio que es la pupila. La función del iris es regular la entrada de luz a la retina mediante la modificación del tamaño pupilar, determinado por las dos capas musculares y controlado por el sistema nervioso autónomo.
- Cuerpo ciliar: estructura que se sitúa entre el iris y la zona de la *ora serrata*. En los procesos ciliares se produce la secreción del humor acuoso. En su estroma se encuentra el músculo ciliar, al cual se anclan las fibras zonulares del ligamento suspensorio de éste, y que permite la modificación de la forma del cristalino para lograr la acomodación adecuada a la visión lejana y cercana.
- Cristalino: se encuentra entre la cámara anterior y posterior del ojo. Es la segunda lente ocular y se encuentra anclado al músculo ciliar del cuerpo ciliar por las fibras zonulares del ligamento suspensorio. La forma del cristalino varía en función del grado de contracción o relajación del músculo ciliar, lo que permite enfocar sobre la retina la imagen de los objetos que se encuentran a diferentes distancias del ojo.
- Cámara vítrea: se encuentra entre el cristalino y la retina. Contiene el humor vítreo que es un líquido gelatinoso y transparente, que permite mantener la forma del ojo, la posición del cristalino y que la retina neural permanezca en contacto con el epitelio pigmentario de la retina; además tiene cierta capacidad fagocítica que le permite eliminar desechos.
- Retina: es un epitelio neurosensorial situado a continuación de la *ora serrata* (que delimita el cuerpo ciliar de la retina), entre el humor vítreo y la coroides. En su porción neural contiene las células responsables de la fototransducción, que permite la conversión de las ondas electromagnéticas en señales eléctricas, y el inicio del procesamiento de la información visual. En su porción no neural se encuentra el epitelio pigmentario, que absorbe la luz que entra en el ojo y no incide sobre los fotorreceptores evitando su reflexión, forma parte de la barrera hematorretiniana (BHR), nutre a la retina neural, elimina desechos, ayuda a la regeneración del fotorreceptor de los fotorreceptores, y permite la adhesión de la retina a la coroides.

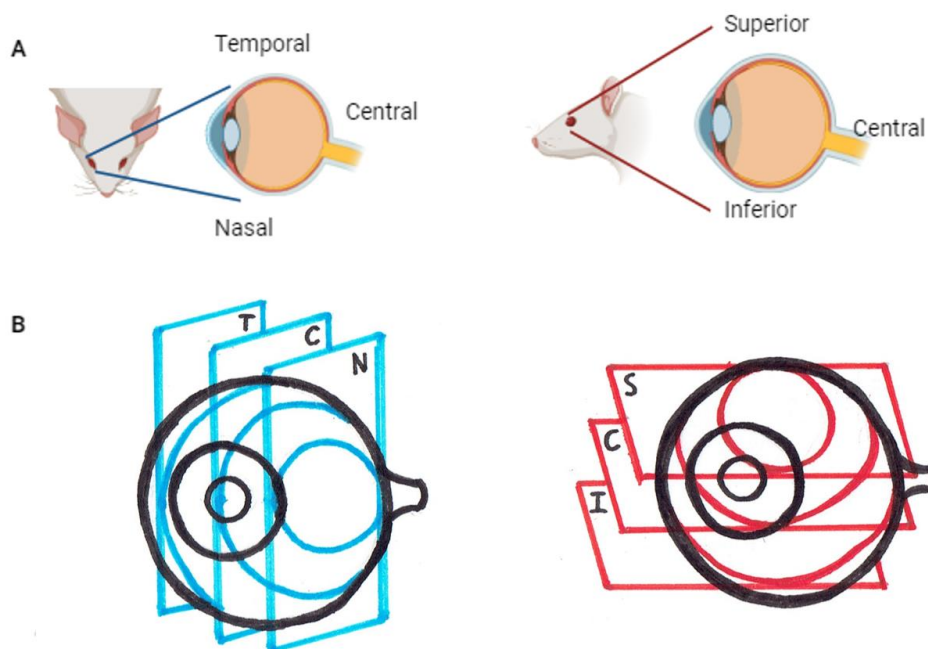
- Coroides: es una capa de tejido conjuntivo ubicada entre la retina y la esclerótica. Presenta una elevada irrigación que asegura la correcta homeostasis en el epitelio pigmentario, entre otros.
- Esclerótica: es una capa de tejido conjuntivo muy rico en fibras de colágeno, que rodea el globo ocular desde la córnea hasta la parte posterior del ojo. Protege al ojo de posibles daños mecánicos y es el lugar de unión de los músculos extraoculares.



**Figura 1. Anatomía del ojo humano.** A. Estructuras macroscópicas en una sección de ojo humano. B. Detalle del drenaje del humor acuoso a través del Canal de Schlemm. C. Ampliación de la estructura trabecular. Tomado de Lavin-Dapena & Alcocer, 2016 y modificado.

La luz penetra en el ojo pasando por la córnea y el humor acuoso hacia la pupila, atraviesa el cristalino, el humor vítreo y llega a la retina. Macroscópicamente en la retina se pueden distinguir una serie de estructuras (Fig. 1): la papila o disco óptico, por el cual salen los axones de las células ganglionares (CGR) para formar el nervio óptico (NO) y entran y salen la arteria y vena centrales de la retina, es considerado el “punto ciego” de la retina ya que no tiene fotorreceptores; la mácula está en la zona central de la retina y, en humanos, dentro de la mácula encontramos la fovea, una zona excavada de la retina donde se concentran los conos y constituye el área de máxima agudeza visual, no presente en los roedores; la *ora serrata* es el límite anterior y periférico de la retina y se continúa con el cuerpo ciliar (Kandel,2013).

La retina se puede dividir, desde el punto de vista anatómico, en 3 regiones en el plano horizontal: temporal (T), central (C) y nasal (N); y en otras 3 regiones en el plano vertical: superior (S), central (C) e inferior (I). En total se establecen 9 áreas anatómicas: Nasal Superior (NS), Nasal Central (NC), Nasal Inferior (NI), Central Superior (CS), Central Central (CC), Central Inferior (CI), Temporal Superior (TS), Temporal Central (TC) y Temporal Inferior (TI) (véase Fig. 2).

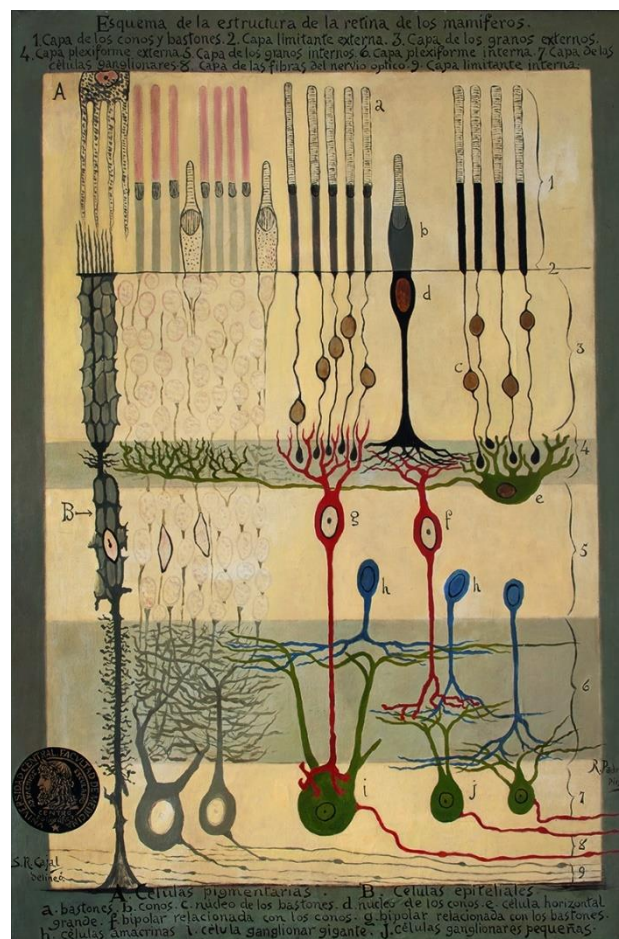


**Figura 2. Áreas anatómicas de la retina.** A. División en el eje horizontal en tres regiones: temporal (T), central (C) y nasal (N); y en el eje vertical en tres zonas: superior (S), central (C) e inferior (I). B. Esquema representativo del globo ocular y las divisiones de la retina en el eje horizontal y vertical. Realizada con BioRender.

## 1.1. La retina

Las ondas electromagnéticas llegan a la retina donde las células receptoras sensoriales, los fotorreceptores, transducen el estímulo en señales electroquímicas que, tras ser procesadas por las distintas células de la retina, llegarán a las células ganglionares. Si la información que reciben es excitatoria, generarán potenciales de acción que transmitirán, vía sus axones y por el NO, a las siguientes células de los núcleos de relevo de la vía visual.

La retina posee una organización estructural que se encuentra muy bien definida desde los primeros estudios de Cajal (Fig. 3).

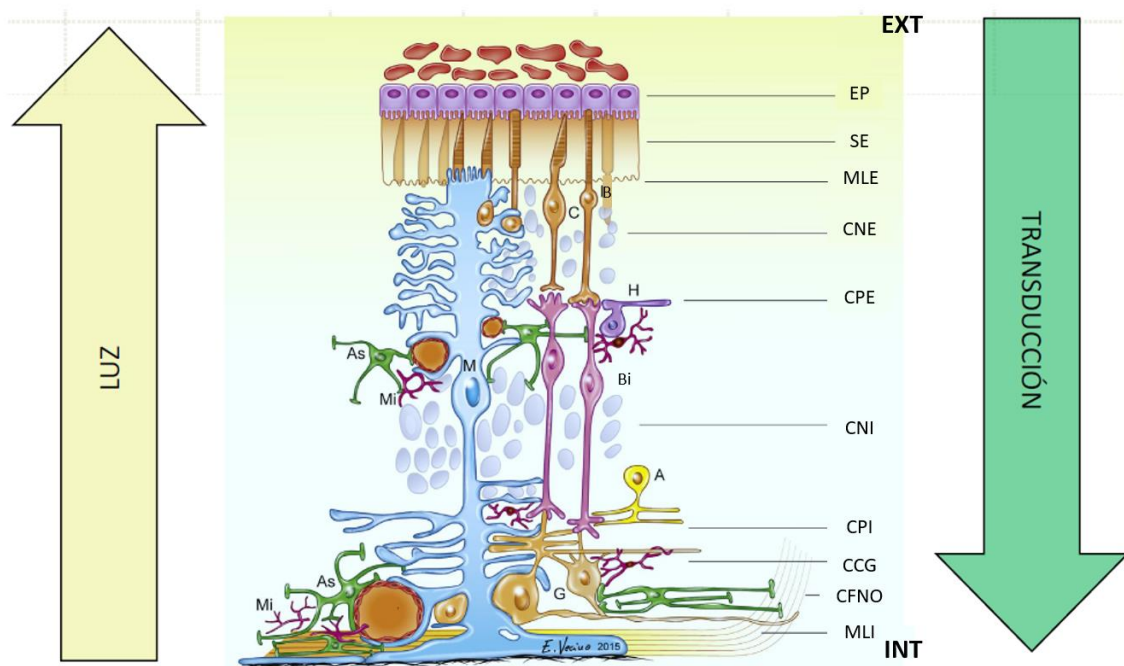


**Figura 3. Dibujo clásico de la retina de Ramón y Cajal.** Esquema de la estructura de la retina de los mamíferos: 1. Capa de bastones y conos. 2. Membrana limitante externa. 3. Capa granular externa. 4. Capa plexiforme externa. 5. Capa granular interna. 6. Capa plexiforme interna. 7. Capa de células ganglionares. 8. Capa de fibras del nervio óptico (NO). 9. Membrana limitante interna. A. Células pigmentadas. B. Células epiteliales. a. Bastones. b. Conos. c. Núcleo del bastón. d. Núcleo del cono. e. Célula horizontal grande. f. Célula bipolar asociada al cono. g. Célula bipolar asociada al bastón. h. Células amacrias. i. Célula ganglionar gigante. j. Células ganglionares pequeñas. Tomado de Ramón y Cajal, 1900.

La retina está formada por 10 capas interconectadas en las que se alternan capas nucleares, con distintos tipos celulares, capas de sinapsis, y dos membranas limitantes (Fig. 4). Las capas ordenadas de más externas a más internas son las siguientes (para revisión consultar: Kandel,2013):

- Epitelio pigmentario (EP): es la capa más externa de la retina. Está formada por las células del epitelio pigmentario que contactan con la coroides, por un lado, formando parte de la BHR, y con la capa de fotorreceptores por el otro, en concreto con el segmento externo de las células fotorreceptoras. Su función principal es la de evitar la refracción de la luz y realizar el reciclado del ftopigmento de los fotorreceptores. Esta capa no pertenece a la retina neural.
- Capa de fotorreceptores: en esta capa se encuentran los segmentos externos de los fotorreceptores (SE), los cuales contienen el ftopigmento responsable de la fototransducción.
- Membrana limitante externa (MLE): está formada por la terminación de la prolongación apical o ventricular de las células de Müller, y las uniones celulares, *zonulae adherens*, entre los fotorreceptores y las células de Müller.
- Capa nuclear externa (CNE): está formada por los somas y la prolongación interna de los fotorreceptores. Hay dos tipos de fotorreceptores: los bastones y los conos. Son los encargados de la fototransducción y transmiten la información a las células bipolares y/o horizontales y/o interplexiformes.
- Capa plexiforme externa (CPE): está formada por las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y las células horizontales.
- Capa nuclear interna (CNI): está formada por los somas de células bipolares, las células horizontales, las células interplexiformes, las células amacrinas, las CGR desplazadas y las células de Müller. Las células bipolares son las que reciben información de los fotorreceptores y la transmiten a las CGR. Las células horizontales, amacrinas e interplexiformes son las encargadas de modular las sinapsis entre fotorreceptores, bipolares y CGR.
- Capa plexiforme interna (CPI): está formada por las sinapsis entre las células bipolares y las amacrinas con las CGR.

- Capa de células ganglionares (CCG): está formada por los somas de las CGR y las amacrinas desplazadas. Las CGR son responsables de integrar la información visual y transmitirla por sus axones hacia el resto de la vía visual. Las CGR pueden clasificarse por su morfología y/o función, lo cual determina el núcleo de la vía visual al que enviarán información como se tratará en los siguientes apartados.
- Capa de fibras del nervio óptico (CFNO): contiene los axones de las CGR y es la capa más vascularizada de la retina.
- Membrana limitante interna (MLI): está formada por la terminación de la prolongación vítrea de las células de Müller y separa la retina del humor vítreo.

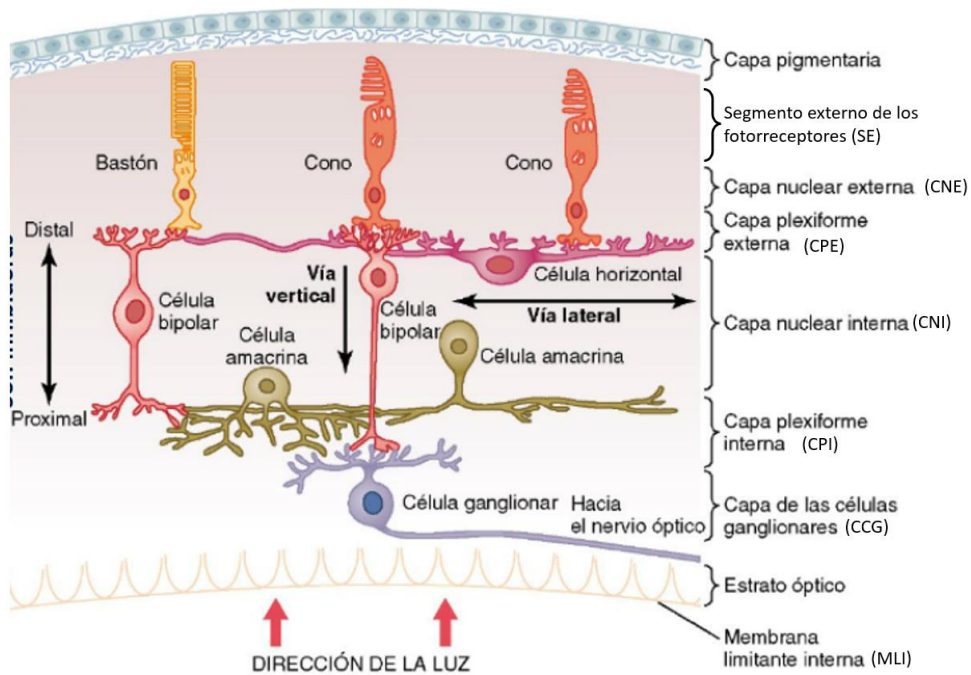


**Figura 4. Estructura de la retina.** Esquema que muestra las capas de la retina, desde la más externa (EXT) a la más interna (INT): EP, epitelio pigmentario; SE, segmento externo de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; CFNO, capa de fibras del nervio óptico; MLI, membrana limitante interna. En la imagen se muestran también los principales tipos celulares de la retina: A, amacrina; As, astrocito; B, bastón; C, cono; G, célula ganglionar; H, célula horizontal; Mi, microglía; M, célula de Müller. Tomado de Vecino *et al.*, 2016 y modificada.

En la retina encontramos 5 tipos de células que, desde la retina externa hacia la retina interna son: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes y CGR (Fig. 5) (Purves, 2023)

- Células fotorreceptoras: los bastones son los más abundantes, tienen una alta sensibilidad a la luz, y por ello son los encargados de la visión escotópica y mesotópica, con muy baja iluminación. Los conos son menos numerosos y sensibles a la luz, y están encargados de la visión mesotópica y fotópica, con elevada iluminación; se encuentran en pequeña cantidad por toda la retina, pero se concentran en la zona de la fovea, y son los responsables de la agudeza visual y de la visión en color. Hay tres tipos de conos dependiendo de la longitud de onda que estimule su fotopigmento: L (longitud de onda larga, en el espectro rojo), M (longitud de onda media, en el espectro verde) y S (longitud de onda corta, en el espectro azul). Es importante destacar en este punto una diferencia entre las retinas de humano y roedores, como ya se ha indicado, en roedores no hay fovea y, además, presentan menos cantidad de conos y solo de dos tipos (visión dicromática), unos que perciben el espectro verde y otros el azul.
- Células horizontales: presentan un soma alargado, fusiforme y con prolongaciones extendidas en el plano horizontal. Estas células establecen sinapsis entre fotorreceptores y bipolares, constituyen la vía lateral de transmisión de la información y participan en el mecanismo de inhibición lateral.
- Células bipolares: son células que transmiten información entre los fotorreceptores y las CGR, vía vertical; y también pueden transmitir información a las amacrinas, vía lateral. Existen distintos tipos de células bipolares que fisiológicamente y de forma muy resumida, se podrían agrupar en dos tipos en función a las características de su campo receptivo. Las células bipolares ON o de centro encendido que responden despolarizándose cuando incide luz de la longitud de onda adecuada en el centro del campo receptor e hiperpolarizándose cuando incide en la periferia; y células bipolares OFF o de centro apagado, que responden hiperpolarizándose cuando incide luz en el centro de su campo receptivo y despolarizándose cuando incide en la periferia de este.

- Células amacrinas: median las sinapsis entre bipolares y CGR y están implicadas en mecanismos de inhibición lateral. Es una población muy heterogénea tanto desde el punto de vista morfológico como funcional.
- CGR: es una población heterogénea, en la que existen más de 20-46 tipos en la retina de mamíferos, que se diferencian por su morfología y su función, aunque, de forma resumida, se pueden dividir en cuatro grandes grupos. Las CGR M o magnocelulares, están especializadas en la detección del movimiento. Las CGR P o parvocelulares, están implicadas en la discriminación del color y la percepción de profundidad entre otros. Tanto las CGR M como las P, tienen campos receptivos centro-periferia ON-OFF (aumentan la descarga de potenciales de acción al incidir luz de la longitud de onda adecuada en el centro de su campo receptivo) u OFF/ON (disminuyen la descarga de potenciales de acción al incidir luz de la longitud de onda adecuada en el centro de su campo receptivo). Las CGR no M-no P implicadas, entre otros, en el procesamiento de información del color; y las CGR intrínsecamente fotosensibles (ipCGR) que constituyen aproximadamente el 1 % de la población total, poseen melanopsina y están implicadas en la regulación de los ritmos circadianos más que en el procesado de la información visual.



**Figura 5. Esquema de los tipos celulares de la retina y sus conexiones.** Los fotorreceptores (conos y bastones) se encuentran en la capa del segmento externo de los fotorreceptores (SE) y la capa nuclear externa (CNE); las células bipolares, horizontales y amacrinas se encuentran en la capa nuclear interna (CNI); y las células ganglionares (CGR) están en la capa que lleva su mismo nombre (CCG). Los fotorreceptores, las células bipolares y las horizontales establecen sinapsis entre sí en la capa plexiforme externa (CPE), mientras que bipolares, amacrinas y CGR en la capa plexiforme interna (CPI). La transmisión de la información fluye verticalmente desde fotorreceptores a CGR mediada por las células bipolares y lateralmente por medio de las horizontales y las amacrinas. Tomada de Kandel, 2013 y modificada.

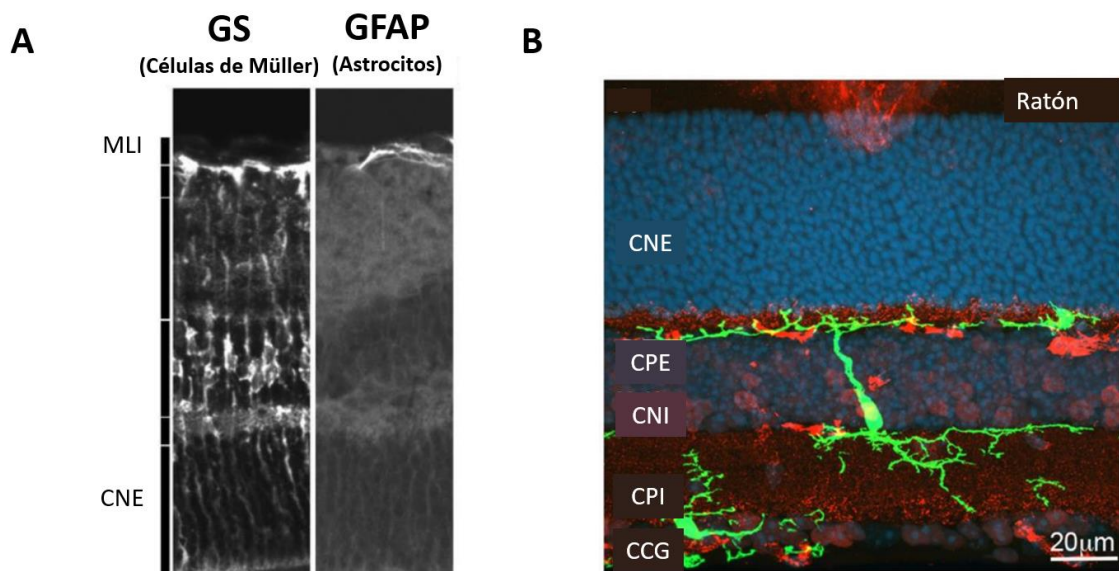
En la retina hay otro gran grupo celular que es el formado por las células de glía, que se dividen en dos grandes grupos: las células de macroglía y las células de microglía.

Las células de macroglía de la retina (astrocitos y células de Müller) son esenciales para el mantenimiento de la citoarquitectura de la misma, así como para la supervivencia de las poblaciones celulares descritas, al estar implicadas en: la regulación de la homeostasis retiniana, el mantenimiento metabólico, la transmisión sináptica, el mantenimiento y formación de la BHR, y la inmunidad retiniana (Reichenbach & Bringmann, 2020). Las células macrogliales están conectadas con los otros tipos celulares mediante uniones comunicantes tipo GAP lo cual, además de proporcionar soporte estructural, permite la comunicación espacial entre todas las partes de la retina (Ramírez *et al.*, 1996).

La macroglía produce importantes factores tróficos esenciales, entre otros: el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y el factor neurotrófico fibroblástico (bFGF) (Vecino *et al.*, 2016). Los astrocitos en condiciones fisiológicas se encuentran presentes en las capas CCG y CFNO, donde contactan, con las células, con los vasos sanguíneos y los axones de las CGR. Están implicados en la regulación del flujo sanguíneo en la retina y en la formación y mantenimiento de la BHR; en la homeostasis de líquidos, de iones, del pH y de los neurotransmisores y en la regulación del metabolismo celular; en la señalización celular y en las sinapsis; así como en el mantenimiento inmunitario de la retina. En condiciones patológicas se produce su activación, astrogliosis, y se desplazan al lugar del daño, además de aumentar su número y la expresión de proteínas como la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Shinozaki & Koizumi, 2021).

La astrogliá activada puede ejercer una función neuroprotectora o neurodegenerativa dependiendo de su estado de activación. Los estados A1 y A2 son dos fenotipos distintos de activación de los astrocitos que han sido identificados en el contexto de la respuesta inflamatoria. El estado A1 se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada que puede ser perjudicial y que supone la liberación de citoquinas proinflamatorias y neurotóxicas, como TNF- $\alpha$  (Liddelow *et al.*, 2017). Por otro lado, el estado A2 representa una respuesta más beneficiosa, promueve la reparación del daño tisular y la supervivencia neuronal secretando factores neurotróficos y antiinflamatorios, como el factor de crecimiento nervioso (Liddelow *et al.*, 2017). En la retina, los mecanismos que regulan la transición entre ambos estados son cruciales para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a promover la neuroprotección (Pekny & Pekna, 2014).

Las células de Müller tienen sus somas en la CNI, pero extienden sus prolongaciones a lo largo de toda la retina hacia la MLI y la MLI, donde contactan con las estructuras adyacentes, con los vasos sanguíneos y con el humor vítreo y, en su recorrido por todas las capas de la retina, contactan con las células adyacentes (Fig. 6). Son las células responsables del mantenimiento de la citoarquitectura de la retina, ayudan al mantenimiento de la homeostasia retiniana y celular, al metabolismo celular, modulan la actividad neuronal e intervienen en el reciclaje y síntesis de determinados neurotransmisores (Reichenbach & Briggmann, 2010). En condiciones patológicas, se activan y aumentan la expresión de GFAP y de otras proteínas como la glutamina sintetasa (Fernández-Albarral *et al.*, 2022; Shinozaki & Koizumi, 2021).



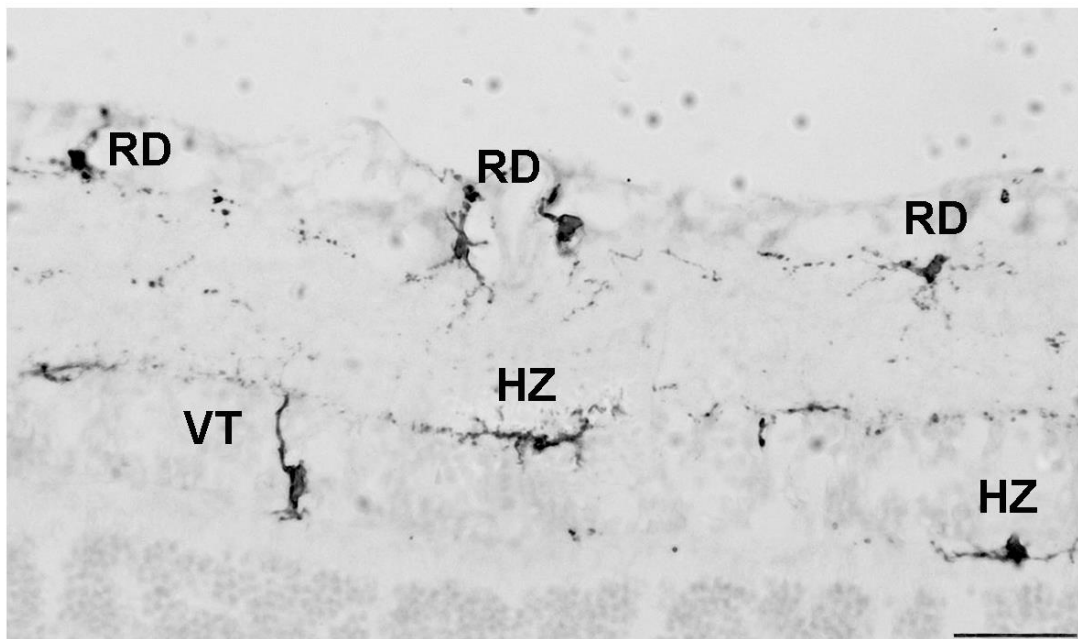
**Figura 6. Células gliales de la retina.** A. Células macrogliales: Células de Müller marcadas con glutamina sintasa (GS) y astrocitos marcados con proteína ácida fibrilar glial (GFAP). B. Células microgliales (verde). MLI, membrana limitante interna; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Tomada de Shinozaki & Koizumi., 2021 y modificada.

Las células microgliales son las células que forman parte del sistema de inmunidad innata residente en el SNC, funcionando como si fueran macrófagos móviles pues pueden desplazarse, presentar antígenos y fagocitar (Fig. 5 y 6) (Kettenmann, 2013). En condiciones fisiológicas están en las capas CPI, CPE, CCG y CFNO. Constituyen una población heterogénea que realizan una función de inmunovigilancia protectora, al estar constantemente moviéndose por la estructura en la que se encuentran; además ayudan al mantenimiento de la homeostasis.

Las células de microglía pueden producir varios factores neurotróficos implicados en la plasticidad y supervivencia neuronal, por lo que ayudan a la reparación de vías nerviosas, la remodelación sináptica y la neurogénesis (Kettenmann, 2013). La microglía expresa la molécula adaptadora de calcio ionizado (Iba1), un marcador empleado para identificar esta población celular.

En la retina, en condiciones fisiológicas, se encuentran como microglía ramificada, con una morfología de soma pequeño y prolongaciones radiales, lo que le da nombre al morfotipo Radial (RD). Las células nerviosas, en situación fisiológica, liberan CD200L (ligando del *Cluster* de diferenciación 200) y las células microgliales, en su superficie, tienen el receptor CD200R (receptor del *Cluster* de diferenciación 200) la interacción del ligando y el receptor media la inhibición de la activación microglial y que se mantenga el morfotipo RD. En situaciones patológicas se produce la activación de las células microgliales por varios motivos, entre otros: el ambiente proinflamatorio generado en la zona lesionada; la producción de fractalkina (ligando 1 del motivo C-X3-C; CX3CL1), por las neuronas, que es una quimioquina que se une al receptor de fractalkina microglial (receptor 1 del motivo C-X3-C; CX3CR1) y contribuye a su activación; además, se establece una comunicación bidireccional con las células de Müller en la que las células de microglía liberan citoquinas proinflamatorias activando estas últimas, las cuales, a su vez, liberan sustancias quimioatrayentes y adhesivas que favorecen la migración microglial sobre la superficie de las células de Müller (Wang *et al.*, 2011; Vecino *et al.*, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2020). En una situación patológica, la microglía pasa a estado reactivo y se produce un cambio en su número y en su morfología caracterizado por presentar un soma alargado y unas prolongaciones más cortas y gruesas (Fig. 7). Esta microglía activada puede migrar entre las diferentes capas de la retina, cuando los procesos celulares se extienden perpendiculares a las capas retinianas morfotipo vertical (VT); o bien dentro de una misma capa de la retina, cuando las prolongaciones se extienden paralelos a las capas morfotipo Horizontal (HZ). En algunos casos, es posible que la microglía activada pueda llegar a adoptar un morfotipo amebode, que suele encontrarse en la CFNO (Kettenmann *et al.*, 2013).

La microglía activada puede liberar citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) que, a su vez, pueden inducir astrogliosis, muerte de CGR y vasoconstricción (Kettenmann *et al.*, 2013). Al igual que en los astrocitos, la microglía se puede encontrar en un balance continuo entre dos perfiles funcionales y fenotípicos. El estado M1 de activación microglial se asocia típicamente con una respuesta proinflamatoria que puede promover la producción de ROS y el estado M2 de activación que genera una respuesta antiinflamatoria y reparadora (Tang & Le, 2015).



**Figura 7. Morfotipos microgliales en la retina.** Morfotipos microgliales de la retina de ratas Wistar, marcados con el anticuerpo Iba1: RD, morfotipo radial; HZ, morfotipo horizontal; VT, morfotipo vertical. Iba1, molécula adaptadora de unión al calcio 1. Barra de aumentos: 100  $\mu\text{m}$ .

La presente Tesis Doctoral realiza el estudio en un modelo animal en rata, y es importante matizar diferencias entre la retina humana y la de los roedores que ayudarán a comprender mejor estos apartados. La principal diferencia entre la retina humana y la de los roedores es que la segunda no tiene mácula ni fovea; y que al ser los roedores una especie nocturna su retina se compone principalmente de bastones y solo presenta dos tipos de conos. La retina de los roedores es, a pesar de las diferencias (Tabla 1), estructuralmente muy similar a la retina periférica humana, lo que la convierte en un modelo útil y muy empleado en investigación sobre patologías retinianas y posibles tratamientos farmacológicos.

**Tabla 1.** Principales diferencias en la retina de humanos y ratas

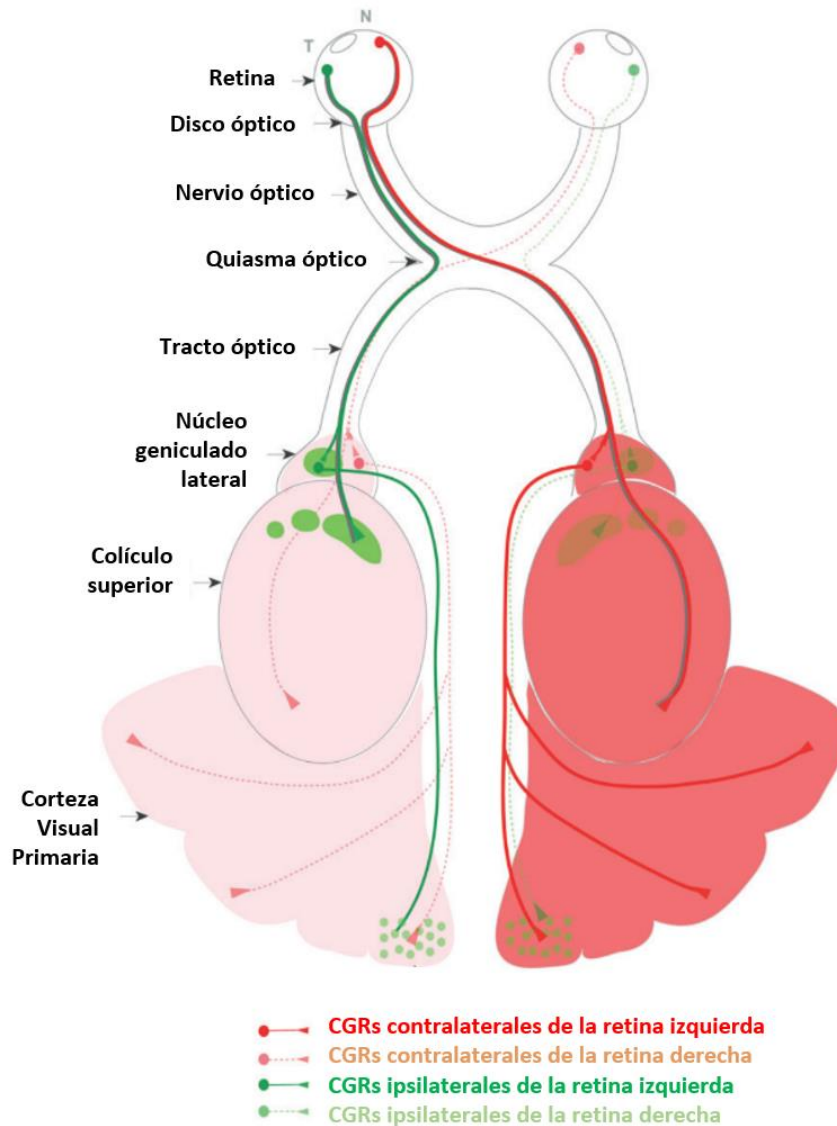
<b>Diferencias</b>	<b>Humanos</b>	<b>Ratas</b>	<b>Referencias</b>
<b>Tamaño</b>	23.5-25 mm	4 mm	Zeiss <i>et al.</i> , 2018
<b>Morfología</b>	Ausencia de glándula Harderiana	Presencia de glándula Harderiana	Zeiss <i>et al.</i> , 2018
<b>Macroestructura</b>	Ausencia de ángulo iridocorneal	Presencia de ángulo iridocorneal	Zeiss <i>et al.</i> , 2018
	Presencia de fovea Presencia de mácula	Ausencia de fovea Ausencia de mácula	Vidal-Villegas, 2024
	Densidad normal de Fotorreceptores en zonas Nasal y Temporal	Mayor densidad de Fotorreceptores en las zonas Nasal y Temporal	Ortín-Martínez <i>et al.</i> , 2010
<b>Vascularización</b>	Desplazada desde fovea	Radial desde NO	Vidal-Villegas, 2024
<b>Microestructura</b>	Menor densidad de CGR	Mayor densidad de CGR	Dräger & Olsen, 1980
	CGR en multicapas Menor proporción de bastones	CGR presentes en una única capa Mayor proporción de bastones 95%	Zeiss <i>et al.</i> , 2018
	3 tipos de conos: S, M y L	2 tipos de conos: S y L/M	
<b>Aferencias</b>	60% de los axones decusan	95% de los axones decusan	Dhande & Huberman, 2014

CGR, células ganglionares de la retina; NO, nervio óptico

### 1.2. La vía visual en roedores

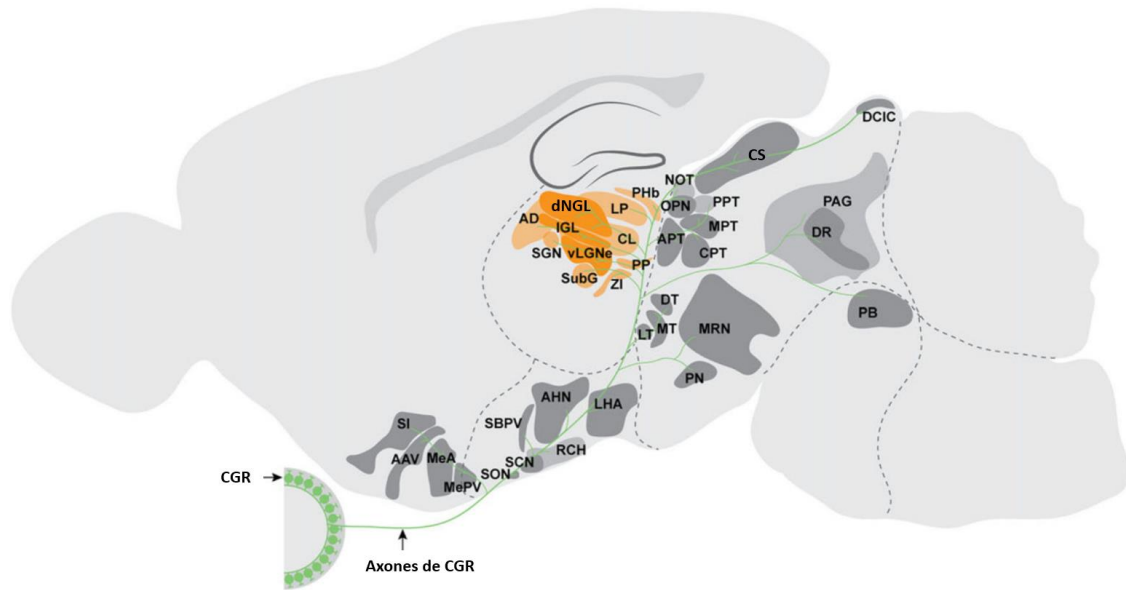
La retina constituye el inicio de la vía visual. La información visual procesada en la retina se dirige a otras zonas del SNC mediante los axones de las CGR que forman el NO. Se ha descrito una cierta organización retinotópica en el NO asociada con el área de la retina en la cual se encuentra la CGR (Fitzgibbon & Reese, 1996) y que se mantendrá en el resto de la vía visual.

El SNC de los mamíferos integra información de los 2 ojos para conseguir la visión completa del campo visual, la visión en profundidad y aumentar la sensibilidad visual (Read, 2021). Esta integración binocular se consigue gracias a que parte de los axones de las CGR decusan en el quiasma óptico (CGR contralaterales) y parte no decusa, por lo que envían información al mismo hemisferio de la retina de la proceden (CGR ipsilaterales). En roedores, debido a la lateralización de los ojos, más del 95% de los axones del NO decusan en el quiasma óptico, pues el área que solapa del hemicampo visual captado por cada ojo es muy pequeña; mientras que en humanos decusan solo un 60% de los axones (Sefton *et al.*, 2015). En la retina de roedores, los axones de las CGR que decusan corresponden en su mayoría a CGR que se encuentran en las zonas nasal y central de la retina; mientras que las CGR ipsilaterales se encuentran mayoritariamente en la zona de la creciente temporal de la retina, y constituyen aproximadamente un 20% de las CGR de dicha área retiniana (Fig.8) (Kerschenstein & Feller, 2024).



**Figura 8. Representación esquemática de la vía visual en roedores.** Los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) salen de esta por el disco óptico y constituyen los nervios ópticos. En el quiasma óptico parte de los axones continúan ipsilateralmente, los de CGR de la retina temporal; mientras que la mayoría decusa y continúan contralateralmente, los axones de las CGR de la retina nasal y central. Tras el quiasma óptico y vía los tractos ópticos, los axones se dirigen hacia los principales núcleos de relevo de la vía visual que en roedores son: el colículo superior (CS) y el núcleo geniculado lateral (NGL). Las proyecciones ipsilaterales y contralaterales presentan patrones de conexión distintos en los núcleos visuales. Los axones ipsilaterales forman unas zonas de sinapsis confinadas a las porciones rostrales del NGL y el CS (verde oscuro y claro). Los axones contralaterales sinaptan en el resto del tejido (rojo y rosa). Las neuronas de segundo orden que surgen del CS y NGL transmiten información a la corteza visual primaria (V1) que, en roedores, es en su mayoría monocular. Tomado de Erksine & Herrera, 2014 y modificado.

Los axones de las CGR, tras el quiasma óptico, forman el tracto óptico y se proyectan a diferentes áreas del SNC. En roedores se han identificado unos 45 tipos distintos de CGR que envían información a unas 50 áreas encefálicas diferentes (Fig. 9; Martersteck *et al.*, 2017). Sin embargo, la mayoría de los axones de las CGR proyectan (Fig. 8) o al colículo superior (CS) o al núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) (Erksine & Herrera, 2014), y muchos de los axones que recibe el NGL son ramas colaterales de axones que también han enviado información al CS (Kondo *et al.*, 1993). Las neuronas de segundo orden de los anteriores núcleos de relevo envían información a la corteza visual primaria (V1) que, en roedores, es en su mayoría monocular (Erksine & Herrera, 2014). Las proyecciones de las CGR en los distintos núcleos de relevo de la vía visual están organizadas topográficamente, lo que permite mantener la información espacial del campo visual en toda la vía visual, es decir, existe retinotopía (Johnson & Triplett, 2021).



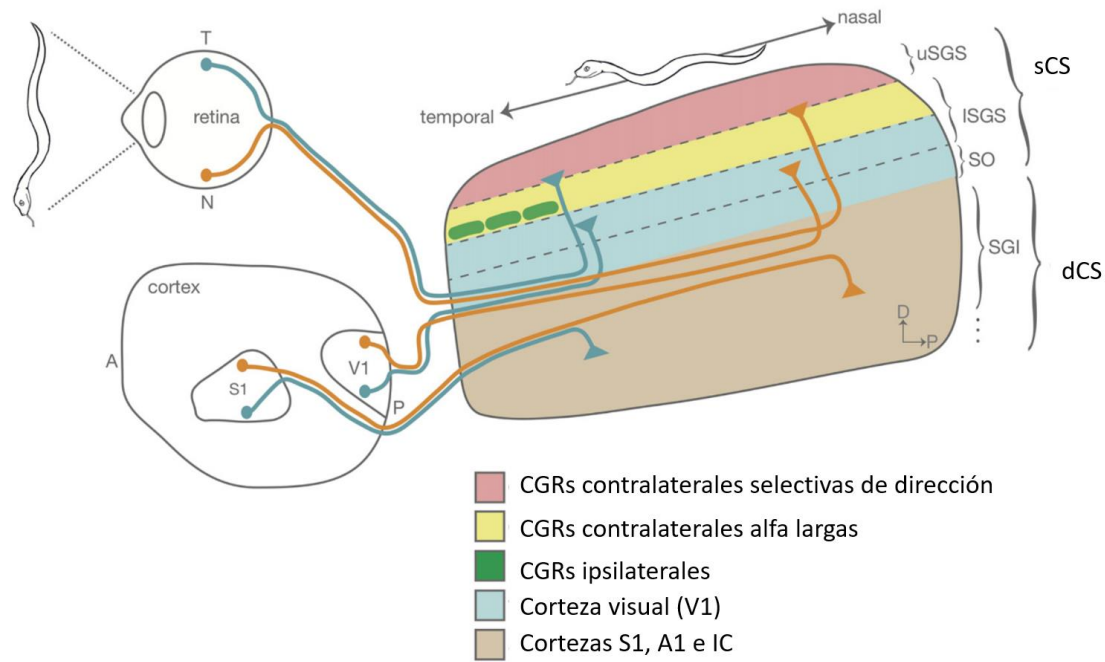
**Figura 9. Núcleos de proyección de las eferencias retinianas en roedores nocturnos.** El esquema ilustra la variedad y distribución de los núcleos cerebrales inervados por las células ganglionares de la retina (CGRs). Los núcleos retinorreceptores talámicos están coloreados en naranja; otras regiones retinorreceptoras están coloreadas en gris. dNGL, núcleo geniculado lateral dorsal; IGL, folículo intergeniculado; vLGNe, núcleo geniculado lateral ventral, división externa; AD, núcleo talámico anterodorsal; LP, núcleo talámico lateral posterior; PHb, zona parahabenuar; ZI, zona incerta; SubG, núcleo subgeniculado; SGN, núcleo suprageniculado; SON, núcleo supraóptico; SCN, núcleo supraquiasmático; RCH, zona retroquiasmática; SBPV, zona subaventricular; AHN, área hipotalámica anterior; LHA, área hipotalámica lateral; MeA: amígdala medial anterior; MePV: amígdala medial posteroventral; AAV: área anterior ventral; SI, *substantia innominata*; MT, núcleo terminal medial; LT, núcleo terminal lateral; DT, núcleo terminal dorsal; PN, núcleo paranigral; MRN, núcleo reticular del mesencéfalo; PB, núcleo parabraquial; DR, núcleo del rafe dorsal; PAG, sustancia gris periacueductal; CPT, núcleo pretectal comisural; MPT, núcleo pretectal medial; PPT, núcleo pretectal posterior; APT, núcleo pretectal anterior; OPN, núcleo olivar pretectal olivar; NOT, núcleo del OT; CS, colículo superior; DCIC, córtex dorsal del colículo inferior; CGR: células ganglionares de la retina. Tomado de Monarvarfeshani *et al.*, 2017 y modificado.

La presente Tesis Doctoral estudia los efectos de un modelo animal de daño por cisplatino en la retina, el CS y el NGL, núcleos de relevo de la mayoría de las eferencias retinianas, y en la V1, dónde envían información las neuronas de segundo orden de las anteriores zonas de relevo. A continuación, describiremos las tres de las zonas de la vía visual en las que se centrará nuestro estudio.

### 1.3. Colículo Superior

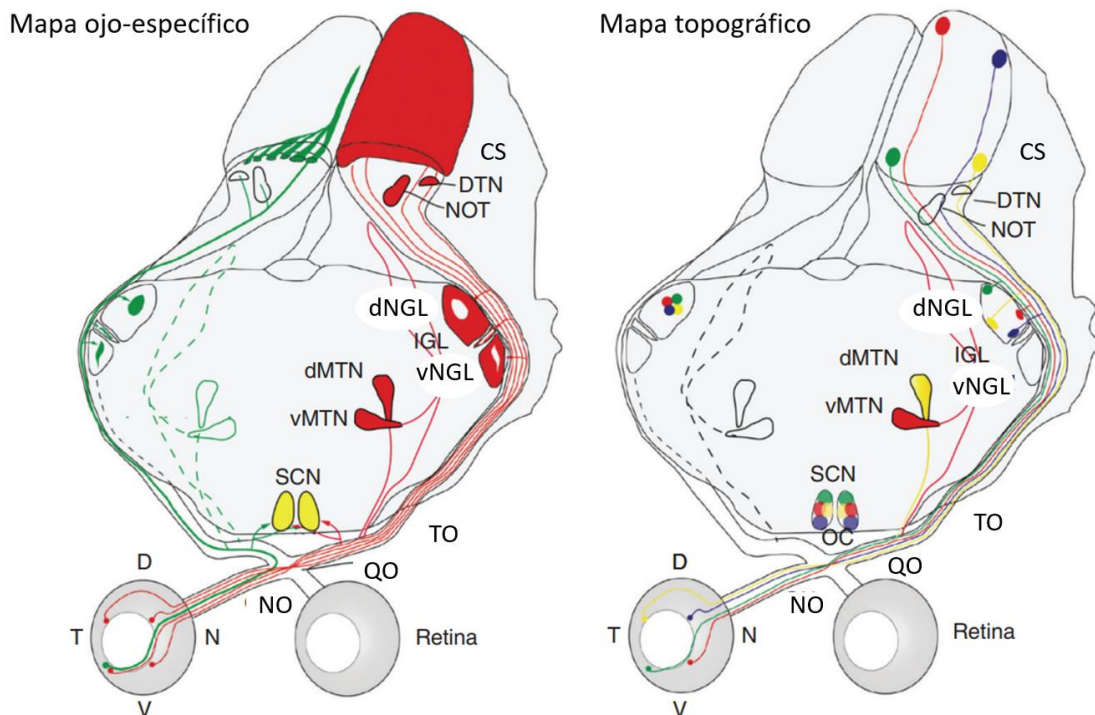
El colículo superior (CS), es una estructura que forma parte del techo del mesencéfalo, porción más rostral y superior del tronco encefálico. El CS es una estructura sensoriomotora: recibe información visual, auditiva y somatosensorial, la integra y, si es necesario, inicial patrones motores. En roedores el CS está implicado, además de en el control de los movimientos oculares y su coordinación con los de la cabeza y cuello, en promover movimientos de defensa innatos y en respuestas de huida (Liang *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2015). El CS es un núcleo de relevo esencial de la información visual en roedores como demuestra el hecho que el 85-90% de las CGR proyectan al mismo.

El CS en mamíferos está dividido en tres capas o láminas, cada una de las cuales contiene varias subcapas o sublaminas, que se diferencian en base a los patrones de distribución neuronal, la conectividad sináptica y las propiedades funcionales: la superficial o superior (sCS), la intermedia (iCS), y la capa profunda o más interna (dCS) (para revisión consultar: Liu *et al.*, 2022) (Fig. 10). Tanto la lámina iCS como la más interna dCS reciben información visual, somatosensorial y auditiva; y aferencias de otras partes del SNC como son los ganglios basales o el cerebelo (Lee *et al.*, 2020). La capa o lámina más superficial sCS posee varias sublaminas: a) el *upper stratum griseum superficiale* (uSGS), que recibe información principalmente de las CGR del ojo contralateral en la parte más superficial; b) el *lower stratum griseum superficiale* (ISGS) que recibe aferencias de las CGR del ojo contralateral y principalmente del ipsilateral y recibe aferencias de neuronas de la corteza visual primaria y de la extraestriada (Lund, 1969); y c) el *stratum opticum* (SO), que recibe información de corteza visual principalmente. La dCS está también dividida en sublaminas: a) el *stratum griseum intermedium* (SGI), que recibe aferencias del sCS y de varias zonas corticales como son la motora primaria, la somatosensorial primaria y la auditiva; y también del colículo inferior; y b) otras sublaminas más profundas.



**Figura 10. Esquema de la organización morfológica del Colículo Superior (CS) y la organización topográfica de las aferencias que recibe.** La imagen de una serpiente que estuviera en el campo visual a lo largo del eje nasal-temporal de la retina se representa topográficamente a lo largo del eje anteroposterior del CS. Las células ganglionares de la retina (CGR) envían información visual directa al CS superficial (sCS). Algunos tipos de CGR se segregan en subláminas dentro del CS. Aquí se muestran las CGR selectivas de dirección que se proyectan a la lámina más superficial del CS (uSGS, rosa) y las grandes CGR alfa, que se proyectan a una lámina ligeramente más profunda del sCS (ISGS, amarillo). El CS también recibe entradas del tronco encefálico y de áreas corticales en el CS profundo (dCS): se muestran las aferencias de la V1 (azul) y S1 (marrón). A, anterior; P, posterior; T, temporal; N, nasal; S1, córtex somatosensorial primario; V1, córtex somatosensorial primario; dCS, *deeper superior colliculus* o Colículo Superior Interno; uSGS, *upper stratum griseum superficial* o estrato gris superficial superior; ISGS, *lower stratum griseum superficial* o estrato gris superficial inferior; sCS, *superficial superior colliculus* o Colículo Superior Superficial; SO, *stratum opticum* o estrato óptico; SGI, *stratum griseum intermedium* o estrato gris intermedio. Tomado de Ito & Feldheim, 2018 y modificado.

Los axones de las CGR mantienen una organización retinotópica en el sCS (Fig. 10 y 11). Las CGR de la retina del ojo contralateral acaban principalmente en las subcapas más superficiales; y las del ojo ipsilateral en las más inferiores. Además, los axones de las CGR de la retina nasal proyectan hacia la parte anterior del CS, las de central a la parte central del CS y las de temporal a las porciones posteriores del CS (Godement *et al.*, 1984; para revisión consultar: Ito & Feldheim, 2018; Kerschensteiner & Fellor, 2024).

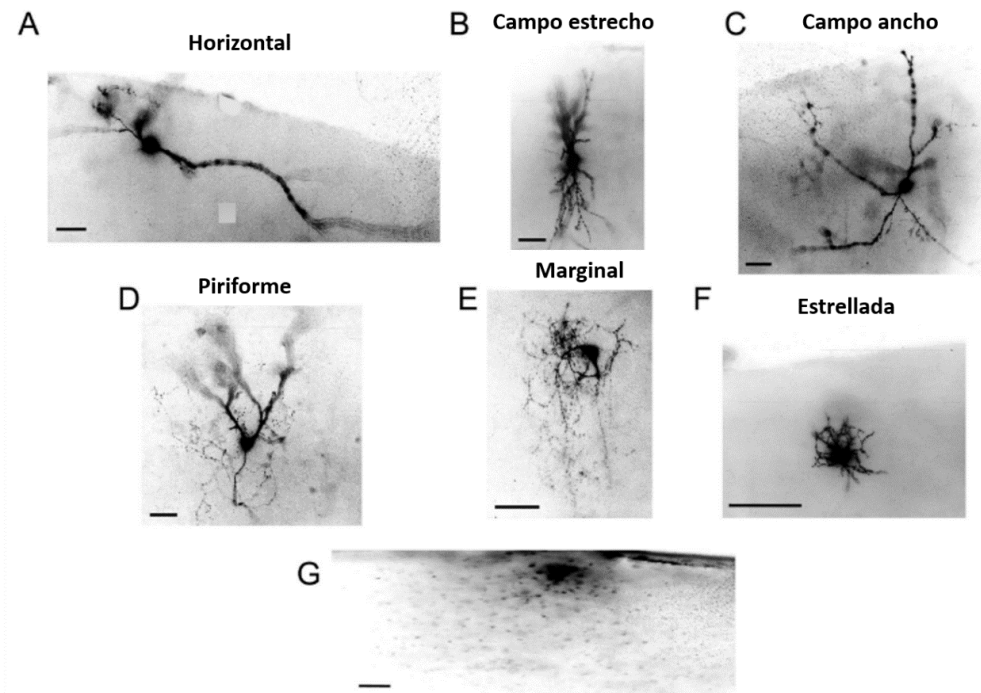


**Figura 11. Organización de las proyecciones retinianas en territorios oculares específicos y mapas topográficos en el sistema visual de ratón.** NO, nervio óptico; QO, quiasma óptico; TO, tracto óptico; SCN, núcleo supraquiasmático; vNGL, núcleo geniculado lateral ventral; dNGL, núcleo geniculado lateral dorsal; IGL, folículo intergeniculado; CS, colículo superior; dMTN, núcleo terminal medial dorsal; vMTN, núcleo terminal medial ventral DTN, núcleo terminal dorsal; NOT, núcleo del tracto óptico; D, dorsal; N, nasal; V, ventral; T, temporal. Tomado de Kerschensteiner & Feller, 2024 y modificado.

En el CS podemos encontrar varios subtipos neuronales (para revisión consultar: Liu *et al.*, 2022). Desde el punto de vista funcional se distinguen varias poblaciones celulares destacando dos: A) neuronas GABAérgicas inhibitorias (Mize, 1992; Whyland *et al.*, 2020) que constituyen aproximadamente el 30% de las neuronas del sCS en ratón (Mize, 1992; Whyland *et al.*, 2020). Estas neuronas presentan una gran variedad de morfologías, de propiedades fisiológicas, y de patrones de conectividad sináptica, entre otros. Esta subpoblación tiene una función esencial en los ciclos luz/oscuridad (Zhang *et al.*, 2019) y en la toma de decisiones relacionadas con la ejecución de movimientos en el espacio (Essig *et al.*, 2021). A pesar de lo anterior, aún se conoce muy poco acerca de las subpoblaciones de neuronas inhibitorias, así como de la relación entre las funciones asociadas a las mismas según su distribución en las distintas láminas y subláminas del CS.

B) Neuronas glutamatérgicas excitatorias (Ghitani *et al.*, 2014). Es una población heterogénea que presenta diferencias en la localización en el CS, en los circuitos de procesamiento de información en los que están implicadas y en las funciones en las que participan, pero aún faltan muchos estudios que profundicen en el conocimiento de estas células (Liu *et al.*, 2022).

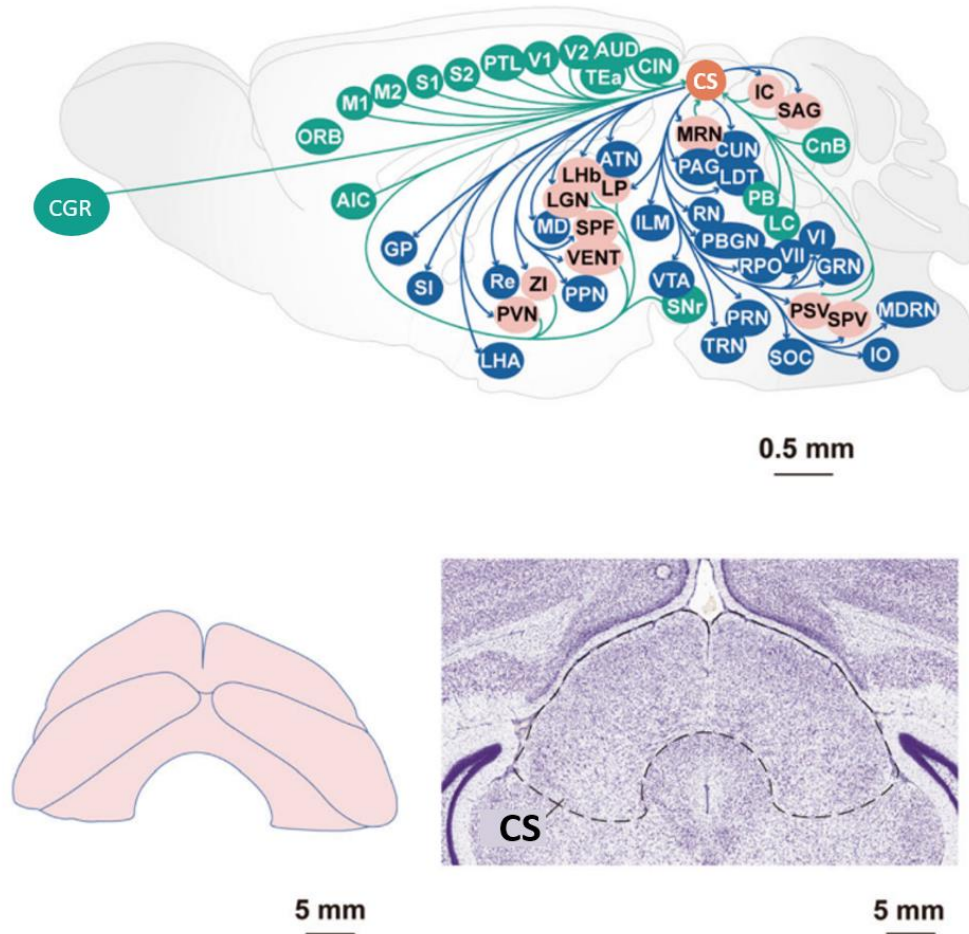
A nivel morfológico (Fig. 12), se han descrito también distintas poblaciones neuronales presentes en el sCS (Edwards *et al.*, 2002): A) Células horizontales: tienen forma bipolar, con un soma fusiforme del cual parten dos grandes prolongaciones horizontales, paralelas a la superficie del CS; B) Células verticales: hay dos tipos que se distinguen por la dirección y longitud a las que proyectan sus dendritas. Las células verticales de campo estrecho poseen 1-2 dendritas primarias que ascienden hacia la superficie, y 1-2 dendritas primarias que descienden hacia el interior del CS. Las células verticales de campo ancho tienen dendritas más dispersas y largas, que pueden ascender, descender, o bien pueden estar dispuestas de forma lateral en las capas; D) Células piriformes: células con soma de morfología ovalada o de “copa” que poseen entre 2 y 5 prolongaciones.; C) Células marginales: son las más superficiales y pequeñas, normalmente muestran un gran árbol dendrítico, con prolongaciones largas; E) Células estrelladas (*Stellate cells*): son el tercer grupo más numeroso de células del CS. Son células multipolares, con prolongaciones cortas y extendidas en todas las direcciones del espacio.



**Figura 12. Ejemplos de los tipos celulares del colículo superior (CS) identificados mediante tinción con *Lucifer Yellow*.** (A-F) Imágenes falso-negativas de los seis tipos celulares neuronales identificados en el CS: célula horizontal (A), célula vertical de campo estrecho (B), célula vertical de campo ancho (C), célula piriforme (D), célula marginal (E) y célula estrellada (F). Célula no neuronal marcada con *Lucifer Yellow* (G). Obsérvese el patrón aparente de múltiples células pequeñas, que pueden ser células de glía conectada a través de uniones GAP. Barra de aumentos=15  $\mu\text{m}$  (G); 30  $\mu\text{m}$  (A-F). Tomada de Edwards *et al.*, 2002 y modificado.

El patrón de aferencias y eferencias del CS están bien caracterizados en distintas especies y, entre ellas en roedores (Fig. 13; para revisión consultar: Liu *et al.*, 2022). Además de las aferencias de las CGR, en roedores el CS recibe aferencias de varias zonas corticales, entre ellas: de la corteza auditiva, la corteza cingulada, las cortezas somatosensorial primaria y secundaria, y el córtex de asociación parietal. También recibe aferencias de varias regiones subcorticales, entre ellas: inhibitorias del complejo nuclear pretectal ipsilateral (núcleo encargado del control visual y visuomotor), serotoninérgicas del núcleo del rafe y de la sustancia gris periacueductal contralateral, de los núcleos cerebelosos, y de la corteza externa del colículo inferior. El hecho de que el CS reciba importantes aferencias visuales, auditivas y somatosensoriales en primates, gatos y roedores, confirma que es una estructura sensoriomotora conservada que integra información visual y sensorial para impulsar diversos comportamientos.

En cuanto a las eferencias del CS, hay que destacar proyecciones: al núcleo reticular talámico, al núcleo subtalámico, a la formación reticular del tronco encefálico, al *pretectum*, al NGL. Los futuros estudios funcionales de las vías de entrada/salida del CS deberían contribuir a identificar comportamientos fisiológicamente relevantes asociados a cada una de las áreas con las que sinaptan sus proyecciones (para revisión consultar: Liu *et al.*, 2022). Los CS de cada lado están interconectados a través de la comisura intercolicular en roedores y este circuito parece estar implicado en la orientación de los ojos y sincronización de las actividades de ambos CS (para revisión consultar: Liu *et al.*, 2022).



**Figura 13. Conexiones aferentes y eferentes del colículo superior (CS) en ratón.** La figura muestra el circuito de aferencias (verde) y eferencias (azul) del colículo superior (CS). El rojo claro indica que el núcleo está recíprocamente conectado con el CS. AIC, corteza insular agranular; AUD, corteza auditiva; ATN, grupo anterior del tálamo dorsal; CCG; células ganglionares de la retina; CIN, corteza cingulada; CnB, núcleo cerebelar; CUN, núcleo cuneiforme; GP, globo pálido; GRN, núcleo reticular gigantocelular; IC, colículo inferior; ILM, núcleo intralaminar del tálamo; IO, complejo olivarario inferior; LHA, núcleo hipotalámico lateroanterior; LC, *locus coeruleus*; LDT, tegmento laterodorsal; Lhb, habénula lateral; LP, núcleo lateral posterior del tálamo; M1, corteza motora primaria; M2, corteza motora secundaria; MD, tálamo mediodorsal; MDRN, núcleo reticular medular; MRN, núcleo reticular del mesencéfalo; NGL, núcleo geniculado lateral; ORB, área orbital; PAG, sustancia gris periacueductal; PB, núcleo parabraquial; PBGN, núcleo parabigeminal; PTL, corteza parietal de asociación; PPN, núcleo pedúnculo tegmental; PRN, núcleo reticular pontino; PSV, núcleo sensorial principal del trigémino; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; Re, núcleo *reuniens* del tálamo; RN, núcleo del rafe; RPO, núcleo pontino del rafe; S1, corteza somatosensorial primaria; S2, corteza somatosensorial secundaria; SAG, núcleo *sagulum*; SI, *substantia innominata*; SOC, complejo olivarario superior; SPF, núcleo subparafascicular; SPV, núcleo espinal del trigémino; TEa, área de asociación temporal; TRN, núcleo reticular talámico; V1, corteza visual primaria; V2, corteza visual secundaria; VENT, grupo ventral del tálamo dorsal; VI, núcleo *abducens*; VII, núcleo facial motor *facial motor nucleus*; VTA, área tegmental ventral; ZI, *zona incerta*. Tomada de Liu *et al.*, 2022 y modificada.

#### 1.4. Núcleo Geniculado Lateral

El tálamo se encuentra en el diencefalo y es una estructura de gran complejidad pues está formada por varios núcleos que intervienen, directa o indirectamente, en un elevado número de funciones. Los axones de las CGR envían información a varios de estos núcleos talámicos. En roedores nocturnos la mayoría de los axones del tracto óptico proyectan al NGL (Fig. 8, 9 y 11) el cual recibe, procesa y transmite información visual procedente de la retina hacia las siguientes zonas de relevo (Monavafeshani *et al.*, 2017).

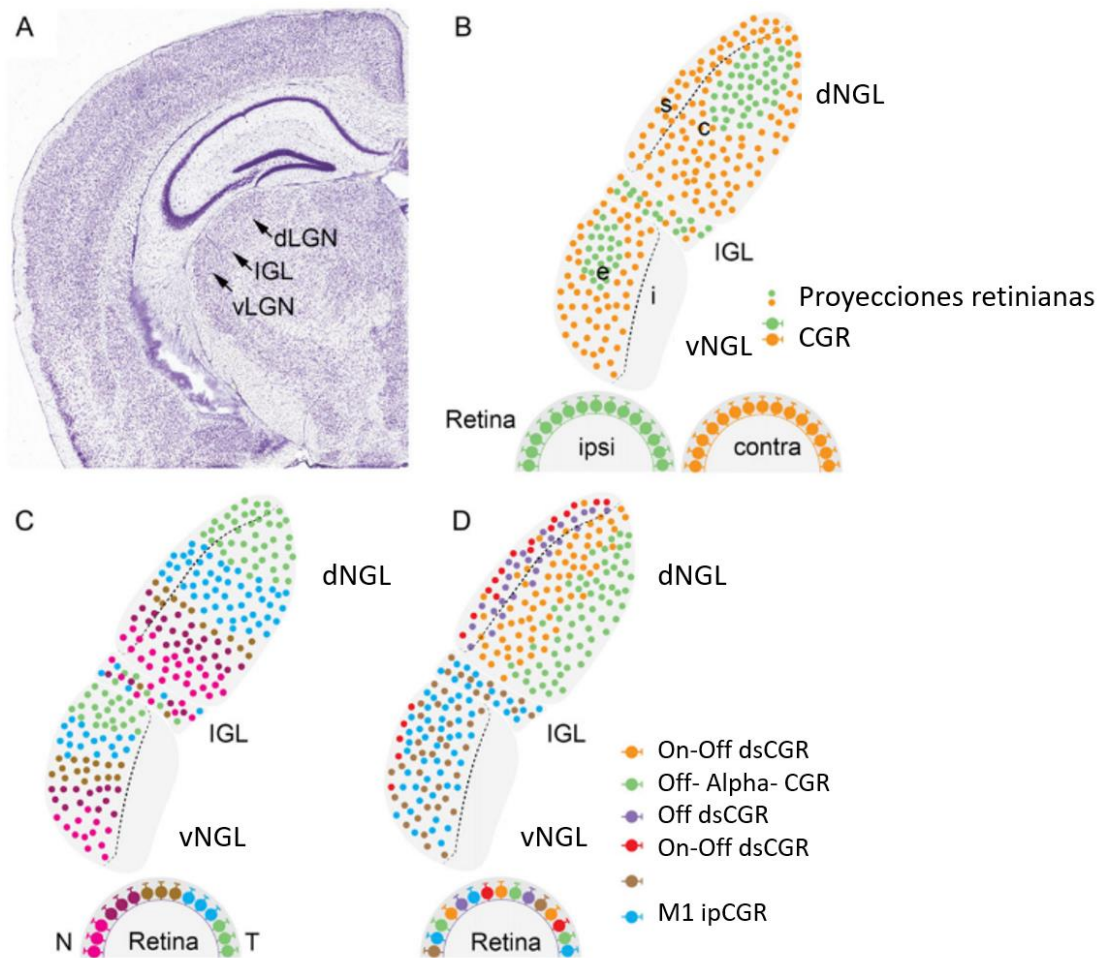
En el NGL de primates se distinguen tanto morfológica como funcionalmente 6 capas. Las capas 1 y 2 reciben información de las CGR Magnocelulares; mientras que las capas 3, 4, 5 y 6 la reciben de las CGR Parvocelulares; a su vez, en la parte ventral de cada una de las 6 capas acaban los axones de las CGR no M no P, Koniocelulares. Además, las capas 1, 4 y 6 reciben información de los axones de las CGR del ojo contralateral (retina nasal y central); mientras que las capas 2, 3 y 5 reciben la información de los axones de las CGR ipsilaterales (retina temporal) (Purves, 2023). Sin embargo, en roedores (Fig. 15) el NGL carece de una organización laminar y presenta sólo 3 zonas que se establecen en función del tipo funcional de CGR de la cual reciben información, así como de si las aferencias las reciben de la retina ipsi o de la contralateral, y son: el dNGL, el núcleo geniculado intermedio (IGL) y el núcleo geniculado ventral (vNGL). El dNGL es el más implicado en el procesamiento directo de la información visual y constituye un núcleo de relevo entre la información recibida de la retina y la enviada a la V1. Los núcleos IGL y vNGL, están implicados en funciones motoras asociadas a la información visual, así como en funciones que implican los sistemas vestibular y ocular, y en los ritmos circadianos (para revisión consultar: Monavafeshani *et al.*, 2017).

A continuación, profundizaremos en la estructura y función del dNGL en el cual se ha desarrollado parte del estudio de la presente Tesis Doctoral por su implicación en el procesamiento visual.

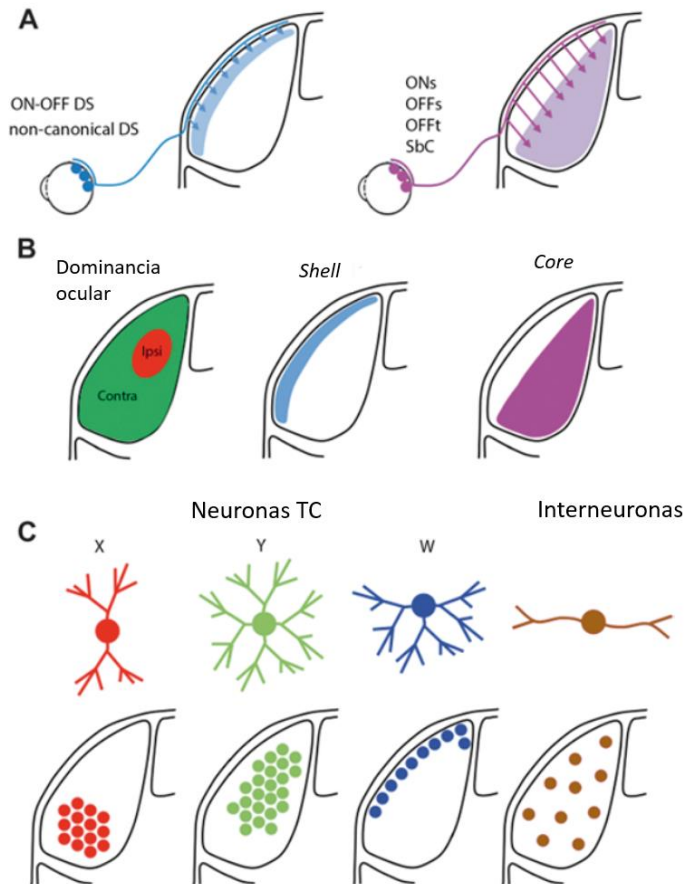
En roedores en el dNGL se pueden distinguir una serie de zonas (Reese, 1988) que se diferencian por la organización espacial y funcional de las aferencias que reciben de la retina, según 3 criterios: a) si reciben aferencias de CGR de la retina ipsilateral o de la contralateral; b) por el tipo funcional de CGR de las cuales reciben información; c) por la zona de la retina (N, C o T) en la que se encuentra la CGR de la cual reciben información (Huberman *et al.*, 2008). Según lo anterior, se distinguen en el dNGL (Fig. 14): la parte dorsolateral o *Shell* y la parte ventromedial o *Core* (Reese, 1988).

El dNGL en roedores recibe entre un 5-10% de axones de las CGR de la retina ipsilateral que terminan en el *core*, aunque también recibe algunas aferencias de CGR del ojo contralateral; mientras que el *shell* recibe aferencias principalmente de CGR del ojo contralateral y muy pocas del ipsilateral (para revisión consultar: Monavarfeshani *et al.*, 2017). Por otro lado, las proyecciones que reciben el *core* y *shell* del dNGL están organizadas según el tipo funcional de la CGR que envía la información (para revisión consultar: Monavarfeshani *et al.*, 2017 y Kerschensteiner & Guido, 2017) (Fig. 14 y 15).

Existe un mapa retinotópico en el dNGL (Fig. 15) que representa el área de la retina (nasal, central o temporal) en la cual se encuentra la CGR que envía información al dNGL (Monavarfeshani *et al.*, 2017), así, CGR vecinas sinaptarán con las células del dNGL vecinas, lo que permite mantener la representación espacial de la información desde la retina al dNGL (Huberman *et al.*, 2008). Los axones de las CGR de la retina temporal terminan principalmente en el dNGL en la parte superior; las de las CGR de la zona central terminan en la zona medial del dNGL, y las que proceden de la retina nasal terminan en la porción inferior del dNGL (Monavarfeshani *et al.*, 2017).



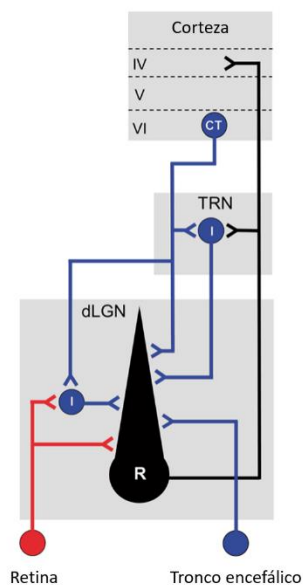
**Figura 14. Organización de las proyecciones retinianas en los núcleos del núcleo geniculado lateral (NGL).** A. Sección coronal de un cerebro de ratón teñido con Nissl. Las flechas indican la localización del núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL), folículo intergeniculado (IGL) y núcleo geniculado lateral ventral vNGL. La imagen está tomada del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). B-D. Representación esquemática de una sección coronal del núcleo geniculado lateral de roedores nocturnos. B. Muestra la separación de las proyecciones retinianas procedentes de las células ganglionares de la retina del ojo ipsilateral y del ojo contralateral, en el dNGL, IGL y vNGL. Las terminales de las proyecciones retinianas ipsilaterales se representan como puntos verdes; las terminales de las proyecciones retinianas contralaterales se representan como puntos naranjas. Las células ganglionares de la retina (CGR) de las que surgen estas proyecciones se muestran en las secciones transversales de la retina. La línea discontinua en el dNGL representa el límite aproximado que separa *shell* dorsolateral (s) del *core* ventromedial (c). La línea discontinua en vNGL representa el límite que separa la capa externa (e) de la capa interna (i). C. Representa la topografía de las terminaciones en dNGL, vNGL e IGL, de las células ganglionares de la retina según su localización en la retina nasal, central o temporal. Los colores representan la localización temporal (T) a nasal (N) de las CGR en la retina. D. Muestra la terminación de los axones de algunos de los tipos funcionales de CGR, en el dNGL, vNGL e IGL. Los colores representan algunas clases de CGR estudiadas en ratones transgénicos. Los nombres de estas líneas de ratones se indican entre paréntesis. Los puntos coloreados en dNGL, IGL y vNGL representan los lugares de llegada de los axones de dichas CGR. dsCGR: célula ganglionar de la retina selectiva a dirección; ipCGR: ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles. Tomado de Monavafshani *et al.*, 2017 y modificado.



**Figura 15. Esquema de la organización del Núcleo Geniculado Lateral dorsal (dNGL) de ratón.** **A.** Patrón de proyecciones de diferentes tipos de células ganglionares de la retina (CGR). **B.** Laminación oculta en el núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) de ratón. Izquierda: Patrón específico de las proyecciones retinianas procedentes del ojo contralateral (verde) e ipsilateral (rojo). Derecha: Subdivisiones *shell* (azul) y *core* (púrpura). *Shell* recibe la entrada convergente de las CGR específicas de dirección y de las capas superficiales del colículo superior. *Core* recibe información de las CGR con una organización centro-periferia. **C.** Arquitectura dendrítica de diferentes clases de neuronas de relevo (X, Y, W) e interneuronas del dNGL, junto con sus localizaciones principales en el mismo. Tomado de Kerschensteiner & Guido., 2017 y modificado.

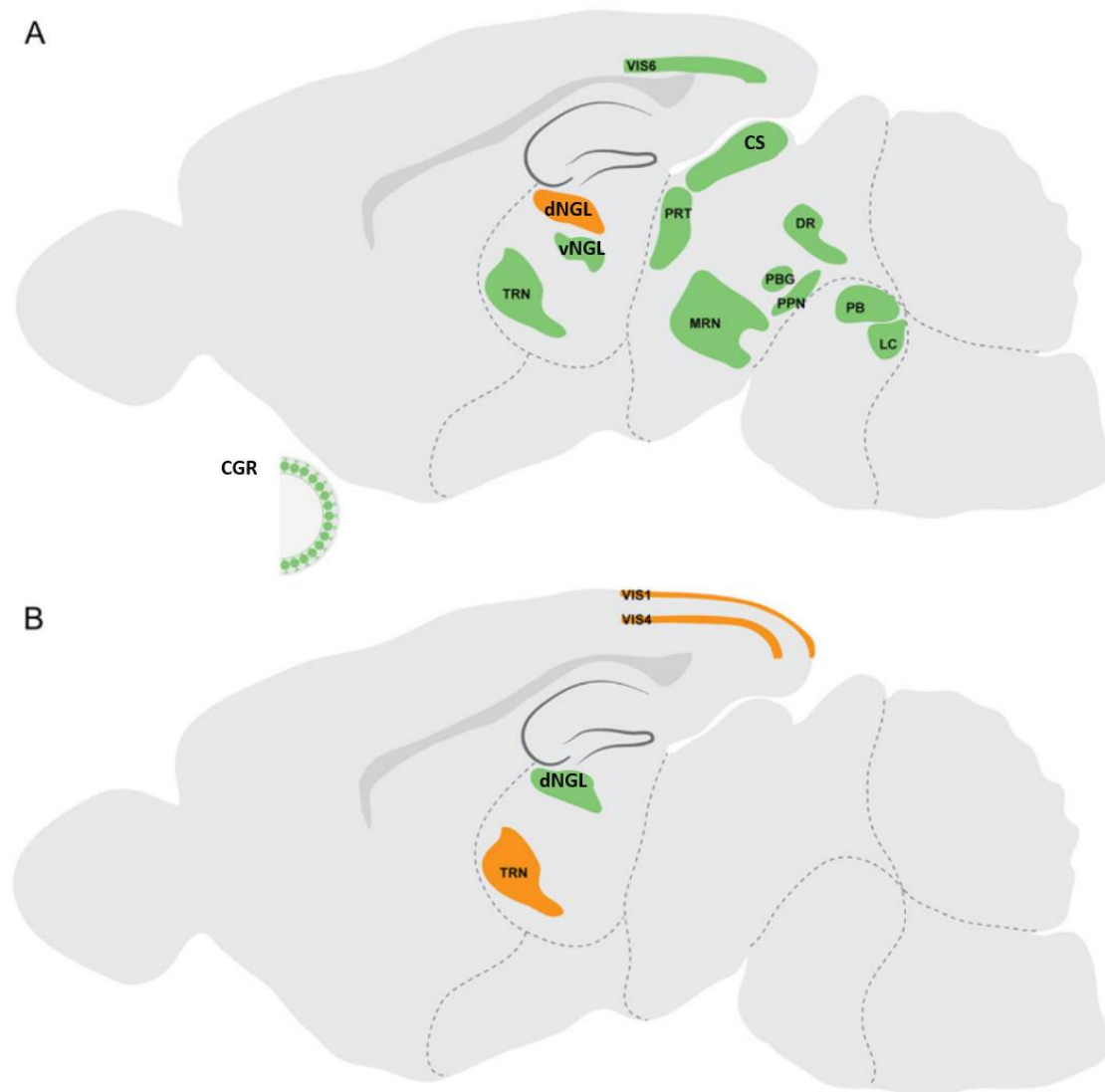
Una vez analizada la organización del dNGL que, como hemos indicado, está determinada por el patrón de aferencias retinianas que recibe, es necesario conocer las poblaciones celulares del dNGL diana de dicha información. Hay dos tipos de células presentes en el dNGL, las neuronas principales o talamocorticales (TC), y las interneuronas (para revisión consultar: Kerschensteiner & Guido, 2017; Monavarfeshani *et al.*, 2017). En cuanto a morfología, las TC presentan un axón grueso y no ramificado, un soma grande y redondo y un árbol dendrítico multipolar y muy complejo. Existen en roedores 3 tipos de células TC: células bicónicas o tipo X, células simétricas o tipo Y y células hemisféricas o tipo W (Fig. 15 C; Krahe *et al.*, 2011).

Cada una de ellas se encuentra mayoritariamente en una zona concreta del dNGL: las células X están en la región ventral a la que llegan axones de las CGR del ojo contralateral; las células Y se encuentran en la región central, sería la parte del *core* del dNGL que recibe aferencias de las CGR tanto del ojo ipsilateral como del contralateral; y las células W están exclusivamente en la zona dorsal o *shell* del dNGL que recibe axones de las CGR del ojo contralateral (Fig. 15 C; Krahe *et al.*, 2011; Bickford *et al.*, 2015; Kerschensteiner & Guido, 2017). Las interneuronas tienen soma fusiforme y unos pocos procesos sinuosos y se encuentran dispersas por todo el dNGL (para revisión consultar: Kerschensteiner & Guido, 2017). Ambas poblaciones celulares reciben proyecciones desde la retina, pero únicamente las TC son capaces de enviar su axón hacia áreas fuera del NGL (Pinault, 2004). Las interneuronas establecen conexiones inhibitorias solo con las TC (Fig. 16).



**Figura 16. Diagrama de circuito del núcleo geniculado dorsal (dNGL).** Representa las conexiones retinianas (rojo) y no retinianas (azul) de las interneuronas intrínsecas y las neuronas de relevo talamocorticales del dNGL de ratón. I, interneuronas; R, receptor; TRN, núcleo reticular talámico. Tomado de Kerschensteiner & Guido, 2017 y modificado

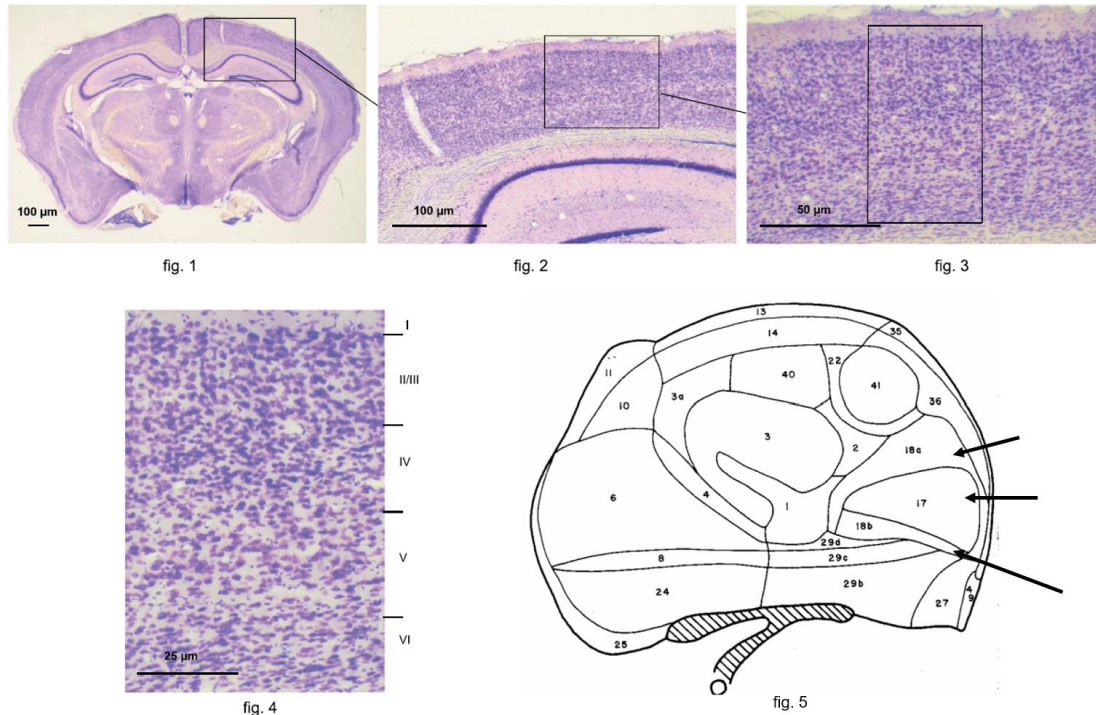
Además de las aferencias retinianas, al dNGL también le llegan aferencias no retinianas encargadas de generar respuestas moduladoras o inhibitorias (para revisión consultar: Monavafshani *et al.*, 2017) (Fig. 17). Hay que destacar, entre otras, las aferencias de: neuronas glutamatérgicas del CS ipsilateral que sinaptan con las células W y parece que contribuyen al procesado y transmisión de la información visual selectiva a la dirección del movimiento (Bickford *et al.*, 2015); las aferencias de la capa VI de la V1, que acaban en las porciones más distales de las dendritas de las células TC y en las interneuronas del dNGL, parece que tienen una función moduladora (Sherman, 2016). En cuanto a las aferencias inhibitorias, hay que destacar la que reciben de las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular talámico (Fig. 17) que es una región que en los roedores nocturnos forma una cubierta lateral alrededor del tálamo dorsal (Pinault, 2004). Respecto a las eferencias de las células TC del dNGL (Fig. 16) se dirigen siempre a dos regiones ipsilaterales: la corteza visual primaria y la zona del núcleo reticular talámico (Jurgens *et al.*, 2012). Estudios recientes han demostrado que las proyecciones hacia la corteza visual primaria presentan cierta organización topográfica, las células TC-W sinaptan con las dendritas que se encuentran en la capa I de la V1; mientras que los subtipos X e Y envían información a la capa IV (Cruz-Martín *et al.*, 2014; Bickford *et al.*, 2015).



**Figura 17. Proyecciones aferentes y eferentes del núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) en roedores.** **A.** Las zonas origen de las proyecciones aferentes al dNGL están coloreadas en verde. **B.** Las regiones cerebrales inervadas por las eferencias del dNGL están coloreadas en naranja. vNGL, núcleo geniculado lateral ventral; TRN, núcleo reticular talámico; CS, colículo superior; PRT, región pretectal; MRN, núcleo reticular del mesencéfalo; DR, núcleo del rafe dorsal; PPN, núcleo pedunculopontino; PBG, núcleo parabigeminal; PB, núcleo parabraquial; LC, *locus coeruleus*; VIS1, corteza visual, capa I; VIS4, corteza visual, capa IV; VIS6, corteza visual, capa VI; CGR, células ganglionares de la retina. Tomado de Monavarfeshani *et al.*, 2017 y modificado.

### 1.5. Corteza Visual Primaria

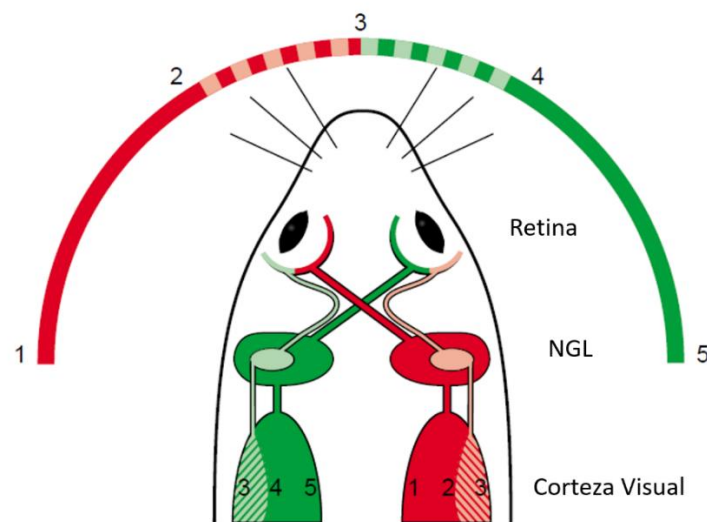
La corteza visual en roedores incluye un área visual primaria (V1), la 17; y dos áreas extraestriadas, la 18 (de situación lateral) y la 19 (medial) (Fig. 18; Caviness, 1975; Sefton *et al.*, 2015).



**Figura 18. Esquema de la corteza visual (V1) del ratón.** Fig. 1: sección cerebral completa; Fig. 2: detalle en recuadro de la Fig. 1 con la corteza visual; Fig. 3: histología de la corteza visual; Fig. 4: parte ampliada del área visual con las capas típicas I-VI-Nissl; Fig. 5: representación del mapa neocortical del ratón normal. Tomado de Caviness, 1975; Himmelhan *et al.*, 2018 y modificado.

La corteza visual primaria (V1) o corteza estriada está localizada en el lóbulo occipital y constituye el siguiente núcleo de relevo en el análisis de la información visual. En roedores nocturnos no ha sido tan estudiada como en otras especies diurnas, pues no dependen tanto de la información visual para tener un mapa representativo del exterior por lo que se ha dado más importancia al estudio de las cortezas de las cuales son más dependientes: la somatosensorial y olfativa (para revisión consultar: Hübener, 2003).

Estudios previos que han realizado el mapeo de imágenes desde el campo visual hasta la V1 de ratón, mediante técnicas electrofisiológicas y ópticas, han demostrado que en la V1 de cada hemisferio existe una representación completa y continua del campo visual contralateral (Dräger, 1975). La lateralización de los ojos en roedores hace que el campo visual binocular sea muy pequeño, por lo que solo un tercio de la V1, la parte más lateral en cada hemisferio recibe información visual de ambos ojos (Fig. 19). Además, como la mayoría de los axones de las CGR decusan en el quiasma óptico, aunque la mayoría de las neuronas de la V1 binocular pueden ser estimuladas por información procedente de ambos ojos, existe una dominancia del ojo contralateral frente a la información que reciben del ipsilateral (Dräger & Olsen, 1980; para revisión consultar: Hubener, 2003). También se ha demostrado que, en los roedores, al igual que en otros mamíferos, el campo visual superior se representa en la mitad inferior de V1.



**Figura 19. Esquema del sistema visual de roedores.** El campo visual comprendido entre 1-2 (rojo) y entre 4 y 5 (verde) es captado por la retina nasal y central del ojo ipsilateral correspondiente, cuyas fibras decusan y sinaptan en el núcleo geniculado lateral (NGL; rojo oscuro y verde oscuro) y corteza visual primaria (V1) contralateral (zonas 1-2 y 4-5). El campo visual localizado entre 2-3 (rojo y rosa), es captado por parte de la retina nasal y central del ojo ipsilateral (rojo) cuyas fibras decusan en el quiasma, y por parte de la retina temporal del ojo contralateral (rosa) cuyas fibras continúan ipsilateralmente; esta información acaba en el NGL contralateral, zonas roja y rosa respectivamente; y desde él terminan en la zona 3 de la V1 contralateral. Lo mismo ocurriría con el campo visual comprendido entre 3 y 4 (verde y verde claro), pero en el lado contralateral. En la V1 las respuestas binoculares se encuentran en el tercio lateral de esta área. Los números en el campo visual y en la corteza visual demuestran la organización retinotópica. El "3" situado en el centro del campo visual está representado en ambos hemisferios, ya que el córtex visual primario contiene una pequeña representación del campo visual ipsilateral. Tomado de Hübener, 2003 y modificado.

La V1, a nivel histológico, está muy conservada evolutivamente entre los mamíferos y, en general, está organizada en 6 capas (de la I, la más superficial, a la VI, la más profunda). En roedores se han descrito pequeñas diferencias estructurales y funcionales respecto a otras especies (para revisión consultar: Hubener, 2003), entre las que destacan: la ausencia de *blobs*, áreas corticales sensibles al color; y no está clara la existencia de columnas corticales funcionales, solo se han descrito columnas similares a las de dominancia ocular, pero mucho menos desarrolladas. Las capas del área 17 son (para revisión consultar: Ortiz, 2006):

- Capa I: es la más superficial, es delgada y contiene pocas células.
- Capa II y III: los límites entre ellas son difíciles de establecer, en conjunto ocupan en profundidad casi el 45% del espesor total de la V1.
- Capa IV: posee neuronas pequeñas y es una capa que ocupa casi el 55% del espesor de la V1.
- Capa V: contiene cuerpos celulares de tamaño medio y grande.
- Capa VI: es la capa más profunda y se subdivide en dos subcapas. La capa VIa, con neuronas pequeñas situadas en líneas verticales, parecidas a las de la capa IV; y la capa VIb que también contiene células pequeñas pero que se disponen en horizontal (Peters *et al.*, 1985).

La organización histológica de las áreas corticales visuales presenta algunas diferencias entre sí: la densidad celular de las capas II a VI son más o menos homogéneas; pero en el área visual secundaria (área 18), los límites entre las capas II y III se pueden distinguir (Miller & Vogt, 1984).

Las células corticales se pueden clasificar según diversos criterios como pueden ser las características morfológicas, la conectividad o las propiedades electrofisiológicas, entre otras. Muchos investigadores han intentado establecer una clasificación única que agrupe todos los criterios, pero resulta imposible, lo que ha llevado a discrepancias en la nomenclatura entre los distintos estudios consultados. La reciente incorporación de la transcriptómica ha permitido clasificar las células corticales unificando algo más los diferentes criterios anatómicos, fisiológicos y de conectividad (para revisión consultar: Zeng & Sanes, 2017; Cheng *et al.*, 2022) en V1 de roedores.

Así, considerando los diversos criterios de clasificación e incluyendo el más reciente de transcriptómica, se han establecido 3 grandes grupos celulares en la corteza de mamíferos, incluyendo los roedores (para revisión consultar: Zeng & Sanes, 2017, Cheng *et al.*, 2022): neuronas glutamatérgicas, neuronas GABAérgicas, y células no neuronales.

Algunas características de ellas son:

- Células glutamatérgicas (Fig. 20 y 21), de las que se han descrito 5 subclases según sus características morfofuncionales: neuronas de proyección local de la capa IV, neuronas de proyección cortico-cortical (neuronas de proyección callosa o neuronas intratelencefálicas), neuronas de proyección subcerebral (o neuronas del tracto piramidal), neuronas de proyección cortico-talámicas, y neuronas de la subplaca de la capa VIb (para revisión consultar: Zeng & Sanes, 2017). Las neuronas de la capa IV son las principales dianas postsinápticas de los núcleos sensoriales talámicos, pueden subdividirse a su vez en células estrelladas espinosas y células piramidales estrelladas. Sus axones y los de las neuronas de la subplaca de la capa VIb se proyectan localmente a regiones cercanas. Las neuronas intratelencefálicas, se concentran en la capa II/III y en la capa V superior (a menudo denominada capa Va), pero también están presentes en las capas V y VI. Se proyectan a otras muchas áreas corticales, tanto ipsilateral como contralateralmente, y al cuerpo estriado. Las neuronas del tracto piramidal, situadas en la capa Vb se proyectan a múltiples áreas subcorticales del cuerpo estriado, el tálamo, el mesencéfalo, el rombencéfalo y, en ocasiones, incluso a la médula espinal. Las neuronas cortico-talámicas están situadas en la capa VI y proporcionan principalmente proyecciones de retroalimentación a los núcleos talámicos de entrada. Además, gracias a los estudios de proteómica se ha descrito la existencia de 8 subclases de neuronas excitatorias en V1, en función a los marcadores que expresan.

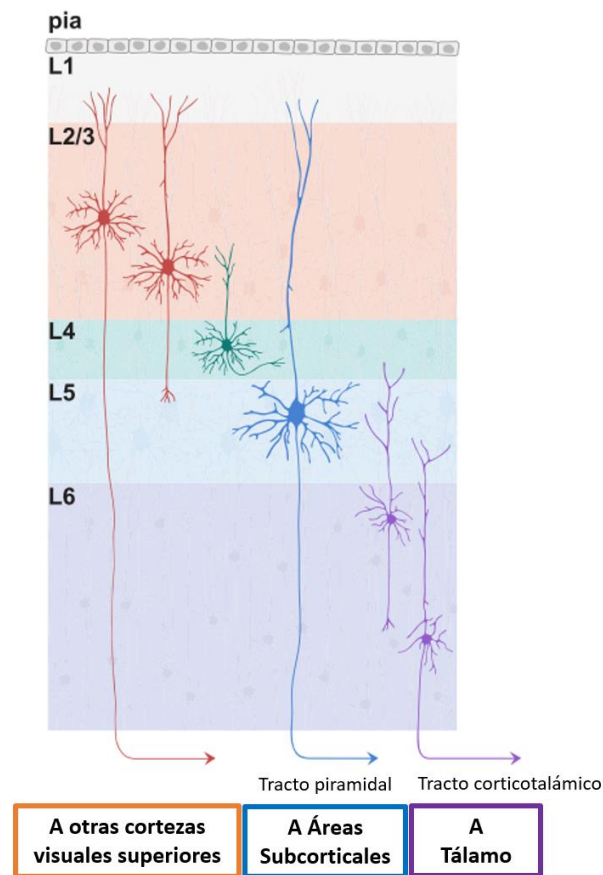
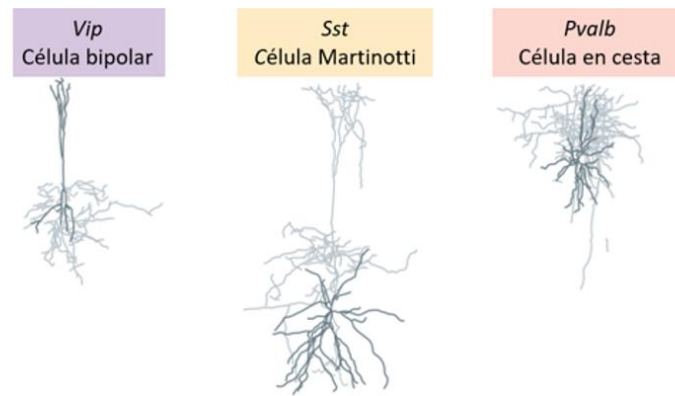


Figura 20. Esquema de las neuronas glutamatergicas en la corteza visual primaria (V1) dispuestas en las capas L1-L6. Tomado de Cheng *et al.*, 2022 y modificado.

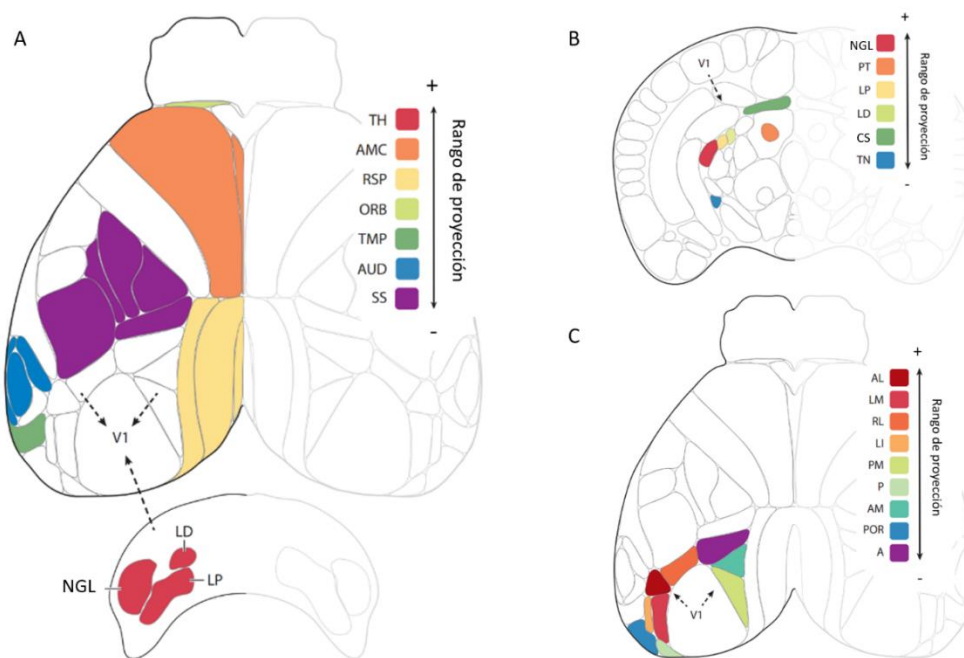
- Neuronas GABAergicas inhibitorias, se distinguen 4 subtipos que se denominan según los marcadores neuroquímicos que expresan: parvalbúmina (PVALB+), somatoestatina (SST+), péptido intersticial vasoactivo (VIP+) y receptor 3A de la 5-hidroxitriptamina sin VIP (HTR3A+VIP-); y 2 subgrupos más pequeños que expresan *Stac* y *Frem1*. A su vez se pueden establecer subtipos de cada uno de los anteriores dependiendo de la morfología de sus dendritas y axones. Las PVALB+ se dividen en células en cesta y células de araña; las SST+ en células de Martinotti y células no Martinotti, las VIP+ en bipolares y multipolares y las TR3A+VIP- en neurogliaformes y células de ramo único (para revisión consultar: Zeng & Sanes, 2017).
- Células no neuronales, donde se incluyen varios tipos de células gliales: oligodendrocitos, astrocitos y microglía.



**Figura 21. Esquema de las neuronas GABAérgicas de la corteza visual primaria (V1).** Esquema representativo de las 3 subclases de neuronas GABAérgicas corticales obtenidas de cortes cerebrales. Cada subclase presenta características morfológicas distintas. Se presentan las dendritas en gris oscuro y los axones en gris claro. La célula bipolar que expresa el péptido intestinal vasoactivo (*Vip*) se presenta en morado, la célula de Martinotti que expresa somatostatina (*Sst*) en amarillo y la célula en cesta que expresa parvalbúmina (*Pvalb*) en naranja. Tomado de Zeng & Sanes, 2017 y modificado.

La V1 en ratón presenta una elevada interconexión con otras áreas corticales y subcorticales (para revisión consultar: Froudarakis *et al.*, 2009). Respecto a las aferencias que recibe V1 (Fig. 22 A) destacar, entre otras, las que recibe: del NGL, que es la principal fuente de aferencias y está directamente implicada con la información visual; de áreas retroespinales, que parecen ser responsables de la coordinación de información visual y vestibular; del área orbital que coordina información olfativa y gustativa y media en la atención; de áreas temporales, que parece estar relacionada con la visión de objetos y su implicación en la memoria de procesamiento y la localización espacial; o de la corteza somatosensorial, que parece ayudar en la posición del cuerpo en el espacio. En cuanto a las eferencias (Fig. 22 B y C) (para revisión consultar: Froudarakis *et al.*, 2009) destacar, entre otras, las que envía al NGL, que parecen implicadas en modular la información que recibe el NGL de la retina; al núcleo pretectal, implicado en los circuitos que median los reflejos pupilares y contiene células detectoras del nivel de iluminación ambiental; al núcleo lateral posterior del tálamo, implicado en la localización de objetos en movimiento; al núcleo lateral dorsal del tálamo, implicado en el aprendizaje espacial y la navegación; y al CS, implicado en el control de los movimientos oculares y de la cabeza y cuello.

Por último, la V1 del ratón presenta conexiones recíprocas con al menos 9 áreas visuales del neocórtex (Fig. 22 C) implicadas, cada una de ellas, en el control de distintos aspectos específicos más complejos del procesado de la información visual (para revisión consultar: Froudarakis *et al.*, 2009) como son, entre otros: la determinación de la dirección del movimiento de objetos en el campo visual, la agrupación de la información visual, la supresión de información visual de la periferia, y la extracción de información visual imprescindible para el movimiento y la orientación. Las conexiones recíprocas entre estas diferentes áreas visuales corticales parecen ayudar a la integración y refinamiento de las anteriores funciones.



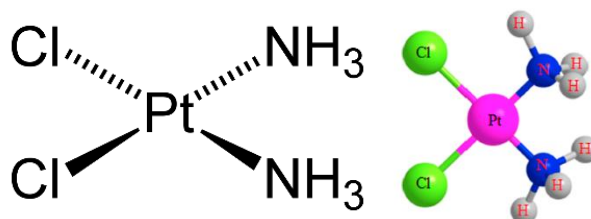
**Figura 22. Proyecciones aferentes y eferentes de la corteza visual primaria (V1).** **A.** Aferencias a V1. Se muestra una vista superior del neocórtex del ratón y los distintos núcleos que proyectan a V1. Las aferencias se muestran ordenada según la densidad de proyecciones que envían a V1, de mayor (color rojo) a menor (color morado). **B.** Eferencias no corticales desde V1. Vista coronal del cerebro de ratón y los núcleos que reciben proyecciones eferentes desde V1. Las eferencias se encuentran ordenadas de más densidad (color rojo) a menos (color azul). **C.** Eferencias corticales desde V1. Se muestra una vista superior del neocórtex de ratón y los núcleos que reciben proyecciones eferentes desde V1 ordenados de mayor (color rojo oscuro) a menos densidad (color morado). NGL, núcleo geniculado lateral; LP, núcleo lateral posterior del tálamo; LD, núcleo lateral dorsal del tálamo; TH, tálamo; AMC, áreas motoras secundarias y áreas cinguladas anteriores; RSP, áreas retrospleniales y postsubíulum; ORB, áreas orbitales; TMP, CA1 hipocampo; AUD, áreas auditivas; y SS, somatosensoriales; PT, núcleos pretectales; CS, colículo superior; TN, núcleos terminales; AL, VISal, área visual anterolateral; LM, VISIm, área visual lateromedial; RL, VISrl, área visual rostralateral; LI, VISli, área visual lateral intermedia; PM, VISpm, área visual posteromedial; P, VISp, área visual posterior; AM, VISam, área visual anteromedial; POR, VISpor, área visual postrhinal; A, VISa, área visual anterior. Tomado de Froudarakis *et al.*, 2019 y modificado.

## 2. TRATAMIENTO CON QUIMIOTERÁPICOS

En la actualidad, el cáncer sigue siendo la principal causa de muerte en todo el mundo (Ferlay *et al.*, 2020; World Health Organization: WHO, 2022), aunque se ha logrado reducir considerablemente su carga de morbilidad en los últimos años gracias a la aplicación de técnicas eficaces de prevención y diagnóstico precoz y a la aplicación de tratamientos adecuados. A pesar de los avances logrados en el tratamiento del cáncer el empleo de quimioterápicos, en su mayoría agentes alquilantes de diversa naturaleza, sigue siendo una estrategia muy extendida (Lind, 2011) y, entre todos ellos, cabe destacar el cisplatino (CIS), un agente alquilante derivado del platino, que ocupará un lugar central en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

### 2.1. Cisplatino

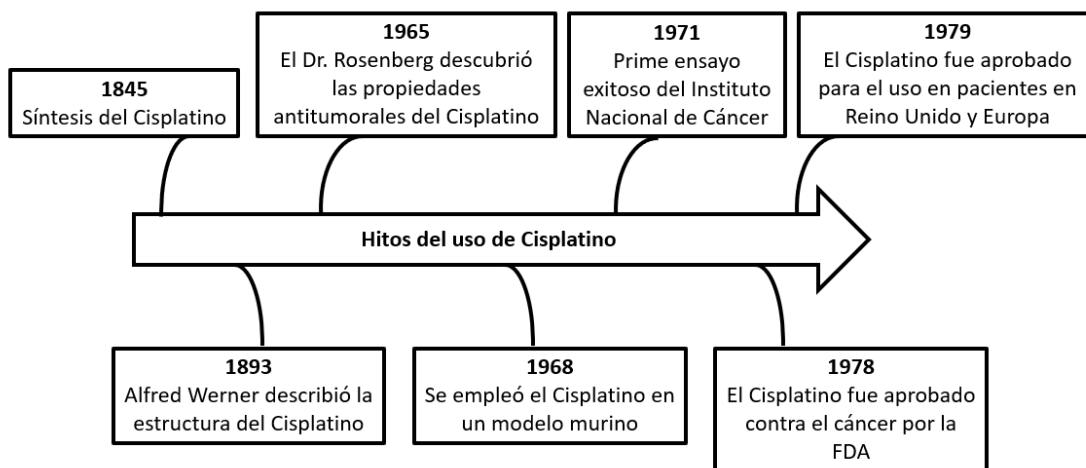
El cisplatino, o cis-diaminodicloroplatino (II), es el primer compuesto quimioterápico empleado (Hannon, 2007). Su estructura se basa en el platino, que ocupa una posición central en la molécula y que se combina con dos grupos amino ( $\text{NH}_3$ ) y dos átomos de cloro (Cl) (Fig. 23).



**Figura 23. Estructura molecular y estructura 3D del cisplatino (CIS).** Tomado de Ghosh, 2019.

El CIS fue sintetizado por primera vez por M. Peyrone en 1845 (Peyrone, 1845) y su estructura química fue descrita por A. Werner en 1893 (Barry & Sadler, 2014). Sin embargo, no fue hasta 1965 que el Dr. Rosenberg describió, por casualidad, sus propiedades como agente inhibidor de la división celular (Rosenberg *et al.*, 1965). Posteriormente, demostró las propiedades antitumorales del CIS en cultivos celulares y en ratones (Rosenberg *et al.*, 1968), y más adelante se ampliaron estas evidencias a otros modelos animales (Schaeppi *et al.*, 1973).

Los resultados fueron tan satisfactorios que, en 1978, en Estados Unidos la FDA (*US Food and Drug Administration*) aprobó su uso en el tratamiento del cáncer testicular y de ovarios, y al año siguiente se aprobó su uso en el Reino Unido (Fig. 24) (Wiltshaw., 1979; y para revisión consultar: Ghosh, 2019; Ali *et al.*, 2022).



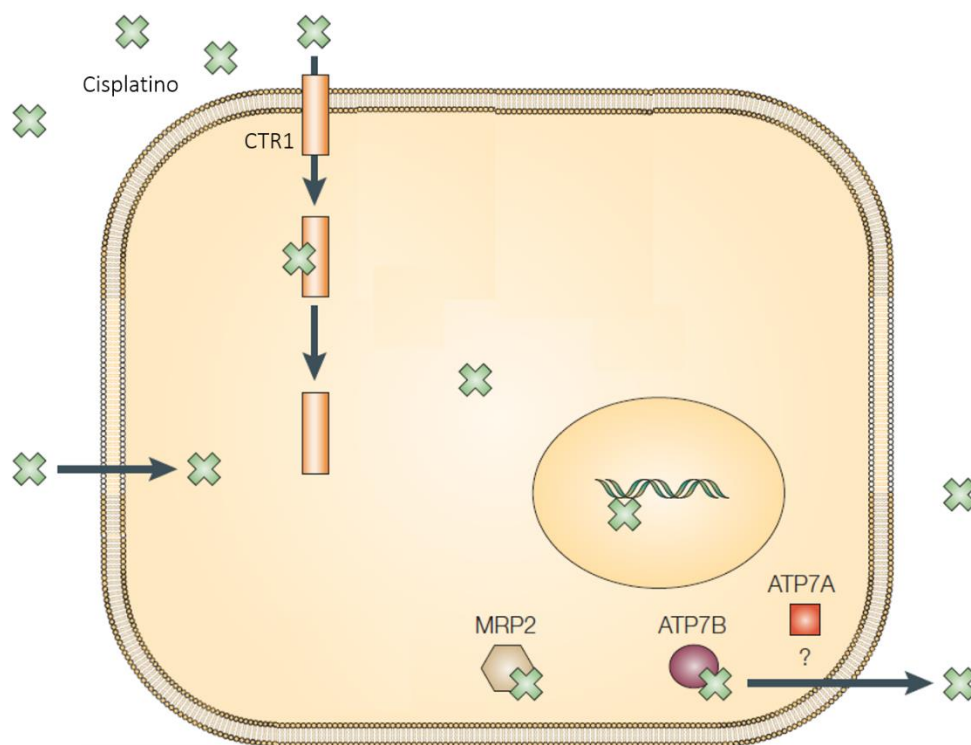
**Figura 24. Hitos del uso del cisplatino (CIS).** Tomado de Ghosh, 2019 y modificado.

El CIS ha sido ampliamente empleado en la clínica como agente antineoplásico en el tratamiento de múltiples tipos de cáncer, fundamentalmente sólidos, como son el cáncer de pulmón, de estómago, ovárico, testicular y de cabeza y cuello, linfomas o sarcomas (para revisión consultar: Ali *et al.*, 2022). Generalmente su administración es intravenosa, pero la toxicidad asociada a su uso ha limitado considerablemente su aplicación. La administración de CIS se ha relacionado con toxicidad a nivel renal, pero también se han descrito diversos fenómenos de neurotoxicidad que se tratarán en más detalle en los siguientes apartados.

## 2.2. Mecanismo de acción

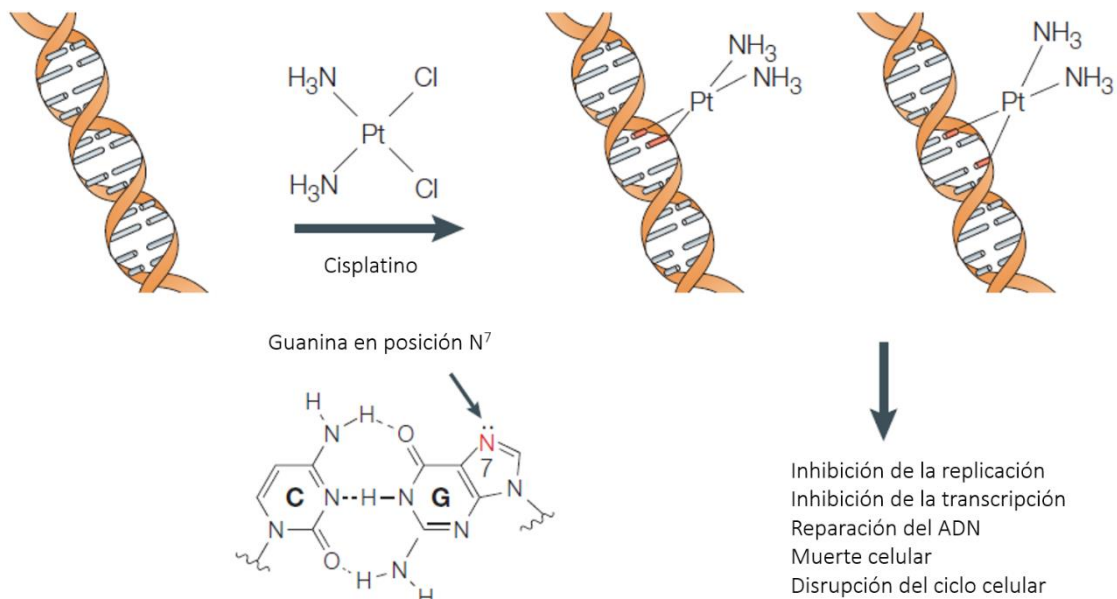
La administración de CIS generalmente se realiza por vía intravenosa, disuelto en solución salina. En el torrente sanguíneo el CIS se mantiene estable durante un tiempo prolongado y pasa al interior celular (Fig. 25) mediante difusión pasiva o a través de transportadores de membrana específicos, entre los que destacan los transportadores de cobre de tipo 1, Ctr1 (Pabla *et al.*, 2008), y los transportadores de cationes orgánicos (OCT), en particular la isoforma OCT2 (Ciarimboli *et al.*, 2005).

Además, la proteína encargada de la extrusión de múltiples fármacos y toxinas de tipo 1 (MATE1), también se ha relacionado con la salida de CIS de la célula (Nakamura *et al.*, 2010). Se ha identificado la expresión de estas tres proteínas a nivel renal, y los tres mecanismos han sido relacionados con la nefrotoxicidad inducida por el CIS (para revisión consultar: Wang & Lippard, 2005; Ghosh, 2019. Qi *et al.*, 2019). Una vez en el interior de la célula, la concentración de Cl es menor a la del torrente sanguíneo, por lo que las moléculas de cloro son desplazadas por H<sub>2</sub>O generando especies mono- y di-cuoaminoplatino (II) cargadas positivamente. En cualquiera de las dos formas el CIS ejerce sus mecanismos antineoplásicos al interferir con las moléculas de ADN formando vínculos solidos con bases nitrogenadas o con bases débiles de las proteínas (para revisión consultar: Ghosh., 2019).



**Figura 25. Mecanismos de movilización del cisplatino (CIS) a través de la membrana celular.** El CIS puede entrar en las células mediante mecanismos de difusión pasiva; o de forma activa mediante transportadores como el transportador de cobre CTR1. Los transportadores de cobre de tipo P (ATP7B) están implicados en la salida de cisplatino de la célula. Tomado de Wang & Lippard, 2005 y modificado.

En líneas generales, los principales mecanismos celulares por los que el CIS ejerce sus efectos citotóxicos son la captación y el transporte al interior celular; su unión a su diana principal que son las moléculas de ADN con las que forma aductos platino-ADN (Fig. 26) que activan cascadas de señalización que finalizan con la muerte de las células; su reconocimiento por las proteínas de respuesta al daño; y la transducción de señales que conducen a la detención del ciclo celular, la reparación y/o la muerte celular (para revisión consultar Wang & Lippard, 2005; Qi *et al.*, 2019).



**Figura 26. Formación y efectos de los aductos del cisplatino (CIS).** El átomo de platino del CIS se une covalentemente a la posición N7 de las purinas para formar enlaces cruzados 1,2- o 1,3- intrahebra, y enlaces cruzados interhebra. Los aductos CIS-ADN provocan diversas respuestas celulares. Tomado de Wang & Lippard, 2005 y modificado.

### 2.3. Efectos adversos

El CIS continúa siendo uno de los compuestos quimioterápicos más empleados, aunque su eficacia antitumoral en ocasiones se ve afectada por los efectos adversos que produce, asociados, en muchas ocasiones a situaciones de sobredosis o acumulación de dosis altas (Astolfi *et al.*, 2013). Entre los principales efectos adversos descritos está la toxicidad renal, o nefrotoxicidad. La eliminación de CIS se realiza sobre todo a nivel renal, por lo que en el riñón se acumulan cantidades mayores de CIS que las observadas en otros órganos; esto provoca la nefrotoxicidad asociada a la administración de CIS. En la clínica, tras la administración de CIS se observan niveles mayores de creatinina en suero, y una reducción en la tasa de filtración glomerular (para revisión consultar: Qi *et al.*, 2019).

En el riñón, el CIS se acumula en las células del túbulo proximal y distal de la nefrona, provocando la muerte de estas células a través de diversos mecanismos en función de tiempo de exposición y de la concentración (Rabik & Dolan, 2007). Los mecanismos que provocan la nefrotoxicidad han sido ampliamente estudiados, se han descrito procesos de daño en el ADN tanto nuclear como mitocondrial, alteraciones en la homeostasis iónica, estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción mitocondrial, inflamación, activación de la cascada de MAPK, y de vías de señalización de apoptosis, entre otros (para revisión consultar: Qi *et al.*, 2019).

#### 2.4. Neurotoxicidad

Además de la nefrotoxicidad, la ototoxicidad es también frecuente tras la administración de CIS. El CIS se acumula durante largos periodos en la cóclea humana (Breglio *et al.*, 2017), y un 93% de los pacientes que reciben tratamiento con CIS sufren una pérdida irreversible de audición, siendo este efecto más acusado en la infancia (Knight *et al.*, 2005). En este caso, los mecanismos de ototoxicidad no están perfectamente definidos, aunque se ha descrito que los procesos de generación de radicales libres de oxígeno son críticos, al igual que los procesos de apoptosis e inflamación local (para revisión consultar Qi *et al.*, 2019).

El CIS produce también casos de neuropatía periférica en el 30% de los pacientes tratados con este fármaco (Podratz *et al.*, 2011). Estos casos suelen estar relacionados con un exceso de dosis acumulada, y los mecanismos descritos están asociados tanto con el daño a nivel del ADN nuclear como mitocondrial. El daño a nivel mitocondrial provoca un déficit energético gradual en las neuronas, y, dado que la mayor concentración de mitocondrias se localiza en la zona axonal, la administración de CIS provoca una degeneración del transporte axonal, entre otros efectos (Carozzi *et al.*, 2015; para revisión consultar Qi *et al.*, 2019).

La neurotoxicidad asociada al CIS afecta al sistema nervioso periférico (SNP), pero también se han descrito algunos casos de afectación del SNC. Aunque el CIS tiene un tamaño que no le permitiría el paso a través de la BHE, en determinadas situaciones como los casos de tumores o metástasis cerebrales, el uso de quimioterápicos o la combinación de fármacos, o incluso debido a la inflamación asociada al tratamiento con quimioterápicos, se puede producir la ruptura de la misma facilitando el acceso del CIS al interior del SNC incrementando las posibilidades de neurotoxicidad (para revisión consultar: Qi *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019). Entre los efectos adversos descritos tras la administración de CIS en pacientes con tumores sólidos, los relacionados con la neurotoxicidad suponen el 26% de los casos. Alguno de los síntomas observados son el síndrome de encefalopatía posterior reversible que se caracteriza por la aparición de dolores de cabeza, confusión y afectación en la visión (Zahir *et al.*, 2012). Aunque los síntomas más frecuentes fueron parestesias, cefalalgias, alteraciones del habla, afasia, agnosia, lipotimia, convulsiones, ataques de pánico e isquémicos transitorios, fallos visuales, déficits sensomotores y alteraciones de la coordinación motora (Astolfi *et al.*, 2013). En la presente Tesis Doctoral, de estos efectos secundarios, nos centraremos en los relacionados con la visión, analizando los posibles efectos tóxicos del CIS en la retina y la vía visual.

Son diversos los estudios en los que se han descrito alteraciones en la función visual tras la administración de CIS (Tabla 2; para revisión consultar: Schmid *et al.*, 2006) en general, en casos clínicos donde se han utilizado dosis elevadas de CIS. Estos pacientes presentan visión borrosa, pérdida de agudeza visual, alteraciones en la percepción del color en algunos casos, alteraciones en los registros de electroretinogramas (ERG), situaciones de edema o daño isquémico, así como alteraciones en el epitelio pigmentario. En un estudio más reciente, se ha evaluado la posible toxicidad, *in vivo*, del CIS en la retina en una población de pacientes con cáncer de células germinales; en concreto se analizaron 14 sujetos (25-52 años, hombres) en quienes se estudió la agudeza visual, la visión en color, el grosor de la capa de fibras de la retina y los registros del ERG.

En este estudio, tras la administración de una dosis elevada de CIS (en media de 627 mg/m<sup>2</sup>) no se observaron alteraciones en la agudeza visual; sí se describió una disfunción en la visión en color en algunos sujetos (en 6 de los 14); alteraciones en los registros del ERG, indicando cambios moderados en los conos; y se describió, a través de la aplicación de la técnica de Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) una marcada reducción en el grosor de la CFNO (en 11 de los 14 pacientes) que se correlacionaba, además, con la dosis acumulada de CIS (Dulz *et al.*, 2017). Otro caso clínico es el descrito por Langevin *et al.* (2019), donde se observó retinopatía severa caracterizada por alteraciones en la TCO, en el ERG y pérdida de visión, debidas fundamentalmente al tratamiento con CIS. Aunque la dosis acumulativa del paciente era menor de 300 mg/kg, las patologías previas (grosor corneal bajo, fibrilación auricular) fueron predisponentes a producir retinopatía. Estos son, a nuestro entender, los primeros estudios que analizan la toxicidad del CIS en retina de forma directa. Es importante destacar que propone la aplicación de la técnica de diagnóstico oftalmológica, TCO, para la evaluación de la toxicidad retiniana en pacientes sometidos a tratamiento con CIS. La TCO ya ha sido propuesta como posible marcador temprano en el diagnóstico de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple (Costello & Burton, 2018) o la enfermedad de Alzheimer (López-Cuenca *et al.*, 2020).

**Tabla 2.** Principales estudios que muestran retinotoxicidad asociada a cisplatino (CIS) en humanos.

Referencia	Tipo de Estudio	Nº sujetos (edad, sexo) Tipo de cáncer	Cisplatino (dosis)	Duración del tratamiento	Análisis	Observaciones
Ostrow <i>et al.</i> , 1978	Caso Clínico (informe de un caso)	1 Carcinoma	No indicada	-	Análisis oftalmológico	Papiledema
		1 Cáncer de pecho				Neuritis retrobulbar
Becher <i>et al.</i> , 1980	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (57 años, mujer) Cáncer de vejiga	30 mg/día	7 ciclos (1 ciclo/5 días)	Análisis oftalmológico	Neuritis retrobulbar Reducción en la agudeza visual
Walsh <i>et al.</i> , 1982	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (3 años, mujer) Teratoma sacro coccígeo	120/60 mg/m <sup>2</sup>	> 10 ciclos	Estudio histológico <i>post-mortem</i>	Edema del disco óptico
Miller <i>et al.</i> , 1985	Estudio observacional	11 Glioma	200 mg (Intracarotidea) + BCNU	-	Agudeza visual EOG Angiografía Intravenosa fluorescente	Pérdida ipsilateral de agudeza visual Cambio en el epitelial pigmentario Caso: Síndrome del seno cavernoso
	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (20 años, mujer) Glioma	200 mg (Intracarotidea)	2 ciclos		Visión borrosa Pérdida agudeza visual Cambios en el epitelial pigmentario
Wilding <i>et al.</i> , 1985	Estudio retrospectivo/prospectivo	13 (35-73 años, mujeres) Cáncer de ovario	40 mg/m <sup>2</sup> (i.v.) / 200 mg/m <sup>2</sup> (i.v.)	2-4 ciclos (1 ciclo / 5 días)	Agudeza visual Campo visual Visión en color Potenciales evocados ERG	Visión borrosa Reducción en la agudeza visual Alteraciones en la precepción del color Alteración funcional en los conos Apariencia normal del disco óptico

Marmor <i>et al.</i> , 1993	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (68 años, mujer) Cáncer de ovario	248 mg, accidental	única	Agudeza visual Potenciales evocados ERG	Pérdida agudeza visual Problemas en la discriminación del color Anomalías en ERG
Caraceni <i>et al.</i> , 1997	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (52 años, mujer) Carcinoma ovárico	40 mg/m <sup>2</sup> (i.v.) / 160 mg/m <sup>2</sup> (i.v.) + Ciclofosfamida	4 ciclos (1 ciclo/ 4 días)	Agudeza visual Campo visual ERG	Neuropatía óptica Pérdida agudeza visual (monocular) Escotoma (monocular)
Al-Tweigeri <i>et al.</i> , 1999	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (50 años, mujer) Carcinoma de cuello uterino	75 mg/m <sup>2</sup>	6 ciclos (1 ciclo/mes)	Agudeza visual Análisis oftalmológico	Ceguera funcional
González <i>et al.</i> , 2001	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (42 años, hombre) Adenocarcinoma cerebelar	80 mg/m <sup>2</sup> (i.v.)	5 ciclos (1 ciclo/mes)	Agudeza visual Campo visual Potenciales evocados IRM	Neuropatía retrobulbar óptica (monocular)
Katz <i>et al.</i> , 2003	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (55 años, hombre) Linfoma	100 mg/m <sup>2</sup> (i.v.) Combinada en ESHAP	4 días	Agudeza visual ERG	Pérdida agudeza visual Problemas en la discriminación del color Alteración funcional en ERG Sin edema en el NO
					Estudio histológico de la retina <i>post-mortem</i>	Reducción de la capa CCG Reducción del grosor de la CNI Sin cambios en CNE y fotorreceptores

Dulz <i>et al.</i> , 2017	Estudio observacional	14 (26-37 años, hombres) Tumor de células germinales	413-1013 mg/m <sup>2</sup>	1-7 ciclos	Agudeza visual TCO ERG	No alterada Reducción del grosor de la CFNO en 11 pacientes (sobre todo en las zonas temporal e inferior) Alteración funcional de los conos en ERG
Langevin <i>et al.</i> , 2017	Caso Clínico (informe de un caso)	1 (56 años, hombre) Cáncer de pulmón de células pequeñas	149 mg	2 ciclos	Agudeza visual TCO ERG	Pérdida agudeza visual Alteración en la TCO (pérdida de zona elipsoide) Pérdida de visión y retinopatía

BCNU, 1,3-bis{2-chlorethyl}-l-nitrosourea; CCG, capa de células ganglionares; CFNO, capa de fibras del nervio óptico; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; d.a, dosis acumulada; ERG, electroretinograma; ESHAP, cisplatino, etopósido, dosis elevada de citarabina & metilprednisolona; i.v, intravenosa; NO, nervio óptico; TCO, tomografía de coherencia óptica.

## 2.5. Modelos preclínicos

Son numerosos los estudios en roedores que analizan los efectos tóxicos inducidos por el CIS en los diferentes sistemas. Se han descrito efectos nefrotóxicos tras la administración de CIS en ratas y ratones en un amplio rango de dosis: en ratones tras la administración de una única dosis 30 mg/kg (Lu *et al.*, 2008), y en ratas tras la administración de dosis únicas considerablemente más bajas, de 7.5 mg/kg (Kumar *et al.*, 2017); de 6mg/kg (Arita *et al.*, 2021), o incluso de 5 mg/kg (Humanes *et al.*, 2017). Tras la administración de dosis similares de CIS se han descrito también alteraciones a nivel del corazón (Gunturk *et al.*, 2019), a nivel del sistema gastrointestinal (Nardini *et al.*, 2020) y a nivel del sistema reproductor (Cherry *et al.*, 2004), o del sistema nervioso (Fumagalli *et al.*, 2021) entre otros (Qi *et al.*, 2019). La administración de CIS en roedores también provoca efectos sobre el SNC. Son varios los autores que describen alteraciones comportamentales tras la administración repetida de dosis bajas de CIS (2,3 mg/kg, i.p. 5 días, durante 2-3 ciclos) en ratones. Estos estudios (Tabla 3) demuestran la inducción de un marcado déficit cognitivo, también observado en humanos, y denominado en ocasiones como “chemobrain” (Argyriou *et al.*, 2011).

La posible retinotoxicidad del CIS también ha sido estudiada en modelos animales (Yazici *et al.*, 2014; Karakurt *et al.*, 2018; Raheem & Mahmood, 2023). Yazici *et al.*, 2014 (CIS, 16 mg/kg, i.p. durante 3 días) observó, mediante estudios histológicos, un incremento en el grosor de las capas de la retina, junto con un incremento en el índice de apoptosis de las capas nucleares, sugiriendo que el edema observado podría ser producido por un incremento en el estrés oxidativo y los procesos de inflamación. Tras la administración de dosis repetidas de CIS (5 mg/kg, i.p. durante 14 días) los efectos fueron más marcados, observándose una atrofia y desorganización en el segmento externo, la degeneración y desprendimiento del EP y de la coroides, la degeneración y un marcado edema de la CNI y la CPI, y la degeneración total de la CCG (Karakurt *et al.*, 2018). En el segundo de ellos (CIS, 7 mg/kg, i.p. dosis única), más reciente, se describió una marcada degeneración de las capas de receptores y de CGR junto con una marcada gliosis, que podría estar mediada por un incremento en el marcador proinflamatorio TNF $\alpha$  y la activación de la vía de la caspasa 3 (Raheem & Mahmood, 2023).

<b>Tabla 3. Modelos animales de daño orgánico por cisplatino (CIS) empleados en el estudio de la neurotoxicidad</b>						
<b>Referencia</b>	<b>Animales</b>	<b>Cisplatino (dosis, vía)</b>	<b>Tiempo a la evaluación</b>	<b>Test</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Resultado principal</b>
Shabani <i>et al.</i> , 2012	Ratas, <i>Wistar</i> , machos y hembras	5 mg/kg (i.p.) 3 ciclos de 1 dosis (7 días entre ciclos)	5 semanas	Rotarod & Test de agarre forzado	↓ tiempo en el Rotarod ↓ permanencia en el agarre (machos)	Alteración de la coordinación motora
				Campo abierto	↓ distancia recorrida ↓ menos tiempo en el centro (machos)	Comportamiento de tipo ansioso ↓ en hembras
				Laberinto acuático de Morris	↑ tiempo nadando	Trastornos en el aprendizaje
Zhou <i>et al.</i> , 2016	Ratones, C57/BL6J, hembra	2,3 mg/kg (i.p.) 3 ciclos de 5 dosis (5 días entre ciclos)	6-8 días	TRO	↓ índice de discriminación	Marcado déficit cognitivo
				RS	↓ umbral de retirada	
				Filamentos de Von Frey	↓ índice de discriminación	Alodinia mecánica
Chiu <i>et al.</i> , 2017	Ratones, C57BL/6, macho	2,3 mg/kg (i.p.) 2 ciclos de 5 dosis (5 días entre ciclos)	7 días	TRO	↓ índice de discriminación	Marcado déficit cognitivo
				LY	↓ alternancia entre brazos	
Chiang <i>et al.</i> , 2019	Ratones, C57BL/6, macho	2,3 mg/kg (i.p.) 2 ciclos de 5 dosis (5 días entre ciclos)	3-4 meses	TP	↑ tiempo para resolver la prueba	Marcado déficit cognitivo
				TRO	↓ índice de discriminación	
Alexander <i>et al.</i> , 2021	Ratones, C57BL/6J	2,3 mg/kg (i.p.) 2 ciclos de 5 dosis (5 días entre ciclos)	14 días	TP	↑ tiempo para resolver la prueba	Marcado déficit cognitivo
				TRO	↓ índice de discriminación	
				LY	↓ alternancia entre brazos	
Squillace <i>et al.</i> , 2022	Ratones, C57/BL6J, macho y hembra	2,3 mg/kg (i.p.) 3 ciclos de 5 dosis (5 días entre ciclos)	14 días	LT	↑ ensayos para alcanzar el criterio	Marcado déficit cognitivo
				TRO	↓ índice de discriminación	
				TP	↑ tiempo para resolver la prueba	

LT, laberinto en T; LY, laberinto en Y; RS, reconocimiento social; TP, test del puzle; TRO, test de reconocimiento de objetos

A lo largo de este apartado se han descrito los mecanismos de toxicidad asociados al CIS, en los diferentes sistemas. En el caso del SNC, tras consultar los resultados de los principales estudios publicados, podemos indicar que la administración sistémica de CIS puede provocar un incremento local en diferentes citoquinas proinflamatorias: TNF $\alpha$  en estructuras oculares (Raheem & Mahmood, 2023), IL1 $\beta$  en hipocampo (Squillace *et al.*, 2022); aunque algunos estudios no lograron observar fenómenos de neuroinflamación en regiones cerebrales específicas (Chiu *et al.*, 2017). Algunos autores han descrito un notable daño mitocondrial tras la administración de CIS, junto con un incremento en los fenómenos de oxidación celular (Alexander *et al.* 2021; Squillace *et al.*, 2022). Se ha descrito también que al menos parte de los efectos de la administración de CIS podrían estar mediados por el receptor TLR4 (receptor tipo Toll 4) que forma parte del sistema inmune innato (Squillace *et al.*, 2022), y al que se unen diversos metales. Esta vía de activación ha sido también descrita como mecanismo de acción para los efectos tóxicos del CIS a nivel renal (Zhang *et al.*, 2008), y para sus efectos ototóxicos (Babolmorad *et al.*, 2021). La activación de TLR4 mediaría la liberación de un elevado número de citoquinas y quimioquinas, entre ellas el TNF $\alpha$ , que activaría la vía de NF-kB exacerbando así la respuesta inflamatoria. Además, tras la activación de TLR4 se activan a su vez diversas vías y mecanismos, como los mediados por MyD88 o TRIF que resultan en la activación del inflamasoma mediado por NLRP3 (receptor tipo NOD con dominio pirina 3); (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito la implicación de NLRP3 en los mecanismos de neurotoxicidad, en concreto en la formación hipocampal se ha descrito un incremento en la expresión de esta molécula tras la administración sistémica de CIS en ratones (Squillace *et al.*, 2022).

### 2.6. Fármacos protectores frente a la toxicidad asociada al CIS

Como ya se ha descrito en profundidad en el apartado anterior, los efectos adversos, tóxicos, del CIS son numerosos y en la mayor parte de los casos dosis-dependientes. En el caso de la nefrotoxicidad, se emplea tanto la hidratación con suero salino como la diuresis osmótica como medidas de prevención en la clínica, con un éxito relativo (para revisión consultar: Dos Santos *et al.*, 2012). Sin embargo, en la actualidad no existen medidas que puedan prevenir los casos de neurotoxicidad y ototoxicidad, y sólo se aplican medidas tan drásticas como la reducción de la dosis y/o el cese del tratamiento, con las consecuencias que ello puede tener en la evolución del cáncer. Es, por tanto, una necesidad inminente encontrar agentes protectores que eviten (o atenúen) la aparición de los efectos neurotóxicos asociados al CIS, y, en la literatura encontramos varios trabajos que recogen información a este respecto (para revisión consultar: Qi *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020).

En general, se han propuesto compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti-apoptóticas y neurotróficas (para revisión consultar: Dos Santos *et al.*, 2020 donde se recoge un listado más exhaustivo). En la misma línea, es necesario encontrar compuestos que protejan frente a la retinotoxicidad asociada al CIS.

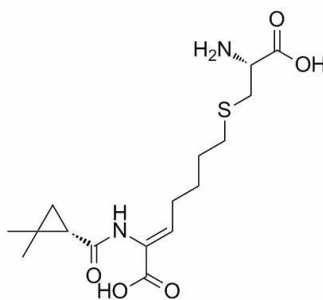
De hecho, en trabajos previos se ha propuesto el selenio como posible agente protector. El selenio es un oligoelemento esencial, que ha de incluirse en la dieta, que tiene importantes propiedades antioxidantes y neuroprotectoras, y que es además un componente importante de varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la tioredoxina reductasa y las seleno-proteínas (Ognjanovic *et al.*, 2012; Rezvanfar *et al.*, 2013; Yazici *et al.*, 2014). El selenio ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la toxicidad asociada al CIS a nivel renal (Ognjanovic *et al.*, 2012), en la espermatogénesis (Rezvanfar *et al.*, 2013), y más recientemente en la neurotoxicidad (Karavelioglu *et al.*, 2015) y la retinotoxicidad (Yazici *et al.*, 2014) donde el tratamiento con selenio fue capaz de reducir el número de neuronas apoptóticas en el cerebro y de limitar el edema retiniano asociado al CIS, disminuir el engrosamiento observado en la retina, y mostrar propiedades neuroprotectoras.

Se ha propuesto también el uso de la luteína, un importante carotenoide con importantes propiedades antioxidantes que ha demostrado ya su eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas de la retina (Brazionis *et al.*, 2008); en el tratamiento de la retinotoxicidad asociada al CIS, la coadministración de luteína resultó eficaz al evitar y/o prevenir el daño histopatológico observado, probablemente por sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias (Karakurt *et al.*, 2018). Más recientemente se ha propuesto el uso de azilsartán medoxomilo (AZIL), que actúa como antagonista del receptor de angiotensina II, tipo 1 (AT1), y que debería su eficacia a la modulación del sistema renina-angiotensina que parece tener un papel crucial frente al daño del CIS (Raheem & Mahmood, 2023), donde demuestra un gran papel antioxidante. Hasta donde hemos conseguido llegar en nuestra búsqueda bibliográfica, estos son los tres únicos trabajos que proponen nuevos fármacos para el tratamiento de la retinotoxicidad asociada al CIS, tratándose aún de estudios preclínicos sin conocimiento claro de su efectividad a nivel clínico. Es por ello por lo que sigue siendo urgente la necesidad de buscar nuevos compuestos protectores frente a la toxicidad del CIS que puedan aplicarse en la clínica. Es en este contexto donde surge nuestra propuesta de evaluar la posible eficacia de la cilastatina (CIL).

### 3. CILASTATINA, UN FÁRMACO PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO ASOCIADO AL TRATAMIENTO CON CISPLATINO

#### 3.1. Cilastatina, imipenem y enzima dehidrodipeptidasa renal I

La CIL es la sal monosódica del ácido (Z)-7-[(2R)-2-amino-3-hidroxi-3-oxopropil]sulfanil-2-[[[(1S)-2,2-dimetilciclopropanocarbonil]amino]hept-2-enoico (Fig. 27), con fórmula empírica  $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$  y un peso molecular de 280.44 Da . Es un fármaco que se emplea desde 1985 en la clínica en combinación con imipenem, un antibiótico  $\beta$ -lactámico de amplio espectro de la familia de los carbapenémicos, empleado en el tratamiento de infecciones polimicrobianas graves, abarcando a patógenos Gram-negativos, Gram-positivos, aerobios y anaerobios lo que lo hace idóneo para el tratamiento de aquellas infecciones que se muestran resistentes a otros antibióticos. A pesar de ser un antibiótico con un espectro antibacteriano inusual, es metabolizado rápidamente por el riñón, lo que reduce su permanencia en el organismo (Kropp *et al.*, 1982).



**Figura 27. Estructura molecular de la cilastatina.** Tomado de MedChemExpress., 2024.

La CIL fue creada para evitar el metabolismo renal del antibiótico, actuando como inhibidor competitivo de la enzima renal dehidropeptidasa renal I (DHP-I), que se localiza en el borde en cepillo de las células de los túbulos proximales renales (Parkin *et al.*, 2001). Esta enzima es una glicoproteína encargada de hidrolizar los dipéptidos presentes en el ultrafiltrado glomerular, rompiendo los enlaces peptídicos y resultando esencial en la recuperación y reabsorción de los aminoácidos en el túbulo proximal.

Además, DHP-I también puede romper el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem, generando metabolitos tóxicos para las células tubulares proximales y produciendo su muerte celular.

Al inhibirse la DHP-I renal con CIL, esta es incapaz de romper la estructura del imipenem, por lo que no se metaboliza tan rápidamente y permanece en el organismo más tiempo, incrementando su eficacia, además de reducir el riesgo de toxicidad renal asociada a su uso (Pastel, 1986). La dosis de empleo óptima de la CIL en combinación con el imipenem es de 1:1 imipenem/cilastatina, lo que asegura la permanencia del imipenem en el torrente sanguíneo al menos 8h (Norrby *et al.*, 1983).

Más recientemente se ha descrito también su capacidad para inhibir la acción de los transportadores de aniones orgánicos (OAT), que median la entrada de diversos fármacos, incluido el imipenem, en las células del túbulo proximal renal (Huo *et al.*, 2019); y de la megalina, transportador de la familia de receptores de LDL, que se expresa en las membranas apicales de las células epiteliales del túbulo proximal y que también participa en el transporte de diversos fármacos nefrotóxicos (Hori *et al.*, 2017).

### 3.2. Efectos protectores de cilastatina. Estudios preclínicos

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha descubierto y caracterizado los efectos protectores de CIL a nivel renal, en modelos animales y cultivos celulares, frente al fracaso renal agudo causado por fármacos nefrotóxicos como antibióticos (gentamicina, vancomicina), inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus), analgésicos (paracetamol) y quimioterápicos como el CIS (Pérez *et al.*, 2004; Tejedor *et al.*, 2007; Lázaro *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012; 2015, 2017; Jado *et al.*, 2020). Específicamente, hemos podido demostrar como la protección de la CIL frente al fracaso renal agudo inducido por CIS es capaz de reducir la muerte celular de las células tubulares por apoptosis reduciendo la activación de las caspasas 3 y 8 (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012), la inflamación, incrementando las citoquinas antiinflamatorias (como IL-10) y la reducción de las proinflamatorias, así como NF- $\kappa$ B y TNF $\alpha$  (Humanes *et al.*, 2010, 2012, 2017).

Además, la CIL ha demostrado tener también capacidad antioxidante al reducir los niveles de peróxido de hidrógeno e impedir el deterioro del perfil antioxidante endógeno a nivel renal y metabólico en ratas tratadas con CIS (Humanes *et al.*, 2012).

Más recientemente, también hemos demostrado que CIL puede tener también propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras en el SNC. Más concretamente en la retina de ratones sometidos a un modelo experimental de glaucoma, donde la administración sistémica de CIL fue capaz de atenuar y/o prevenir tanto la activación macroglial como microglial presente en la retina tras la inducción experimental de un glaucoma, así como de proteger el descenso observado en el marcador de CGR (Martínez-López *et al.*, 2024). Esta es, por tanto, la primera evidencia del potencial protector del CIL más allá del riñón a nivel de la retina, y, por tanto, del SNC.

### 3.3. Mecanismo de acción de cilastatina

En los últimos años se ha avanzado también en el conocimiento de los mecanismos de acción a través de los cuales la CIL es capaz de ejercer su efecto protector. En el riñón, CIL inhibe como se ha comentado la enzima DHP-I, que se encuentra presente en las balsas de colesterol de las células del túbulo proximal renal. Estas balsas son dominios ricos en colesterol y glicosfingolípidos, que están implicadas en procesos de transporte a través de la membrana (Zajchowski & Robbins, 2002). La CIL al interactuar con las balsas de colesterol altera la fluidez de éstas (Pérez *et al.*, 2004), impidiendo el correcto acoplamiento de los ligandos con los receptores presentes en ellas (Humanes *et al.*, 2012; Jado *et al.*, 2020; González-Nicolás, 2022) así como su endocitosis y recambio natural. Se ha demostrado que algunos de los receptores que se encuentran afectados por este hecho son TLR4 (Szabo *et al.*, 2007) o ligando de Fas (FasL) (Humanes *et al.*, 2012; 2017; Jado *et al.*, 2020). Sin embargo, CIL también puede impedir la reabsorción del CIS a través de la inhibición del receptor megalina también presente en las células de túbulo proximal renal, impidiendo así el efecto nefrotóxico del CIS (Hori *et al.*, 2017). Como consecuencia del bloqueo de los receptores, se produce la inactivación de rutas inflamatorias como la del NF- $\kappa$ B (Humanes *et al.*, 2017); así como la vía extrínseca de la apoptosis (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012, Jado *et al.*, 2020), lo que lleva a la supervivencia celular y la protección frente al fracaso renal.

### 3.4. Cilastatina un prometedor fármaco para su uso en la práctica clínica

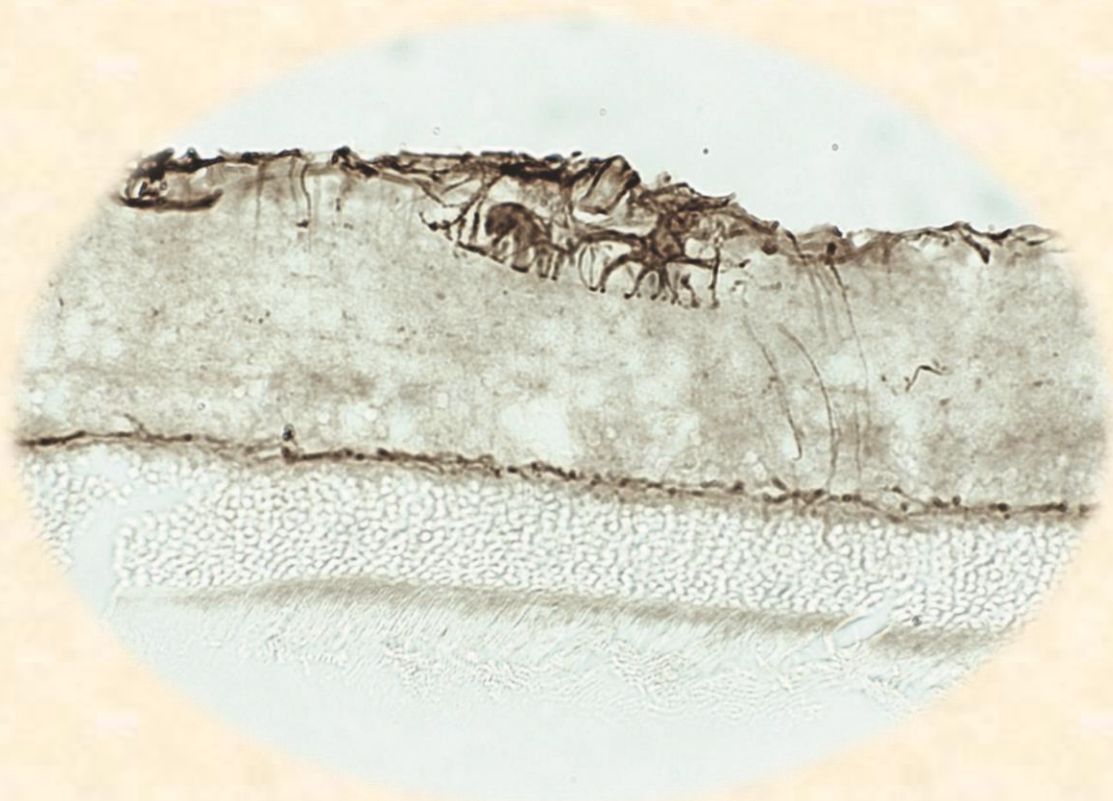
Aunque a nivel preclínico se han hecho todos los hallazgos acerca de la nefroprotección, también hay datos clínicos que apoyarían este hecho y por tanto la llegada de CIL hasta su uso clínico.

Se ha demostrado el efecto nefroprotector de la CIL (en la combinación imipenem/cilastatina) frente a la nefrotoxicidad causada por ciclosporina en pacientes sometidos a trasplante cardiaco, renal o de médula ósea (Markewitz *et al.*, 1994; Gruss *et al.*, 1996; Tejedor *et al.*, 2007). Recientemente, nuestro grupo de investigación también lo ha demostrado frente a la nefrotoxicidad del CIS en pacientes con carcinomatosis peritoneal sometidos a citorreducción y perfusión intraperitoneal intraoperatoria hipertérmica (HIPEC) con CIS (Zaballos *et al.*, 2021); y, en la actualidad, estamos llevando a cabo un ensayo clínico en fase II, empleando la CIL (sin el imipenem) como tratamiento nefroprotector en pacientes sometidos a HIPEC-CIS (Número EudraCT: 2022-001417-39).

En resumen, CIL es un fármaco seguro, ya empleado en humanos, aunque en combinación con imipenem; efectivo como nefroprotector en la toxicidad asociada al CIS; sin alterar las propiedades antitumorales del quimioterápico, al menos en modelos animales (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012; Arita *et al.*, 2021). CIL ha demostrado importantes propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas a nivel renal (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012; 2017), y más recientemente a nivel del SNC (Martínez-López *et al.*, 2024), lo que podría ser importante para disminuir a este nivel el daño causado por CIS



# OBJETIVOS



## ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

El cáncer es un grave problema de salud en nuestra sociedad, en el año 2020, se diagnosticaron 18,1 millones de casos nuevos (Sociedad Española de Oncología Médica: SEOM., 2023) y 10 millones de personas fallecieron a causa de este (*World Health Organization: WHO.*, 2022). El CIS se ha convertido en un fármaco habitual para el tratamiento clínico de tumores, pero su uso es limitado por los graves efectos secundarios tóxicos que causa. Si bien la nefrotoxicidad es el efecto que aparece con más frecuencia, existen alteraciones en otros órganos que afectan la calidad de vida del paciente como la neurotoxicidad que produce, entre otros, alteraciones cognitivas, auditivas y visuales. CIS no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pero se ha descrito en la bibliografía que factores como el aumento de citoquinas a nivel sistémico, lo cual CIS induce por su efecto nefrotóxico, son capaces de alterar la integridad de la barrera permitiendo su paso hacia el SNC. La necesidad de entender el mecanismo de la neurotoxicidad inducida por CIS y la búsqueda de un tratamiento farmacológico que ayude a paliar los efectos secundarios asociados a su uso, ha llevado a generar diversos modelos animales que intenten reproducir los síntomas observados en los pacientes y a probar posibles tratamientos, cuyo objetivo final será, en caso de obtener resultados positivos, poder trasladarlo a la clínica. Entre las muchas terapias propuestas para revertir los efectos nocivos del CIS, se ha demostrado una alta eficacia de las terapias antiinflamatorias, antiapoptóticas y antioxidantes. En el presente trabajo proponemos el tratamiento con un fármaco que reúne todas esas propiedades como es CIL y con el cual ya hemos obtenido resultados muy prometedores tanto en los casos de daño por CIS a nivel renal, o de daño en SNC, en concreto en la retina en un modelo animal de glaucoma (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.* 2012; 2017; Blanco-Codesido *et al.*, 2013; Martínez-López *et al.*, 2024).

## HIPÓTESIS

El estado actual del tema nos llevó a plantear la hipótesis de que una única dosis de cisplatino generará neurotoxicidad a lo largo de toda la vía visual en un modelo animal desarrollado en ratas y que la cilastatina será capaz de prevenir y/o revertir el daño que el cisplatino genera a nivel del sistema nervioso central.

## OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral evaluaremos en un modelo animal de rata el posible daño neurotóxico de la administración del agente antineoplásico cisplatino (CIS) en el sistema visual, y analizaremos el potencial efecto protector de la cilastatina (CIL).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

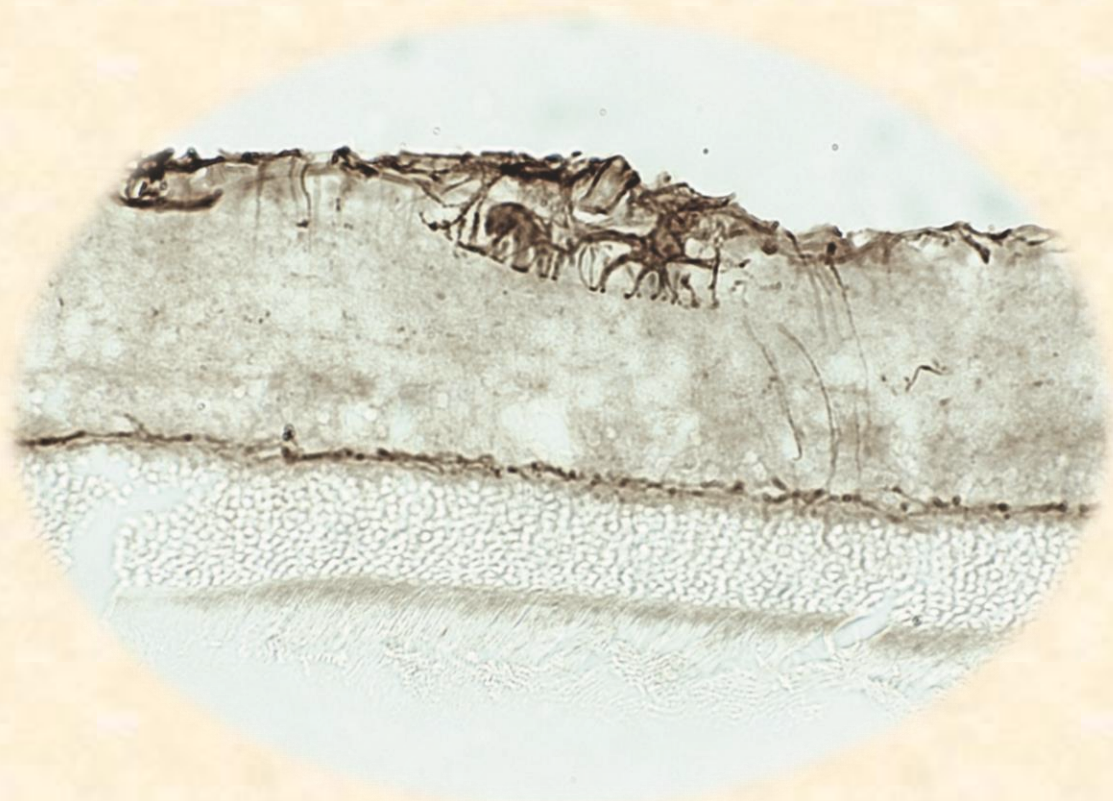
Con el fin de abordar el estudio del posible daño neurotóxico de la administración del agente antineoplásico CIS en el sistema visual se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto nefrotóxico de una única dosis de cisplatino, mediante el análisis de los principales parámetros bioquímicos afectados en clínica: creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre (NUS).
2. Realizar el diagnóstico no invasivo del daño por CIS en el Sistema Nervioso Central (SNC) mediante tomografía de coherencia óptica (TCO).
3. Caracterizar el efecto neurotóxico del CIS en retina por medio del estudio mediante inmunohistoquímica de tres poblaciones celulares: células ganglionares de la retina (CGR), células de macroglía y células de microglía, mediante el empleo de los marcadores Brn3a (homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A), GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado), respectivamente.

4. Caracterizar el efecto del fármaco experimental CIL en la retina por medio del estudio mediante inmunohistoquímica de tres poblaciones celulares: CGR, células de macroglía y células de microglía; mediante el empleo de los marcadores Brn3a, GFAP e Iba1, respectivamente.
5. Evaluar los mecanismos inflamatorios retinianos asociados a la neurotoxicidad por CIS, mediante el estudio por inmunofluorescencia de dos marcadores del inflammasoma: TLR4 (receptor tipo *Toll* 4) y NLRP3 (dominio pirina 3 de la familia NLR).
6. Caracterizar el efecto neurotóxico del CIS en la vía visual, en concreto en el colículo superior, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual primaria, por medio del estudio mediante inmunohistoquímica de tres poblaciones celulares: neuronas, células de macroglía y células de microglía, mediante el empleo de los marcadores NeuN (proteína de unión a hexaribonucleótidos-3), GFAP e Iba1, respectivamente.
7. Caracterizar el efecto del fármaco experimental CIL sobre la vía visual, en concreto en el colículo superior, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual primaria, por medio del estudio mediante inmunohistoquímica de tres poblaciones celulares: neuronas, células de macroglía y células de microglía; mediante el empleo de los marcadores NeuN, GFAP e Iba1, respectivamente.



# MATERIAL Y MÉTODOS



# MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente Tesis Doctoral se han empleado animales con fines experimentales, siguiendo la Directiva del Parlamento Europeo 2010/63/UE, y de acuerdo con la normativa española vigente recogida en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Local de Ética de la Universidad Complutense de Madrid (CEA-UCM) y recibió la aprobación final de la Autoridad competente correspondiente, la Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del territorio y Sostenibilidad de la Comunidad de Madrid (Ref. PROEX 284.3/21). Además, a lo largo de este estudio, se han considerado las Directrices ARRIVE (del inglés: *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*), tanto en la planificación, como en el desarrollo y redacción de los estudios realizados en animales (Kilkenny *et al.*, 2010; du Sert *et al.*, 2020).

## 1. ANIMALES

Se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) macho, de la estirpe *Wistar*, procedentes de *Charles River Laboratories* (Francia), que se alojaron en las instalaciones del Animalario de la UCM (CAI Animalario UCM, Nº de Registro: ES-28079-000086). A su llegada a las instalaciones, los animales fueron estabulados por parejas, en jaulas de policarbonato de 55x32x18 cm de tamaño, en condiciones controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa ( $60 \pm 10\%$ ), en un ciclo de luz/oscuridad de 12h (encendido de las luces programado a las 8.00h). Los animales se mantuvieron en condiciones de enriquecimiento ambiental durante el periodo de alojamiento, con tubos de cartón y/o piezas de madera en el interior de las jaulas. Asimismo, tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida en forma de pellets (Hybridpellet, Altromin®).

## 2. FÁRMACOS

### 2.1. CISPLATINO ( CIS)

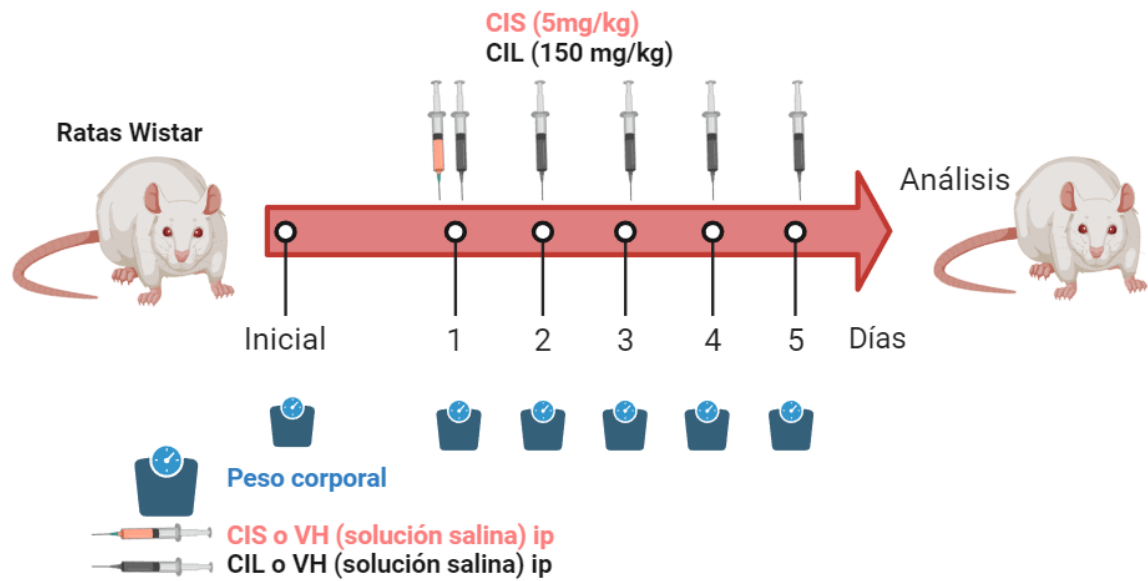
El cisplatino (CIS) [cis-diaminodicloroplatino (II)] se obtuvo de la farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM, Madrid, España), disuelto en solución salina (NaCl 0,9%) a una concentración de 1 mg/ml. En el día del tratamiento, el CIS se diluyó hasta alcanzar una concentración final de 0,5 mg/ml, que se administró a los animales por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 10 ml/kg. En base a estudios previos de nuestro grupo de investigación se decidió administrar una única dosis de CIS de 5 mg/kg (Humanes *et al.*, 2012; 2017). Los animales que no recibieron este fármaco recibieron una inyección i.p. del mismo volumen del vehículo (VH, solución salina).

### 2.2. CILASTATINA ( CIL)

La cilastatina (CIL) [sodio (Z)-7-[[[(2R)-2-amino-2-carboxietil] sulfanil]-2- [[[1 S)-2,2-dimetil ciclopropil] carbonil] amino]- hept-2-enoato], fue suministrada en polvo por Sun Pharmaceutical Industries Limited (India) al laboratorio de Fisiopatología Renal del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, HGUGM. La CIL se preparó a diario, disolviendo el fármaco en solución salina (NaCl 0,9%) hasta alcanzar una concentración de 30 mg/ml. Los animales recibieron una inyección diaria de CIL, durante un periodo de 5 días (cada 24h), a una dosis de 150 mg/kg, i.p., en un volumen de 5 ml/kg. Esta dosis y tiempo de administración fueron seleccionados en base a resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que la CIL demostró efectos nefroprotectores frente a diversos tóxicos (Jado *et al.*, 2020). Los animales que no recibieron este fármaco recibieron el mismo número de inyecciones i.p. del vehículo (VH, solución salina) al mismo volumen.

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales, tras su llegada a las instalaciones, estuvieron un periodo de habituación de, al menos, una semana. A continuación los animales se distribuyeron aleatoriamente entre los diferentes grupos experimentales: 1) Animales del grupo Control, que recibieron sólo inyecciones de solución salina (VH+VH); 2) Animales del grupo CIL, que recibieron inyecciones de solución salina y de CIL (VH+CIL); 3) Animales del grupo CIS, que recibieron una única administración de CIS y varias inyecciones de solución salina (CIS+VH); y 4) Animales que recibieron la combinación de fármacos, una única administración de CIS y varias inyecciones de CIL (CIS+CIL) (Fig. 28). El primer día de administración (día 1), los animales recibieron primero la única dosis de CIS (o su VH), e, inmediatamente después, la primera dosis de CIL (o su VH); los siguientes días los animales recibieron una única inyección diaria de CIL (o su VH) en la misma franja horaria (entre las 10.00h y las 13.00h). Durante este periodo, los animales se pesaron diariamente, y, el sexto día (día 6), se sacrificó a los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol). En esta Tesis se han empleado un total de 36 animales, distribuidos en dos cohortes: una primera en la que se usaron 8 animales (n=2 por grupo experimental, con un peso inicial de  $182,6 \pm 11,2$  g) para los estudios preliminares *in vivo* mediante TCO, y una siguiente en la que se emplearon los 28 animales restantes (n=6-8 por grupo experimental, con un peso inicial de  $270,78 \pm 19,59$  g) y cuyos tejidos se dedicaron a la realización de los estudios inmunohistoquímicos en SNC: retina y principales núcleos de la vía visual.



**Figura 28. Diseño experimental.** Ratas macho *Wistar* recibieron una única dosis intraperitoneal de cisplatino (CIS, 5 mg/kg, i.p., o su vehículo, VH, solución salina), el día 1 del tratamiento, junto con una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p., o su VH, solución salina) cuya administración se repitió durante un total de 5 días. El peso de los animales se registró a lo largo de todo el estudio. Al sexto día se realizaron los estudios *in vivo* de Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) y se sacrificó a los animales para los posteriores análisis y estudios inmunohistoquímicos. Se emplearon un total de 36 animales distribuidos en 4 grupos experimentales: VH+VH, VH+CIL, CIS+VH, CIS+CIL.

## 4. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (TCO)

La TCO es una técnica de diagnóstico oftalmológico que proporciona imágenes de alta resolución de la estructura retiniana. Esta técnica se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico oftalmológico para la observación transversal de las capas de la retina y permite, mediante el empleo de interferometría, realizar mediciones cuantitativas del grosor retiniano. En un origen, la TCO se utilizó en el diagnóstico de enfermedades de la retina, pero, cada vez son más numerosos los estudios que ponen de manifiesto su potencial en la evaluación de pacientes con afecciones neuro-oftalmológicas y/o neurodegenerativas (López-Cuenca *et al.*, 2021).

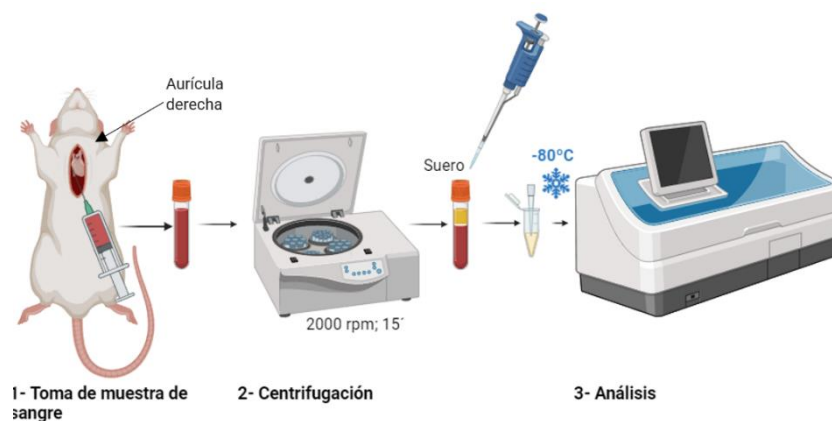
En este estudio, en una aproximación inicial *in vivo*, se realizó la valoración de las retinas de los animales experimentales mediante TCO empleando una *Spectralis OCT 2* (Alemania) adaptada a roedores, en la que se colocó un cabezal con una lente de +20D, y se aplicó un software específico (Heidelberg Eye Explorer v6.13, Heidelberg Engineering, Alemania). Esta valoración se realizó siguiendo el protocolo descrito en Salobar-García *et al.*, 2021. El análisis de la TCO se realizó en el ojo izquierdo de un total de 8 animales a los que se les administró anestesia general, una mezcla de ketamina (75 mg/kg, i.p., Anesketin<sup>®</sup>, Dechra Veterinary Products SLU, España) y medetomidina (0,26 mg/kg, i.p., Medetor<sup>®</sup>, Virbac España S.A., España). Para evitar la hipotermia asociada a la anestesia, los animales se mantuvieron en contacto con almohadillas térmicas. Previo a la evaluación, se administró a los animales en su ojo izquierdo un colirio para dilatar la pupila (Colircusi Tropicamida<sup>®</sup>, 10 mg/ml, Alcon Healthcare, España), y se les colocó una lente de contacto especie-específica (para rata, en este caso) de polimetilmetacrilato (Cantor&Nissel, Reino Unido) con el fin de crear una superficie refractiva uniforme; la córnea se mantuvo hidratada mediante un colirio de lágrima artificial reticulada (VisuXL, VisuFarma, España). Cada ojo analizado, se alineó con respecto al haz de medición para garantizar que el disco óptico estuviera en el centro del análisis de la TCO. Para compensar los pequeños movimientos oculares resultado de la respiración, los posibles artefactos se minimizaron mediante el uso del software *TruTrack Active Eye Tracking* (Heidelberg Engineering, Alemania).

La captura de imágenes de la retina se realizó utilizando el modo de escaneo en cubo centrado en el NO, para el análisis del espesor de la retina total, y se aplicó el *Scan Peripapilar* para analizar el espesor de la capa de fibras retinianas. Tras la realización de estas valoraciones, y antes de la recuperación de los animales, se les sacrificó mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol). Estos estudios fueron realizados en el Instituto Universitario de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo (IIORC-UCM) por un investigador experimentado y especialista en la captura y análisis de los resultados provenientes de la TCO (Dra. Elena Salobar-García).

## 5. OBTENCIÓN DE SUERO SANGUÍNEO Y ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

En el momento del sacrificio se tomaron muestras de sangre (Fig. 29), mediante punción cardiaca de la aurícula derecha, en tubos comerciales cedidos por el HGUGM. Las muestras de sangres se centrifugaron a 2000 rpm, durante 15 minutos (min), para la obtención del suero sanguíneo. Los sueros fueron analizados en el Autoanalizador Dimension RxL (Dade-Behring, Siemens, Alemania) del Servicio de Bioquímica del HGUGM. Se realizaron medidas de los valores de creatinina (mg/dL) y de urea en suero (mg/dL), y, a partir de este valor se calcularon los valores de nitrógeno ureico en sangre (NUS) aplicando la siguiente fórmula:

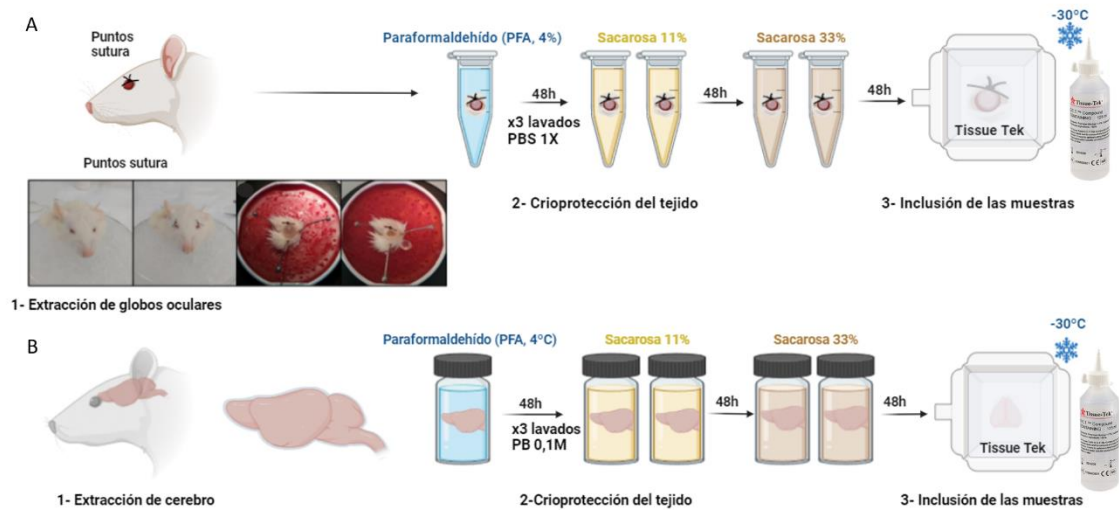
$$[\text{NUS (mg/dl)} = \text{Urea (mg/dL)} / 2,14].$$



**Figura 29. Procesamiento y análisis de las muestras de sangre.** Tras el tratamiento de los animales (ver diseño experimental) los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol). En el momento del sacrificio se tomó una muestra de sangre por punción cardiaca (1); la sangre se centrifugó (2), y, a continuación, se tomaron las muestras de suero que fueron almacenadas en frío (congelación) hasta su análisis en el autoanalizador Dimension RxL (3). 15', 15 minutos; rpm, revoluciones por minuto.

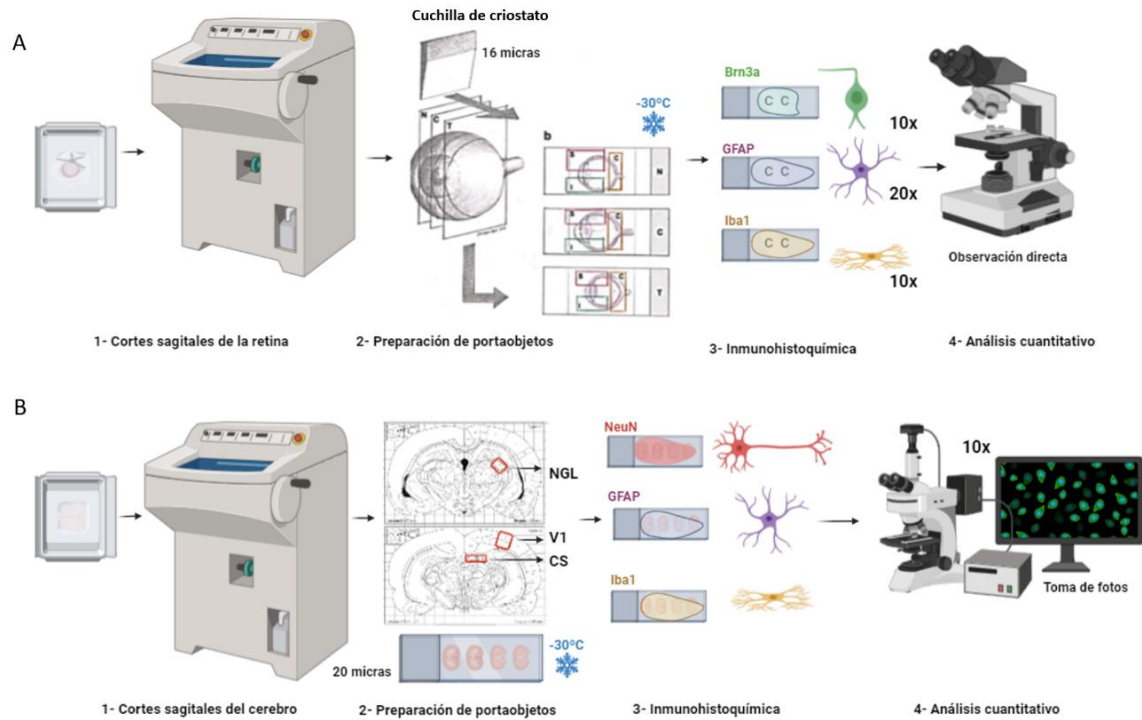
## 6. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO

Tras la administración de la sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico, 650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol), los animales se perfundieron por vía transcardiaca: pasando primero solución salina fría (4°C) con heparina al 0,001% (Heparina al 1%, Hospira Invicta, España), y, a continuación, una solución fijadora de paraformaldehído (PFA 4%, Santa Cruz, CA, EE. UU.), también fría (4°C). Se emplearon unos 150 ml de cada una de las soluciones, que pasaron por el sistema gracias a la fuerza de la gravedad. Una vez finalizada la perfusión se obtuvieron las muestras de interés: globos oculares y cerebro. Para extraer los globos oculares se realizó, primero, un punto de sutura en el párpado superior para preservar la posición anatómica del ojo durante el procesamiento de la muestra y analizar después la organización espacial del tejido. A continuación, se extrajo cuidadosamente el cerebro completo. Estos tejidos fueron sumergidos en PFA al 4%, durante 48h en frío (4°C), reemplazando el PFA por solución de PFA limpia a las 24h. En el caso de los globos oculares, a las 24h, se seccionaron las córneas y se obtuvieron los cristalinos antes de volver a introducir las copas ópticas en el fijador. Tras las 48h, se realizaron 3 lavados de 10 min con solución salina fosfato tamponada (PBS 1X, pH 7,5), en el caso de las copas ópticas, y en tampón fosfato (PB 0,1M, pH 7,5), los cerebros. Tras estos lavados, los tejidos se pasaron a una solución de sacarosa (Millipore Merck, Alemania) de concentraciones crecientes: primero 48h en sacarosa al 11% (en PBS o PB, según correspondiera) a 4°C, y, a continuación, otras 48h adicionales, en una solución de sacarosa al 33% (en PBS o PB) a 4°C; con el fin de evitar posibles contaminaciones las soluciones de sacarosa se prepararon y cambiaron cada 24h. Finalmente, estos tejidos (ojos y cerebros) fueron incluidos en el medio de congelación Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, CA, EE. UU.), y se almacenaron a -30°C hasta su posterior uso (Fig. 30).



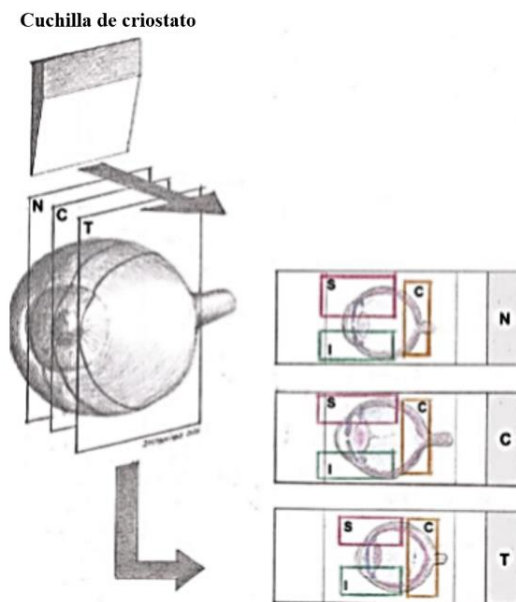
**Figura 30. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas para analizar.** Tras el tratamiento de los animales (ver diseño experimental) éstos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol). Tras el sacrificio, se realizó un punto de sutura en el párpado superior de cada ojo, antes de la extracción de los globos oculares (1A) y, posteriormente, de los cerebros (1B); a continuación, los tejidos se crioprotegieron mediante inmersión en un fijador (PFA), lavados, e inmersión en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa (2); finalmente, las muestras se incluyeron en medio de congelación Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, CA, EE. UU.) (3) y fueron después almacenadas a bajas temperaturas hasta su uso posterior h, horas; PBS, solución salina fosfato tamponada; PB, tampón fosfato.

Posteriormente, se empleó un criostato (modelo CM3050, Leica, Alemania) para la obtención de los cortes de los tejidos: para obtener las secciones de retina se realizaron cortes sagitales de 16  $\mu\text{m}$  de las copas ópticas, desde la zona nasal a la temporal; y para las secciones de cerebro se realizaron cortes coronales de 20  $\mu\text{m}$ , desde las zonas más rostrales a las más caudales (Fig. 31 A).



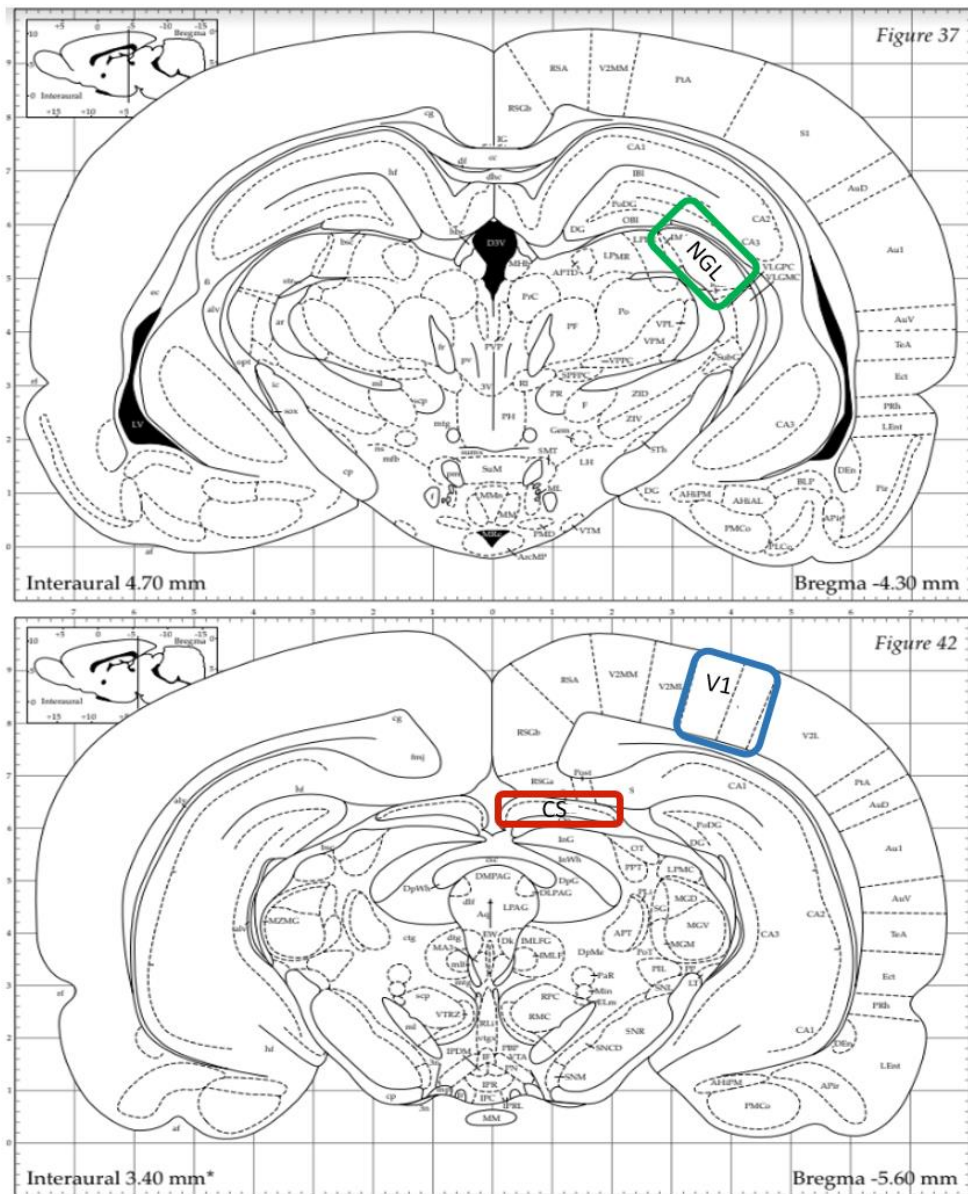
**Figura 31. Esquema del procesamiento de cortes de las muestras para inmunohistoquímica y su posterior análisis.** **A.** Se realizaron cortes sagitales de la copa óptica en el criostato (1ª) y se recogieron en portaobjetos en los que poder analizar la organización espacial de la retina considerando las regiones Nasal, Central y Temporal; y, en cada una de ellas, las zonas Superior, Central e Inferior (2A). **B.** Se realizaron cortes sagitales del cerebro en el criostato (1B) y se prepararon portaobjetos en los que poder analizar la organización espacial de la retina considerando las áreas, previamente seleccionadas con el atlas Paxinos & Watson, 2007 (2B). Se realizaron los análisis inmunohistoquímicos con los anticuerpos específicos para la detección de células ganglionares de la retina (Brn3a, en verde), neuronas (NeuN, en rojo), macroglía: astrocitos y células de Müller (GFAP, en morado) y microglía (Iba1, en amarillo). Las secciones se observaron con el microscopio a los aumentos indicados (10x o 20x), y se realizaron los contajes de forma directa al microscopio en el caso de las CGR y de la microglía retiniana, o se tomaron microfotografías para el resto de los análisis. Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A; GFAP, Proteína ácida fibrilar glial; Iba1, molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; NeuN, proteína de unión a hexaribonucleótidos-3; NGL, núcleo geniculado lateral; CS, colículo superior; V1, corteza visual primaria.

Las secciones de retina se recogieron en portaobjetos gelatinizados (2 secciones por portaobjetos), manteniendo siempre las referencias anatómicas de la retina, con el fin de poder identificar las regiones de retina nasal, central y temporal, y las áreas superior, central e inferior (Fig. 31 A). De esta manera, el estudio de la retina se realizó considerando su organización anatómica espacial tanto en el eje horizontal, con las regiones nasal, central y temporal; como en el eje vertical, con las zonas superior, central e inferior; dando lugar a 9 áreas anatómicas en la retina que denominaremos: nasal superior (NS), nasal central (NC), nasal inferior (NI), central superior (CS), central central (CC), central inferior (CI), temporal superior (TS), temporal central (TC) y temporal inferior (TI) (Fig. 32).



**Figura 32. Organización anatómica espacial de la retina.** Esquema de las consideraciones anatómicas aplicadas al estudio de la retina, mediante la que se obtienen 9 áreas en base a los planos de corte sagitales realizados sobre el eje horizontal, que permite establecer las regiones Nasal (N), Central (C) y Temporal (T), en la imagen de la izquierda; y la organización en el eje vertical en las zonas Superior (S), Central (C) e Inferior (I) establecidas sobre cada uno de los cortes de retina sobre los portaobjetos, en la imagen de la derecha. Imagen tomada de Fernández-Albarral *et al.*, 2021 y modificada.

Las secciones de cerebro se recogieron en portaobjetos gelatinizados (4 secciones en cada uno) seleccionando al microscopio las zonas de interés en base a un atlas neuroanatómico (Paxinos & Watson, 2007) (Fig. 31 B). Las áreas de interés fueron los 3 núcleos de relevo principales de la vía visual: el núcleo geniculado lateral (Bregma: desde -4.20 hasta -4,44; NGL), el colículo superior (Bregma: desde -4.92 hasta -5,60; CS) y la corteza visual primaria (Bregma: -4,92 hasta -7,32; V1) (Fig. 33). Los portaobjetos con las secciones fueron almacenados a -30°C hasta su posterior uso.



**Figura 33. Principales núcleos de relevo de la vía visual.** Se muestran las secciones coronales del atlas neuroanatómico Paxinos & Watson, 2007 en las que se localizan los 3 núcleos de relevo de la vía visual que son objeto del presente estudio: el núcleo geniculado lateral (NGL) en verde, el colículo superior (CS) en rojo, y la corteza visual primaria (V1) en azul. Tomada de Paxinos & Watson, 2007 y modificada.

## 7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron en las secciones seleccionadas de los tejidos, siguiendo un protocolo previamente empleado por nuestro grupo de investigación (Martínez-López *et al.*, 2024) con algunas modificaciones. En cada uno de los grupos experimentales se seleccionaron muestras de, al menos, 5 animales diferentes para los análisis de los anticuerpos de interés. Para la realización de los análisis inmunohistoquímicos, los portaobjetos se dejaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Todos los lavados e incubaciones se realizaron en tampón de inmunohistoquímica [tampón IHQ: 0,1M PBS, pH 7,4; 0,5% albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA, Sigma Aldrich, Merck, Alemania); 0,3% Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Merck, Alemania). En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de 0,5% de peróxido de hidrógeno (Merck KGaE, Alemania) disuelto en tampón de IHQ, durante 15 min. a TA. A continuación, se realizaron 3 lavados con tampón IHQ y se dejaron las muestras en incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (Tabla 4, Figs. 31). Al día siguiente, tras la realización de tres lavados con tampón IHQ, con el fin de eliminar el anticuerpo sobrante, se incubaron las muestras con el correspondiente anticuerpo secundario, durante 2h a TA (Tabla 4). Después, se realizaron 3 lavados con tampón IHQ y se incubaron las muestras durante 90 min. con el complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Thermo Scientific, MA, EE. UU.; [1:250]) a TA. El revelado se realizó con 3,3- diaminobencidina (DAB, Sigma Aldrich, MA, EE. UU.) activada con 0,2% de peróxido de hidrógeno en PBS 1X, durante 10 min. aproximadamente, en función del anticuerpo empleado en cada caso. Los portaobjetos se montaron con Aquatex® (Merck KGaE, Alemania).

Cada prueba inmunohistoquímica contenía al menos un portaobjetos con tejido de un animal de cada grupo experimental; además, en el caso de la retina había un portaobjetos de cada región (N, C y T), y en el caso de la vía visual de cada núcleo de estudio (CS, NGL y V1). Siempre se incluyó un control negativo (sin anticuerpo primario) para evaluar la especificidad de la prueba.

Los portaobjetos con las secciones inmunomarcadas se observaron en un microscopio ZEISS, que tiene acoplada una cámara de fotos de alta resolución (Zeiss Axioplan 712 color, Alemania) (Fig. 31). Se empleó un software específico para la obtención de microfotografías (ZEN2, Carl Zeiss AG, Alemania) manteniendo siempre fijas las condiciones ópticas de luz, brillo y contraste. Las láminas que contienen las microfotografías se han preparado empleando el programa Adobe Photoshop CS4 Extended versión 10.0 (Adobe Systems, CA, EE. UU.).

**Tabla 4. Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos**

Célula marcada	Proteína marcada	Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
Células ganglionares de la retina (CGR)	Brn3a	Anti-Brn3a monoclonal de ratón	[1:600]	Anti- ratón IgG (H+L) Biotinilado de cabra	[1:200]
Neuronas	NeuN	Anti-NeuN clon A60 de ratón	[1:600]	Vector Laboratories, CA, EE.UU., BA9200	
Astrocitos y células de Müller	GFAP	Anti-GFAP monoclonal de conejo	[1:600]	Anti-conejo IgG (H+L) Biotinilado de cabra	[1:200]
Células microgliales	Iba1	Anti-Iba1 monoclonal de conejo	[1:1000]	Thermo Scientific, MA, EE.UU., 31820	

Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A; NeuN, proteína de unión a hexaribonucleótidos-3; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba1, molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado.

## 7.1. INMUNOFLUORESCENCIA

Los análisis de inmunofluorescencia (IF) se realizaron en secciones de retina siguiendo el protocolo descrito en estudios previos del grupo (Fernández-Albarral *et al.*, 2021). En este caso, el objetivo fue la identificación de posibles mecanismos moleculares subyacentes y, para ello, se realizaron dobles marcajes por IF para la identificación en determinadas poblaciones celulares de la retina (CGR, astrocitos/células de Müller, células de microglía) de marcadores de la vía del inflamasoma, en concreto, NLRP3 (Receptor tipo NOD dominio pirina 3) y TLR4 (Receptor tipo *Toll* 4). Todos los lavados e incubaciones se realizaron en tampón de IF [0,1 M PBS, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania), 0,1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania)]. Para la realización de las IF, los portaobjetos se dejaron a TA durante 30 min., y a continuación se hidrataron en PBS 0,1M durante 15 min. Se realizaron 3 lavados con tampón de IF, y se realizó la incubación toda la noche a 4°C, con los anticuerpos primarios (Tabla 5) diluidos en tampón de IF con un 0,5% de suero universal Animal-Free Blocker® and Diluent, R.T.U. (Vector Laboratories, Inc., CA, EE. UU.). Se realizaron 3 lavados con tampón de IF para eliminar el anticuerpo sobrante y, a continuación, se realizó una incubación de 2h a TA con los anticuerpos secundarios específicos (Tabla 5). Tras 3 lavados con tampón de IF, se montaron las preparaciones con medio de montaje (Vectashield Vibrance Antifade® con DAPI, Vector Laboratories, Inc., CA, EE. UU.). Las secciones inmunomarcadas se observaron con el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan Microscope, Alemania), acoplado a una cámara de alta resolución (Zeiss Axioplan 712 color, Alemania) empleada para la captura de imágenes. Se empleó un software específico (ZEN2, Carl Zeiss AG, Alemania) manteniendo siempre fijas las condiciones ópticas de luz, brillo y contraste. Las láminas que contienen las microfotografías se han preparado empleando el programa Adobe Photoshop CS4 Extended versión 10.0 (Adobe Systems, CA, EE. UU.).

**Tabla 5. Anticuerpos empleados en los análisis de inmunofluorescencia**

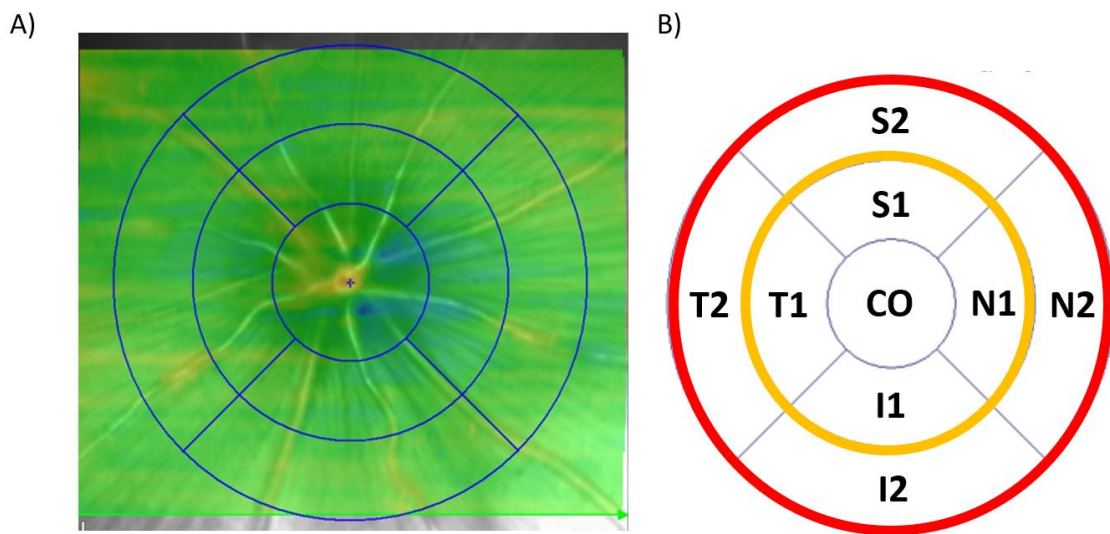
Color	Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
Verde	Anti-NLRP3 monoclonal de conejo	Novus Biological, CO, EE.UU., NBP2-12446 [1:500]	Anti-Conejo IgG H&L de cabra (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Reino Unido, 150077 [1:500]
	Anti-TLR4 monoclonal de ratón	Santa Cruz, CA, EE.UU., SC293072 [1:200]	Anti-Ratón IgG H&L de cabra (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Reino Unido, A11001 [1:300]
Rojo	Anti-Brn3a monoclonal de ratón	Millipore, Merck, Alemania MAB1585 [1:600]	Anti-Ratón IgG1 <i>Cross-Adsorbed</i> de cabra (Alexa Fluor™ 594)	Thermo Scientific, MA, EE.UU., A21125 [1:1000]
	Anti-GFAP monoclonal de pollo	Sigma Aldrich, Merck, Alemania AB5541 [1:500]	Anti-Pollo IgY (H+L) de cabra (Alexa Fluor™ 594)	Thermo Scientific, MA, EE.UU., A11042 [1:500]
	Anti-Iba1 monoclonal de cabra	Abcam, Reino Unido, AB5076 [1:1000]	Anti-Cabra IgG (H+L) <i>Cross-Adsorbed</i> de burro (Alexa Fluor™ 594)	Thermo Scientific, MA, EE.UU., A11058 [1:700]

NLRP3, Dominio pirina 3 de la familia NLR; TLR4, receptor tipo Toll 4; Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba1, molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado.

## 8. ANÁLISIS CUANTITATIVO

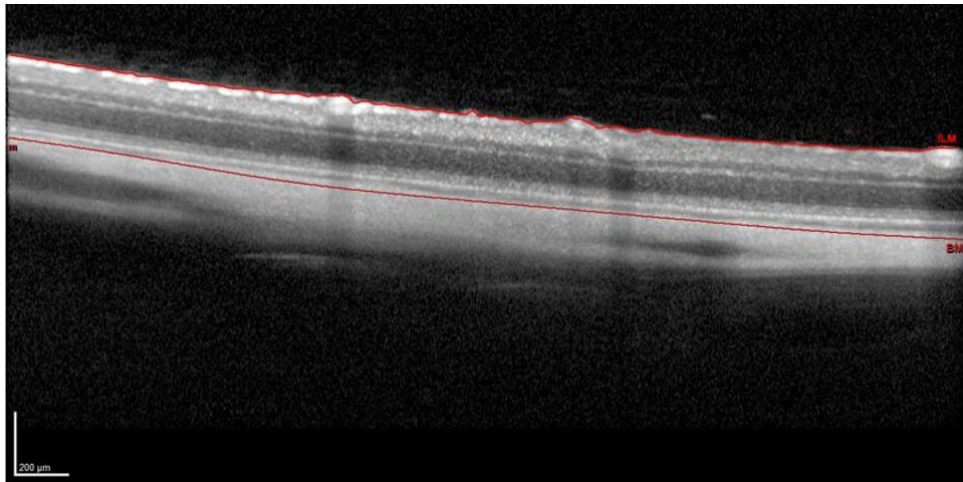
### 8.1 ESPESOR DE LA RETINA: DATOS OBTENIDOS EN LA TCO

El análisis de los datos de TCO se realizó mediante la medición del espesor de la retina total en 61 cortes. Se dividió el área observada en círculos concéntricos por proximidad al disco óptico siguiendo el modelo EDTRS: 1, 2, 3 mm. De esta forma se obtienen tres áreas circulares concéntricas: un área central (CO) que corresponde a la zona más cercana al disco óptico, un área sectorial cuyo límite circunferencial está a 1 mm del disco (AS1) y un área más externa cuyo límite se encuentra a 2 mm del disco (AS2). Estas dos áreas se dividieron a su vez en las zonas Temporal, Nasal, Superior e Inferior, estableciendo así 8 regiones de estudio (Fig. 34): sector 1 (T1, I1, N1, S1) y sector 2 (T2, I2, N2, S2).



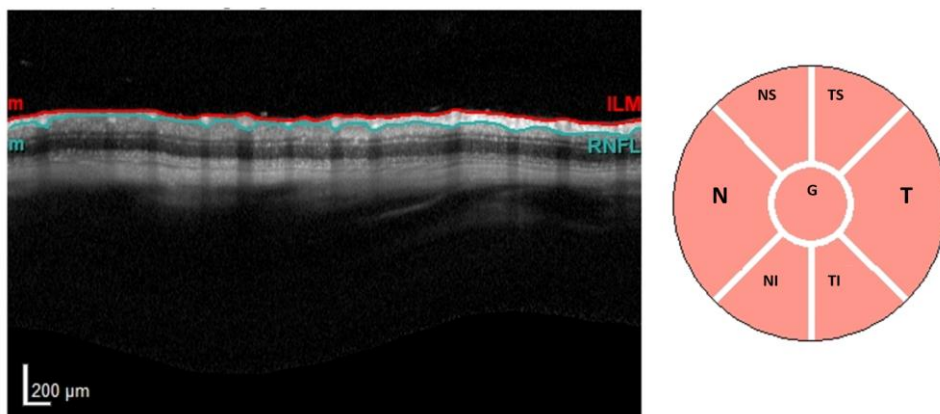
**Figura 34. Imagen de la retina obtenida por tomografía de coherencia óptica (TCO). Áreas descritas en el análisis. A)** Imagen obtenida en la TCO, en la que se ha superpuesto el esquema de las regiones a analizar. **B)** Esquema de las regiones establecidas en el análisis de TCO. Área central (CO), o zona más cercana al disco óptico; área sectorial situada a 1 mm del disco (S1, en amarillo); y área más externa situada a 2 mm del disco (S2, en rojo). Se indican las áreas en función de la distribución anatómica: I, Inferior; N, Nasal; y T, Temporal.

El área de retina analizado se delimito de forma manual en una imagen en plano (Fig. 35). Se consideró como retina total el área desde la capa limitante interna hasta la membrana de Bruch. Se llevó a cabo una revisión posterior por parte del investigador experimentado quien realizó correcciones manuales en el caso de ser necesarias.



**Figura 35. Esquema de la retina en el análisis del espesor total de la retina por tomografía de coherencia óptica (TCO).** Las líneas rojas indican el área de retina empleado para medir el espesor de la retina. ILM, Membrana Limitante Interna; BM, membrana de Bruch. Barra de aumentos: 200  $\mu\text{m}$ .

Además, se realizó el análisis del espesor de la CFNO, cuya área se delimitó también manualmente por el mismo examinador sobre un *B-Scan peripapilar* centrado en el NO (Fig. 36). La capa de fibras se midió en seis sectores proporcionados por el software de Heidelberg: Nasal (N), Temporal (T), Nasal superior (NS), Temporal Superior (TS) y Nasal Inferior (NI), Temporal Inferior (TI). La media de todos los sectores se muestra en el centro como el valor global (G).



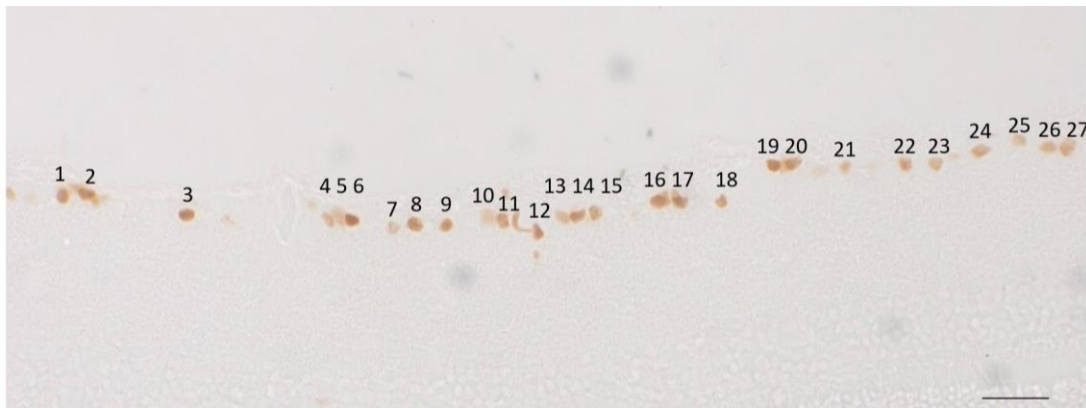
**Figura 36. Esquema de la retina en el análisis del espesor de capas de fibras por tomografía de coherencia óptica (TCO).** A la izquierda imagen de *B-Scan* de la TCO y a la derecha las áreas de estudio. La línea roja delimita la membrana limitante interna y la azul la capa de fibras del nervio óptico (NO). ILM, Membrana Limitante Interna; RNFL, Capa de fibras retinianas; G, Global; N, Nasal; NI, Nasal Inferior; NS, Nasal Superior; T, Temporal; TI, Temporal Inferior; TS, Temporal Superior. Barra de aumentos: 200  $\mu\text{m}$ .

## 8.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS MARCADORES CELULARES DE LA RETINA

En todos los casos, las valoraciones de los diferentes marcadores se realizaron a ciegas respecto al grupo experimental analizado, y se llevó a cabo por dos miembros del grupo de investigación, considerando siempre menos de un 15% de coeficiente de variación entre las medidas de ambos investigadores.

### a. Células ganglionares de la retina (CGR)

Brn3a (homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A) es un marcador específico de las CGR (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009). Las secciones inmunoteñidas con Brn3a se observaron en el microscopio con un aumento de 10x. Se contaron todas las células Brn3a positivas en cada una de las áreas de la retina. Los datos se expresan como el número de células Brn3a positivas (Fig. 37).

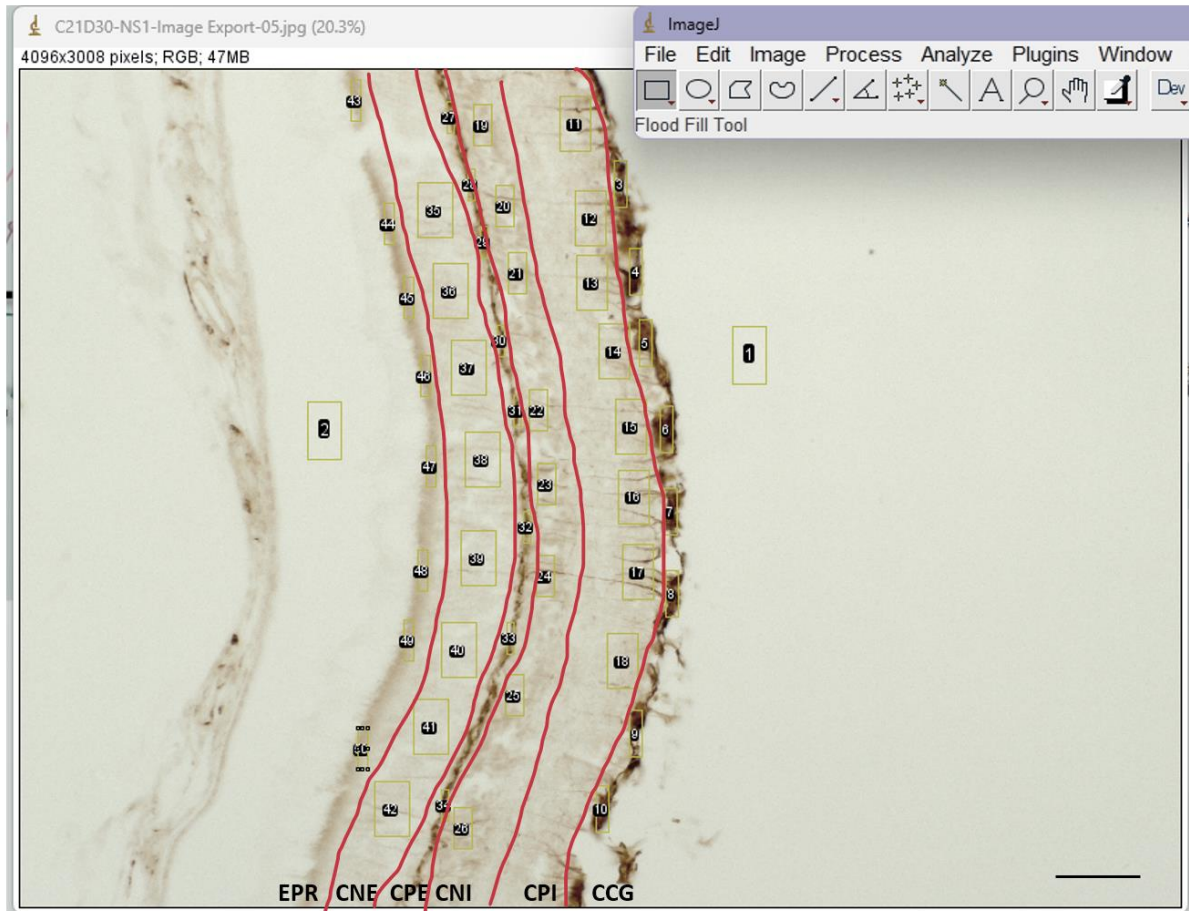


**Figura 37. Análisis por conteo de las células Brn3a positivas en retina.** Imagen representativa de la cuantificación realizada en el microscopio de las células ganglionares de la retina (CGR), marcadas con Brn3a (homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A). Se indican mediante números cada una de las CGR presentes en esta imagen. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

### b. Células de macroglía: astrocitos y células de Müller

Se empleó como marcador GFAP (proteína ácida fibrilar glial), marcador muy específico de la activación macroglial que se produce en respuesta a diferentes formas de daño en la retina; durante la macrogliosis los astrocitos y las células de Müller aumentan la expresión de este marcador (Eng, 1985). El marcaje de GFAP se cuantificó en microfotografías tomadas a 20x realizándose el densitometrado óptico-digital de 2 microfotografías para cada una de las áreas de la retina analizadas mediante el empleo del software libre *ImageJ* (Research Services Branch-NIH, EE. UU.).

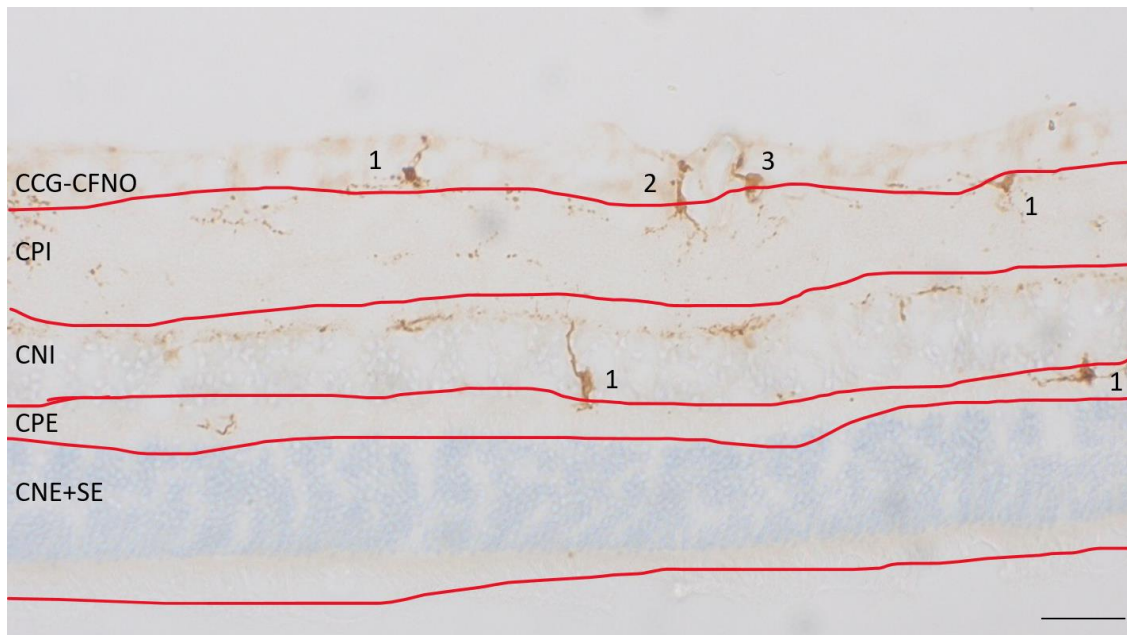
Se emplearon 8 regiones de interés (ROIS) por capa retiniana, lo que supone un área total analizada de 0,01 mm<sup>2</sup> en cada capa y en total de la retina un área de 0,06 mm<sup>2</sup>, y 2 ROIS adicionales para seleccionar los blancos del tejido y del portaobjetos (Fig. 38). En cada una de las áreas se analizaron de forma independiente las siguientes capas de la retina: capa de CFNO y de CCG juntas, CPI, CNI, CPE, CNE y EP. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica (D.O.).



**Figura 38. Análisis por densitometrado del marcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en retina.** Imagen representativa de la cuantificación realizada en cada una de las microfotografías de retina con marcaje de GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Se indican (recuadro amarillo) las regiones de interés (ROIS) empleadas y su localización en cada una de las capas de la retina. Se incluyen dos blancos (ROIS 1 y 2) y ocho ROIS por cada una de las capas: CCG, Capa Células Ganglionares (ROIS 3-10); CPI, Capa Plexiforme Interna (ROIS 11-18); CNI, Capa Nuclear Interna (ROIS 19-26); CPE, Capa Plexiforme Externa (ROIS 27-34); CNE, Capa Nuclear Externa (ROIS 35-42) y EPR, Epitelio Pigmentario Retiniano (ROIS 43-50). Barra de aumentos: 50 µm.

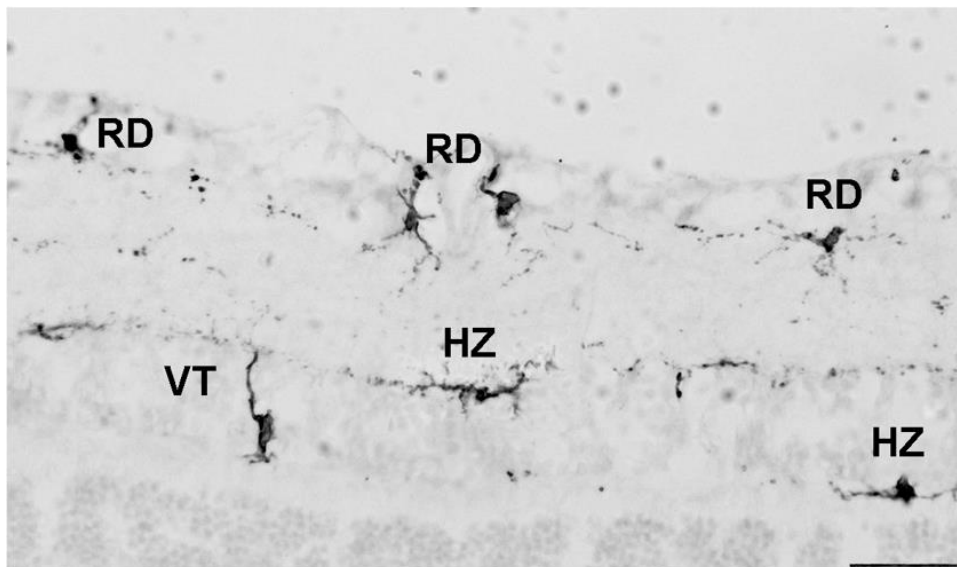
### c. Células de microglía

Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado) es un marcador específico de las células microgliales, cuya expresión aumenta en procesos de activación microglial (Ito *et al.*, 1998). La cuantificación de las células Iba1 positivas se realizó por contajes directos en el microscopio a 10x aumentos. Se contaron todas las células positivas en cada una de las 9 áreas y, en ellas, en las siguientes capas de la retina: CCG-CFNO, CPI, CNI, CPE, CNE+SE (Fig. 39).



**Figura 39. Análisis por contaje de las células Iba1 positivas en retina.** Imagen representativa de la cuantificación realizada en el microscopio de las células microgliales de la retina, marcadas con Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado). Se indican con números cada una de las células presentes en las distintas capas retinianas: CCG-CFNO, Capa Células Ganglionares y Fibras del Nervio Óptico; CPI, Capa Plexiforme Interna; CNI, Capa Nuclear Interna; CPE, Capa Plexiforme Externa y CNE+SE, Capa Nuclear Externa y Segmento Externo de los fotorreceptores. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

En condiciones patológicas se produce un cambio en el patrón de distribución de microglía hacia las capas nucleares de la retina, y cambios en su morfología, pasando del morfotipo que tienen en situación de inmunovigilancia hacia el de microglía migratoria activada (Ito *et al.*, 1998). Por ello, se analizó también el nivel de activación microglial, mediante el estudio de la morfología y orientación de estas células considerando la capa en la que se encuentran. Se distinguen 3 morfotipos: radial (RD), con un soma redondo con prolongaciones en todas las direcciones del espacio; horizontal (HZ), con las prolongaciones paralelas a las capas de la retina, en el eje horizontal; y vertical (VT) con las prolongaciones perpendiculares a las capas de la retina, en el eje vertical, entre distintas capas (Fig. 40; Martínez-López *et al.*, 2024). Los valores del total de células microgliales por área y/o capa se expresan en células Iba1 positivas; los valores de los morfotipos microgliales se expresan como el porcentaje de cada morfotipo respecto al total de células para cada área y/o capa de la retina.



**Figura 40. Morfotipos representativos de las células microgliales en la retina.** Se muestran los distintos morfotipos presentes en la retina tras el marcaje con Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado): morfotipo radial (RD), cuya morfología consiste en un soma redondo y prolongaciones en todas las direcciones característico de una microglía vigilante; morfotipo horizontal (HZ), con las prolongaciones en el eje horizontal, extendiéndose a lo largo de la misma capa; y morfotipo vertical (VT) con las prolongaciones extendidas en vertical, extendiendo sus ramificaciones entre distintas capas de la retina. Barra de aumentos: 100  $\mu$ m.

## 8.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS MARCADORES CELULARES DE LA VÍA VISUAL

Los análisis de la vía visual se realizaron en los 3 núcleos de relevo principales: CS, NGL y V1. En todos los casos, las valoraciones de los diferentes marcadores se realizaron a ciegas respecto al grupo experimental analizado, y se llevó a cabo por dos miembros del grupo de investigación, considerando siempre menos de un 15% de coeficiente de variación entre las medidas de ambos investigadores.

### a. Neuronas

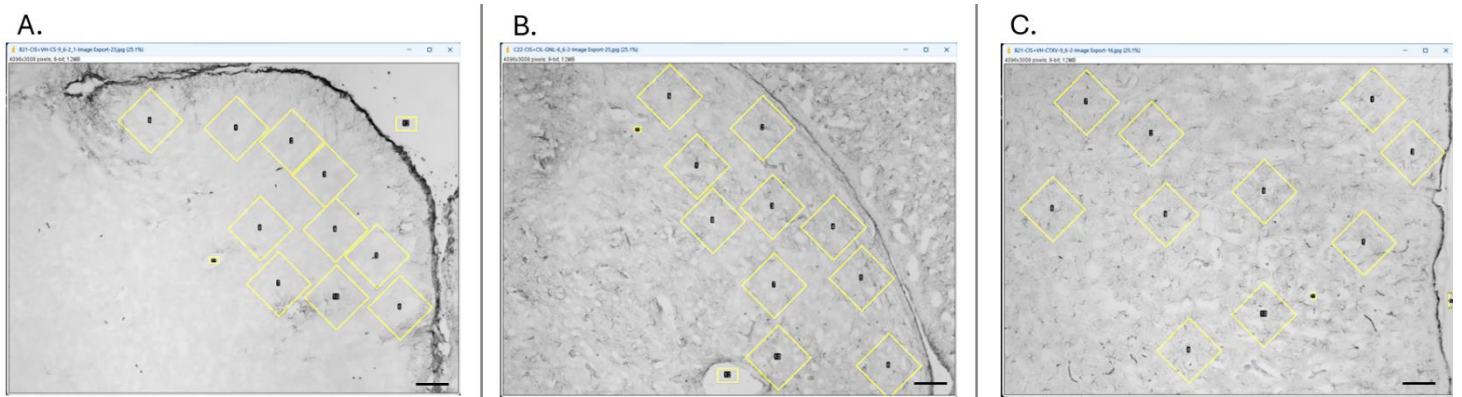
NeuN (proteína de unión a hexaribonucleótidos-3) es un marcador ampliamente usado para la identificación de neuronas ya que se localiza en los núcleos y en el citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas del SNC de los mamíferos (Mullen *et al.*, 1992). El análisis cuantitativo de las células NeuN positivas, se realizó sobre 2 microfotografías tomadas con un aumento de 10x, de cada una de las zonas de estudio. En cada una de las microfotografías se realizó un análisis por densitometría óptica digital empleando el software libre ImageJ (*Research Services Branch-NIH*, EE. UU.); para lo que se diseñaron ROIS específicos. En el caso del CS y el NGL se emplearon 6 ROIS de un área específica de 0,034 mm<sup>2</sup>, lo que supone un área total analizada de 0,16 mm<sup>2</sup> en cada núcleo, que se localizaron de forma aleatoria dentro de cada una de las microfotografías (Fig. 41 A y B), y en el caso de V1 se emplearon 4 ROIS del mismo tamaño 0,012 mm<sup>2</sup>, en cada una de las capas (Fig. 41 C), lo que supone un área total analizada de V1 de 0,16 mm<sup>2</sup>. En todos los casos los resultados se expresan en unidades arbitrarias de D.O.



**Figura 41. Análisis por densitometrado del marcaje con NeuN en núcleos de la vía visual.** Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada uno de los núcleos de relevo de la vía visual estudiados para el marcaje con NeuN (proteína de unión a hexaribonucleótidos-3). Se indican (recuadro amarillo) las regiones de interés (ROIS) empleadas y su localización en cada una de las áreas de la vía visual. Se incluyen dos blancos (ROIS 1 y 2). A. y B. Ejemplo de la posición de los 6 ROIS (3-8) empleados en las áreas de Colículo Superior y Núcleo Geniculado Lateral respectivamente. B. ejemplo de la posición de los 2-4 ROIS empleados en las distintas capas de Corteza Visual Primaria: Capa I (ROIS 2-4), Capa II (ROIS 5-6), Capa III (ROIS 7-11), Capa IV-V (ROIS 12-15) y Capa VI (ROIS 16-17). Barra de aumentos: 50  $\mu\text{m}$ .

#### b. Células de macroglía: astrocitos

Como se indicó anteriormente, se empleó como marcador GFAP. El análisis cuantitativo de las células de GFAP positivas se realizó sobre 2 microfotografías, tomadas con un aumento de 10x, de cada una de las zonas de estudio. En cada una de las microfotografías se realizó un análisis por densitometría óptica digital empleando el software libre *ImageJ* (*Research Services Branch-NIH, E.E.U.U.*); para ello se diseñaron 10 ROIS con el mismo tamaño, 0,02  $\text{mm}^2$  para cada área de la vía visual que se localizaron de forma aleatoria dentro de cada una de las microfotografías (Fig. 42). El área total cuantificada en cada zona de estudio es de 0,21  $\text{mm}^2$ . En todos los casos los resultados se expresan en unidades arbitrarias de D.O.

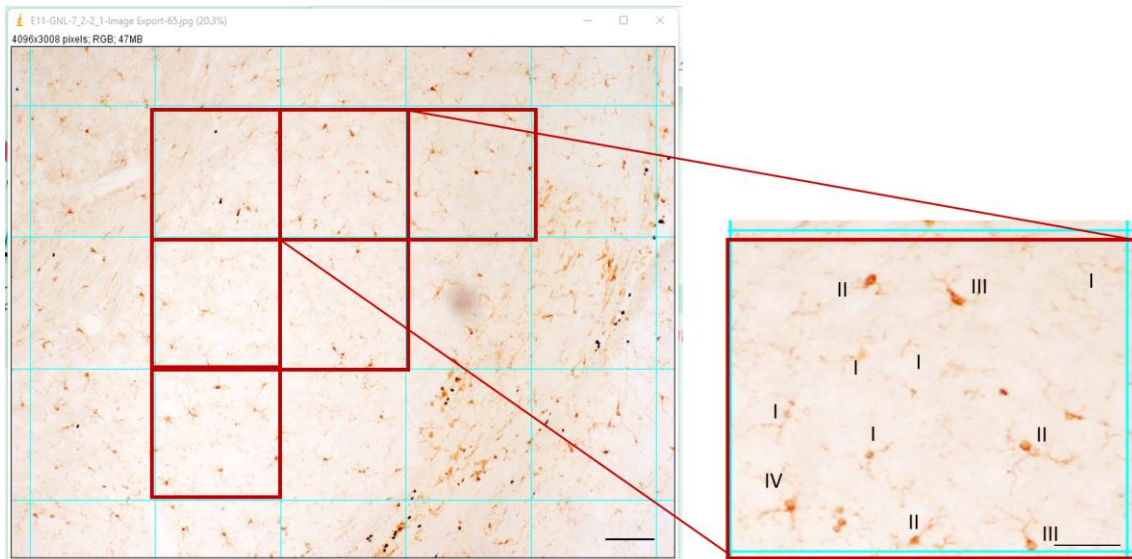


**Figura 42. Análisis por densitometrado del marcaje con GFAP en núcleos de la vía visual.** Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada uno de los núcleos de relevancia de la vía visual estudiados para el marcaje con GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Se indican (recuadro amarillo) las regiones de interés (ROIS) empleados y su localización. Se incluyen dos blancos (ROIS 1 y 2) y 10 ROIS (3-12) en todas las áreas. A. Colículo Superior; B. Núcleo Geniculado Lateral y C. Corteza Visual Primaria. Barra de aumentos: 50  $\mu\text{m}$ .

### c. Células de microglía

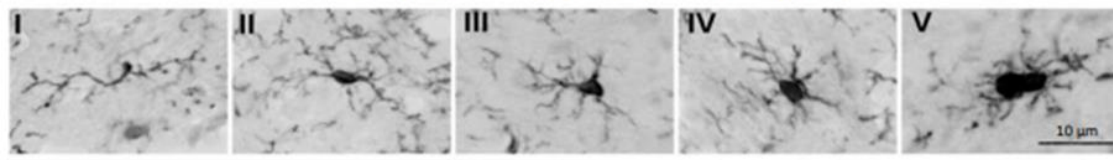
La evaluación cuantitativa de las células microgliales se llevó a cabo con el marcador Iba1. El análisis se realizó sobre 2 microfotografías tomadas con un aumento de 10x de cada una de las zonas de estudio. En cada una de las imágenes se incorporó una cuadrícula de conteo y, empleando el software libre ImageJ (*Research Services Branch-NIH, EE. UU.*), se contaron manualmente todas las células positivas de 6 cuadrículas de 0,07mm<sup>2</sup> cada una, el área total de estudio fue de 0,42 mm<sup>2</sup> (Fig. 43). Los resultados obtenidos se expresaron como el número de células inmunopositivas (células Iba1<sup>+</sup>) por unidad de área (10<sup>4</sup>  $\mu\text{m}^2$ ).

Además, en cada una de las cuadrículas de conteo de la cuadrícula, se analizó la morfología de estas células, distinguiendo entre los siguientes morfotipos (Fig. 44; Diz-Chaves *et al.*, 2012): I, microglía residente de soma pequeño y prolongaciones largas; II, microglía residente con un soma mayor y clásicamente dos prolongaciones en el eje vertical; III, soma con forma piramidal y tres prolongaciones; IV, soma grande y redondeado, con prolongaciones cortas y gruesas en todas las direcciones y V, morfología ameboide típica. Se calculó el porcentaje de cada morfotipo en relación con el número total de células Iba1<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje relativo de cada uno de los morfotipos respecto al número total de células inmunopositivas (células Iba1<sup>+</sup>).



**Figura 43. Análisis por conteo de las células Iba1 positivas.** Imágenes representativas de la cuantificación realizada en cada una de las microfotografías de los núcleos de relevo de la vía visual para el marcaje con Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado). A la izquierda se indican las cuadrículas empleados en una imagen representativa de un área de la vía visual (recuadros rojos). A la derecha se muestra una imagen ampliada de una de las cuadrículas, con el conteo realizado en el mismo. Barras de aumentos: 50  $\mu\text{m}$ .

### Morfotipos Microgliales del SNC (I-V)



**MICROGLIA RESIDENTE**

**MICROGLIA REACTIVA**

**Figura 44. Morfotipos de las células de microglía cerebrales.** Se muestran microfotografías representativas de los distintos morfotipos microglías cerebrales. Morfotipo I: microglía residente de soma pequeño y prolongaciones largas; Morfotipo II: microglía residente con un soma mayor y clásicamente dos prolongaciones en el eje vertical; Morfotipo III: soma con forma piramidal y tres prolongaciones; Morfotipo IV: soma grande y redondeado, con prolongaciones cortas y gruesas en todas las direcciones; y; Morfotipo V: morfología ameboide típica. Barra de aumentos: 10  $\mu\text{m}$ .

## 9. COLOCALIZACIONES POR INMUNOFLUORESCENCIA

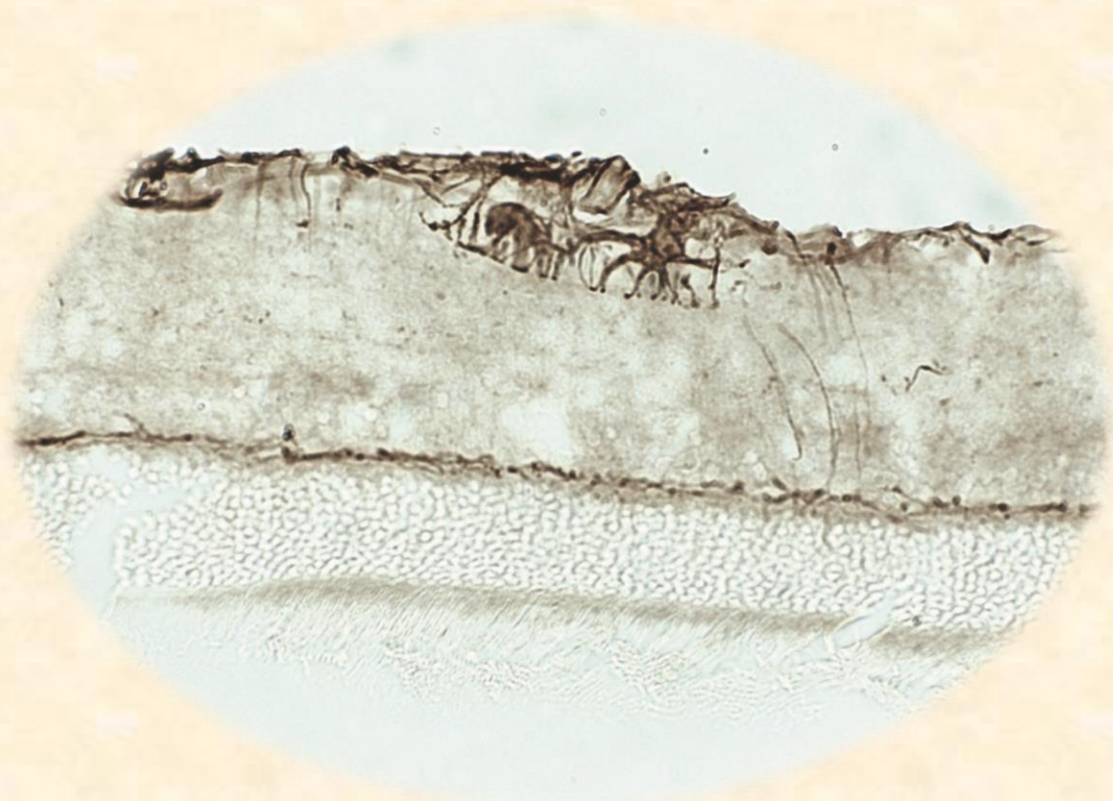
Los estudios de colocalización se realizaron en la retina. Se seleccionaron portaobjetos con secciones de retina correspondientes a animales de los grupos experimentales que hubieran mostrado mayor daño neuronal y mayor activación glial (seleccionados tras la realización de los estudios previos) y animales control VH+VH. Se analizó al microscopio la colocalización (o no) de cada uno de los marcadores estudiados, mediante el empleo de los filtros adecuados al marcaje del anticuerpo secundario (verde y rojo) (ver apartado 7.1. “Inmunofluorescencia”) y se tomaron microfotografías representativas.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se analizaron considerando dos factores independientes: el fármaco antineoplásico CIS, con dos niveles (CIS o VH), y el tratamiento experimental CIL, con dos niveles (CIL o VH). Los resultados se analizaron mediante pruebas paramétricas siempre que se cumplieran los criterios de normalidad y homocedasticidad, que se verificaron usando las pruebas de Shapiro Wilk y Levene, respectivamente. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de 2 vías siempre que fue posible, y en el caso de encontrar una interacción significativa entre los factores (tratamientos farmacológicos) se realizaron comparaciones a posteriori mediante el test de Tukey. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas siempre que el p valor fuera menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Los resultados se presentan siempre como la media  $\pm$  la desviación estándar (D.E.). El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS *Statistics*®, versión 25 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.) y los resultados fueron representados gráficamente con *GraphPad Prism*®, versión 8.0.2 (San Diego, CA, EE. UU.).



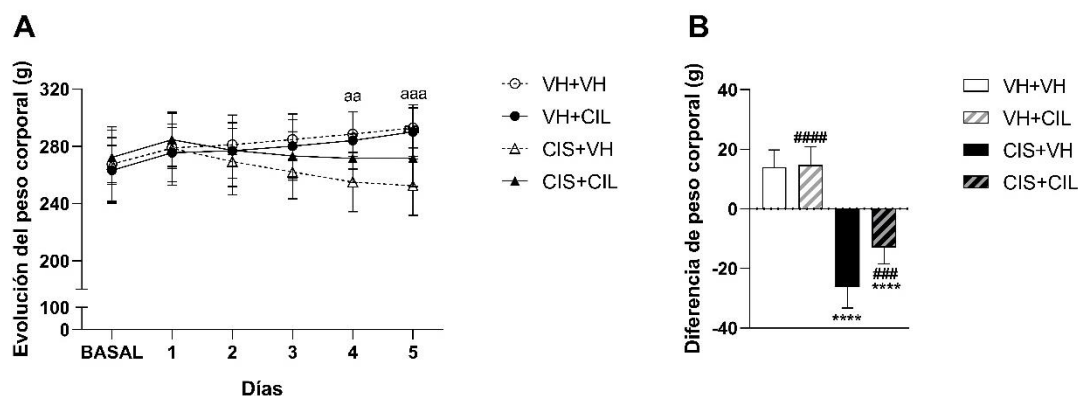
# RESULTADOS



# RESULTADOS

## EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

En este estudio la administración de una única dosis de CIS indujo una marcada disminución en la ganancia de peso. El análisis de los datos de peso a lo largo del estudio (Tabla 7, Fig. 45 A) mostró que una única dosis de CIS induce una reducción significativa sobre el peso de los animales desde el cuarto día tras su administración, efecto que se mantuvo hasta el final del tratamiento (día 5). Por el contrario, la administración repetida de CIL no pareció afectar al peso de los animales, ni tampoco se observó una interacción CIS x CIL significativa entre los fármacos en este parámetro (Tabla 6, Fig. 45 A). Hay que indicar que en este estudio no pudimos disponer del registro de peso del total de los animales durante todos los días por problemas en el alojamiento de estos y en su manipulación por ello contamos con una n=5-6 animales por grupo experimental.



**Figura 45. Efectos sobre el peso corporal (en gramos, g).** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. **A**) Evolución del peso corporal (en gramos, g) a lo largo de los días del tratamiento. Se muestran los datos como la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.). ANOVA de 2 vías para cada día: efecto general de CIS, aa  $p < 0,01$ ; aaa  $p < 0,005$ . **B**) Diferencia de peso corporal, peso final frente inicial. ANOVA de 2 vías, post-hoc: \*\*\*\*  $p < 0,001$  vs VH+VH; ###  $p < 0,05$ ; #####  $p < 0,001$  vs CIS+VH. n=5 animales en los grupos VH+VH, VH+CIL y 6 animales en los grupos CIS+VH, CIS+CIL.

La observación detallada de la evolución de peso de los animales (Fig. 48) sugirió un posible efecto de la CIL en los días finales del estudio, por lo que se hizo un análisis adicional considerando la diferencia de peso en los animales frente a su peso inicial/basal. Confirmamos el efecto estadísticamente significativo del CIS [F (1,18) =163,47; p<0,001], así como un efecto estadísticamente significativo de la CIL [F (1,18) =6,90; p=0,017] y de la interacción CIS x CIL entre los fármacos [F (1,18) =5,58; p=0,03]. El análisis *a posteriori* (Fig. 45 B) mostró que el CIS produjo una pérdida de peso estadísticamente significativa [CIS+VH vs VH+VH, p<0,001], de alrededor del 10%. En los animales control (VH+VH) se observaba una ganancia de peso, de alrededor de un 5% respecto a su peso inicial, similar a la observada en el grupo tratado con CIL (VH+CIL). La interacción CIS x CIL mostró una pérdida de peso menor en comparación con los animales CIS+VH [CIS+CIL vs VH+VH, p<0,001; CIS+CIL vs CIL+VH, p=0,008].

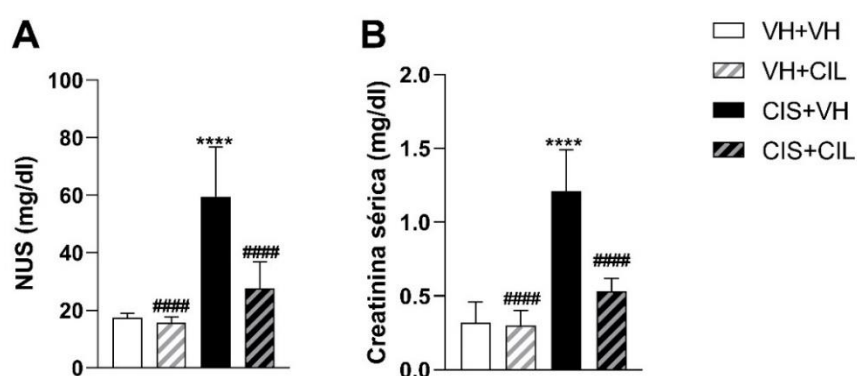
**Tabla 6.** Análisis de la variación de peso corporal durante los días de modelo experimental: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

	CIS	CIL	INTERACCIÓN
<b>Basal</b>	F=0,26; ns	F=0,00; ns	F=0,26; ns
<b>Día 1</b>	F=0,26; ns	F=0,02; ns	F=0,30; ns
<b>Día 2</b>	F=0,41; ns	F=0,04; ns	F=0,45; ns
<b>Día 3</b>	F=3,59; ns	F=0,17; ns	F=1,03; ns
<b>Día 4</b>	F=8,33; p=0,01	F=0,58; ns	F=1,76; ns
<b>Día 5</b>	F=13,44; p=0,002	F=1,06; ns	F=1,88; ns

Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,18), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); Interacción de los factores CIS x CIL. n=5 animales en los grupos VH+VH, VH+CIL y 6 animales en los grupos CIS+VH, CIS+CIL.

## PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: FUNCIÓN RENAL

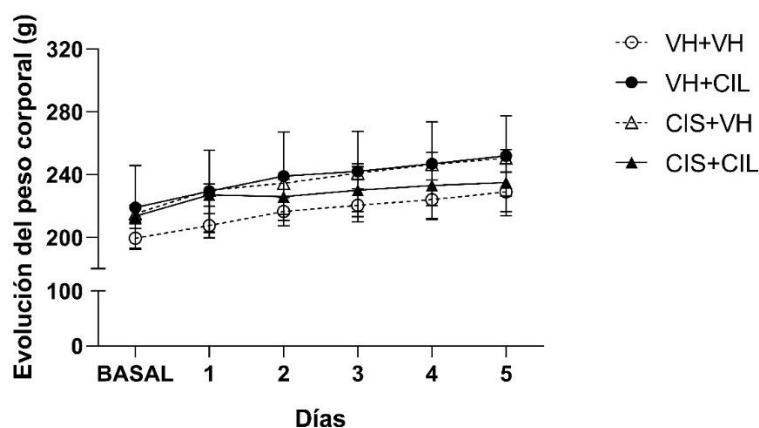
En el presente estudio, la administración de los dos fármacos provocó una modificación significativa de los parámetros bioquímicos analizados en relación con la función renal (Fig. 46). Tanto los niveles de NUS como de creatinina sérica se vieron modificados por la administración de una dosis única de CIS [NUS:  $F(1,18)=37,15$ ;  $p<0,001$ ; Crea:  $F(1,18)=57,37$ ;  $p<0,001$ ], se vieron afectados también por la administración repetida de CIL [NUS:  $F(1,18)=14,48$ ;  $p=0,001$ ; Crea:  $F(1,18)=22,15$ ;  $p<0,001$ ], y se encontró una interacción CIS x CIL significativa entre los tratamientos para los dos parámetros medidos [NUS:  $F(1,18)=11,46$ ;  $p=0,003$ ; Crea:  $F(1,18)=19,69$ ;  $p<0,001$ ]. Los análisis *a posteriori* mostraron que una única dosis de CIS era capaz de inducir un incremento estadísticamente significativo en los niveles tanto de NUS como de creatinina sérica, es decir, incrementaba los niveles de los marcadores de nefrotoxicidad, mientras que la administración repetida de CIL, que *per se* no parecía afectar a la función renal, era capaz de hacer volver estos parámetros a los niveles observados en los animales control (VH+VH); CIL atenúa el daño nefrotóxico inducido por el CIS.



**Figura 46. Efecto sobre el NUS y la creatinina sérica (en mg/dL).** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. **A)** Niveles de NUS (en mg/dL). Prueba de Kruskal-Wallis: efecto global significativo de la interacción: \*\*\*\*  $p<0,001$  vs VH+VH; #####  $p<0,001$  vs CIS+VH. **B)** Niveles de creatinina sérica (en mg/dL). Prueba de Kruskal-Wallis: efecto global significativo de la interacción: \*\*\*\*  $p<0,001$  vs VH+VH; #####  $p<0,001$  vs CIS+VH.  $n=5$  animales en los grupos VH+VH, VH+CIL y 6 animales en los grupos CIS+VH, CIS+CIL.

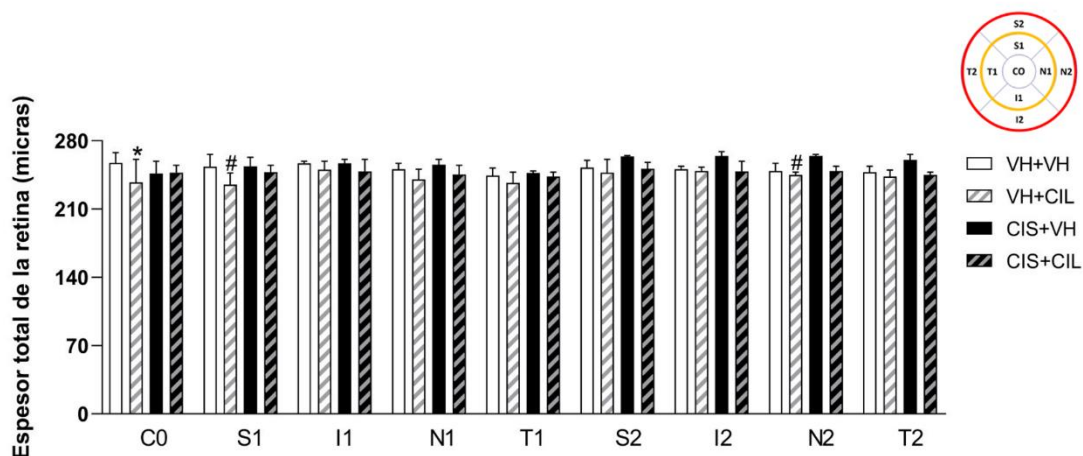
## ESTUDIO *IN VIVO*. RESULTADOS DE LA TCO

Como se indicó en la sección de Material y Métodos (pág. 91), en este estudio, se realizó una primera aproximación *in vivo*, en la que se llevó a cabo la valoración de las retinas de nuestros animales experimentales mediante TCO. En este primer estudio piloto se registró el peso de los animales, pero, posiblemente debido al bajo número de datos, no encontramos efectos de los fármacos sobre la evolución del peso corporal (resultados no significativos, no se muestran; Fig. 47).



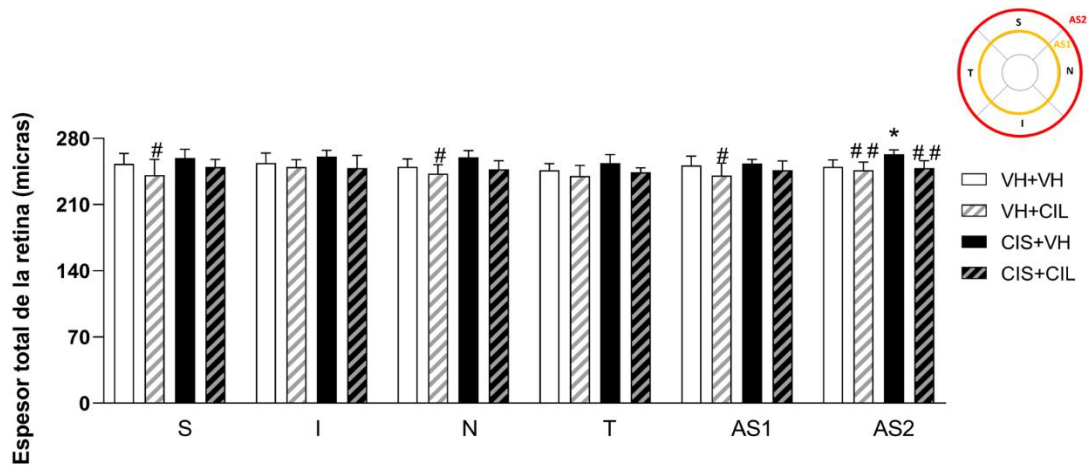
**Figura 47. Evolución del peso corporal (en gramos, g).** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En la gráfica se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. n=2 animales por cada grupo experimental.

Se analizaron las diferentes regiones de la retina, en una primera aproximación, considerando tres círculos concéntricos por proximidad al disco óptico: un área central (C0), un área sectorial (AS1) con límite a 1 mm del disco óptico y un área AS2 cuyo límite está a 2 mm del disco; así como las zonas de regionalización dentro de estas: I, N, S y T. En este primer análisis (Fig. 48) solo se vieron diferencias en el C0, debidas al tratamiento con CIL, donde se veía una reducción en el grosor de la retina (VH+VH vs VH+CIL,  $p=0,04$ ); y en S1 (CIS+VH vs VH+CIL,  $p=0,05$ ) y N2 (CIS+VH vs VH+CIL,  $p=0,04$ ) donde las retinas de los animales tratados con CIS+VH presentaban un grosor mayor a la de los animales tratados con VH+CIL.



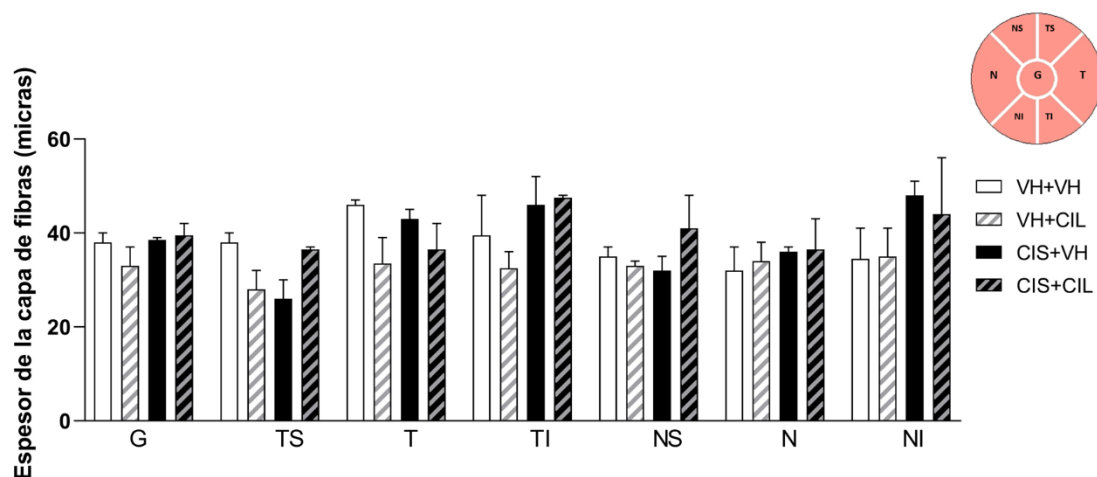
**Figura 48. Espesor total de la retina (en micras).** Análisis del espesor total de la retina en las distintas zonas: C0, centro óptico; S1, superior 1; I1, inferior 1; N1, nasal 1; T1, temporal 1; S2, superior 2; I2, inferior 2; N2, nasal 2; T2, temporal 2. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: post-hoc \*  $p < 0,05$  vs VH+VH, #  $p < 0,05$  vs CIS+VH.  $n = 2$  animales por cada grupo experimental.

Con el fin de profundizar en la comprensión de estos resultados, se analizaron los datos agrupándolos por sectores (círculos concéntricos por proximidad al disco óptico: AS1 (S1+I1+N1+T1) y AS2 (S2+I2+N2+T2) y por zonas (Superior, S, S1+S2; Inferior, I, I1+I2; Nasal, N, N1+N2; Temporal, T, T1+T2). Se obtuvieron diferencias similares en las zonas S (CIS+VH vs VH+CIL,  $p = 0,034$ ) y N (CIS+VH vs VH+CIL,  $p = 0,041$ ), donde la retina presentaba un grosor mayor en los animales tratados con CIS+VH frente a los tratados con VH+CIL (Fig. 49). Se encontró un resultado similar al analizar los datos de AS1 (CIS+VH vs VH+CIL,  $p = 0,032$ ), y se obtuvieron resultados más complejos al analizar el AS2 donde, además del resultado ya descrito (CIS+VH vs VH+CIL,  $p = 0,002$ ), se observaba un incremento en el grosor de la retina tras el tratamiento con CIS (VH+VH vs CIS+VH,  $p = 0,022$ ). En el AS2 de la retina hay resultados más prometedores, ya que se observa un efecto del CIS, que induce un incremento en el grosor de la retina comparado con todos los grupos experimentales, posiblemente asociado a la aparición de un edema, prevenido, o atenuado, tras la administración de CIL.



**Figura 49. Espesor total de la retina (en micras).** Análisis del espesor total de la retina en micras en las distintas zonas agrupadas: S, superior, S1+S2; I, inferior, I1+I2; N, nasal, N1+N2; T, temporal, T1+T2; AS1, área sectorial 1, S1+I1+N1+T1; AS2, área sectorial 2, S2+I2+N2+T2). Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: post-hoc \*  $p < 0,05$  vs VH+VH, #  $p < 0,05$  vs CIS+VH, ##  $p < 0,01$  vs CIS+VH. n=2 animales por cada grupo experimental.

Con el fin de estudiar la existencia de un posible daño en el NO se analizó el grosor de la CFNO dividiendo su estudio en las zonas anatómicas de la retina: TS, temporal superior; T, temporal, TI, temporal inferior; NS, nasal superior, N, nasal y NI, nasal inferior y añadiendo la media de todas las áreas como el valor Global (G) de dicha retina. No se observaron diferencias en el grosor de la CFNO tras el tratamiento con los fármacos en este primer estudio piloto (Fig. 50).

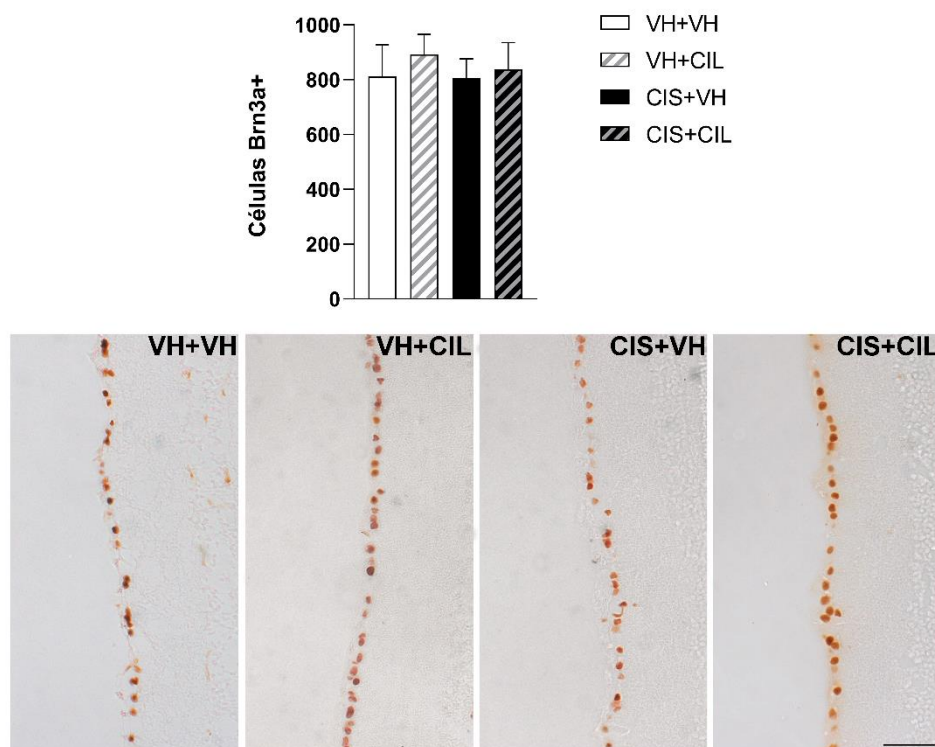


**Figura 50. Espesor de la capa de fibras del nervio óptico (en micras).** Análisis del espesor de la capa de fibras en micras por las distintas zonas: G, global; TS, temporal superior; T, temporal; TI, temporal inferior; NS, nasal superior; N, nasal; NI, nasal inferior. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. n=2 animales por cada grupo experimental.

## ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA

### • ANÁLISIS DE CÉLULAS GANGLIONARES (BRN3A)

El análisis de la expresión de las células Brn3a<sup>+</sup> en la totalidad de la retina no mostró diferencias estadísticamente significativas [CIS: F(1,12)=0,43; ns; CIL: F(1,12)=1,50; ns; CIS x CIL: F(1,12)=0,30; ns] (Fig. 51). Sin embargo, al analizar la expresión del marcador Brn3a en las diferentes áreas de la retina (Tabla 7, Fig. 52) encontramos un efecto estadísticamente significativo del CIS en las áreas CC ( $p=0,03$ ) y TS ( $p<0,001$ ), en las que se observó una reducción en la expresión de este marcador de CGR. Este análisis reveló un efecto estadísticamente significativo de la CIL, en las áreas NC ( $p=0,02$ ) y TS ( $p=0,04$ ), donde su efecto pareció incrementar la expresión del marcador Brn3a. En ninguna de las áreas se observó una interacción CIS x CIL significativa entre los fármacos.

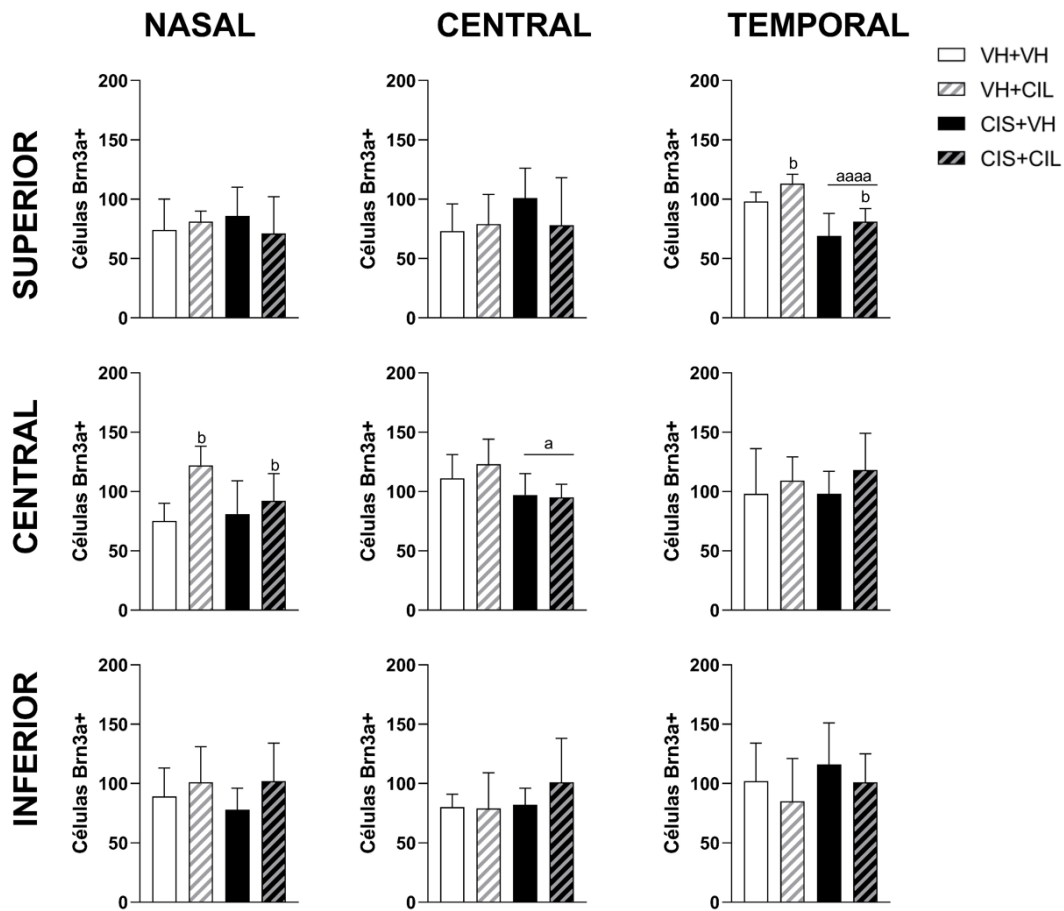


**Figura 51. Expresión de células Brn3<sup>+</sup> (número) en la retina completa.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. n=4 animales por cada grupo experimental. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

**Tabla 7.** Análisis de la expresión de las células Brn3<sup>+</sup> en las diferentes áreas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

BRN3a <sup>+</sup>		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	CIS	F= 0,14; ns	F=0,83; ns	F=25,03; p<0,001
	CIL	F= 0,09; ns	F=0,34; ns	F=5,14; p=0,04
	CIS x CIL	F= 0,82; ns	F=0,99; ns	F=0,05; ns
CENTRAL	CIS	F=1,23; ns	F=5,82; p=0,33	F=0,02; ns
	CIL	F=7,38; p=0,02	F=0,28; ns	F=0,87; ns
	CIS x CIL	F=2,97; ns	F=0,53; ns	F=0,22; ns
INFERIOR	CIS	F=0,01; ns	F=0,95; ns	F=0,46; ns
	CIL	F=1,76; ns	F=0,52; ns	F=1,45; ns
	CIS x CIL	F=0,20; ns	F=0,58; ns	F=0,08; ns

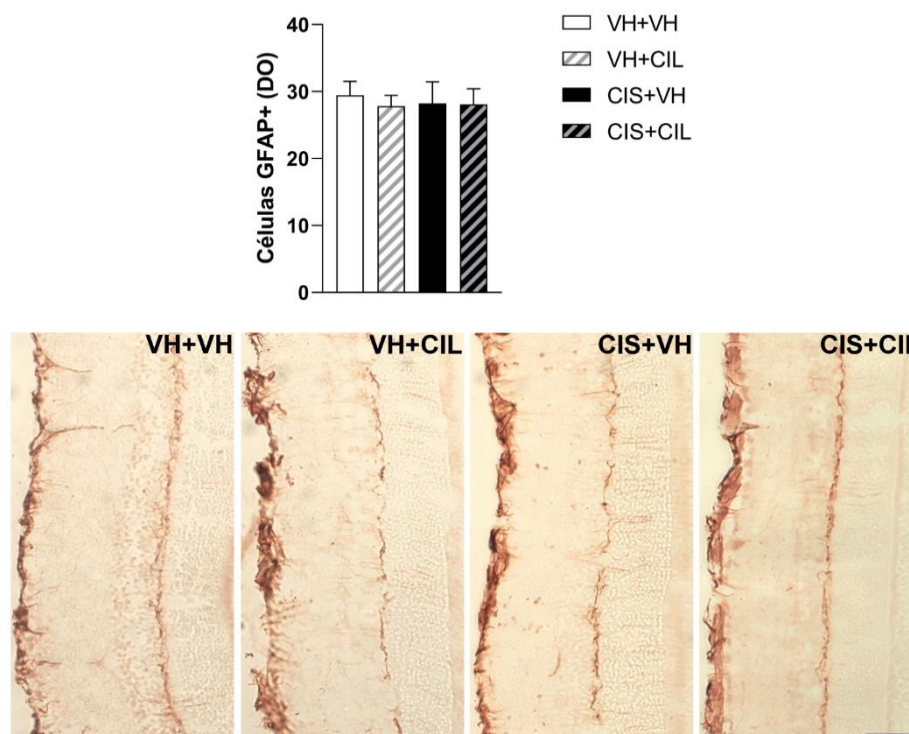
Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,12), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); Interacción, interacción de los factores CIS x CIL. n=4 animales en todos los grupos experimentales.



**Figura 52. Expresión de células Brn3<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la retina.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, a  $p < 0,05$ ; aaaa  $p < 0,001$ ; b, efecto general de CIL, b  $p < 0,05$ . n=4 animales por cada grupo experimental.

- **ANÁLISIS DE CÉLULAS MACROGLIALES ( GFAP)**

El análisis de la expresión de GFAP en toda la retina no mostró efectos estadísticamente significativos en ninguno de los factores analizados [CIS:  $F(1,16) = 0,19$ , ns; CIL:  $F(1,16) = 0,69$ , ns; CIS x CIL:  $F(1,16) = 0,49$ , ns] (Fig. 53). El posterior análisis de la expresión de GFAP en cada una de las regiones y zonas de la retina (Tabla 8, Fig. 54) reveló que el CIS ejerce un efecto estadísticamente significativo en NC ( $p=0,004$ ) donde la expresión de GFAP aumenta, mientras que en las regiones temporales tanto en la zonas superior y central los niveles de expresión de GFAP son significativamente menores ( $p<0,001$  y  $p=0,04$ , respectivamente). Por otro lado, la administración de CIL también afectó de forma estadísticamente significativa a la expresión de GFAP, en concreto, en NS ( $p=0,03$ ) donde CIL redujo la expresión de GFAP, y en CS ( $p=0,04$ ) y TC ( $p=0,004$ ) donde CIL incrementó los niveles de expresión de la misma. La interacción CIS x CIL tuvo un efecto significativo en el área TI ( $p=0,03$ ). Los análisis *a posteriori* en dicha zona mostraron diferencias entre los animales tratados con CIS con o sin CIL y los VH+CIL [CIS+VH vs VH+CIL,  $p=0,04$ ; CIS+CIL vs VH+CIL,  $p=0,008$ ].

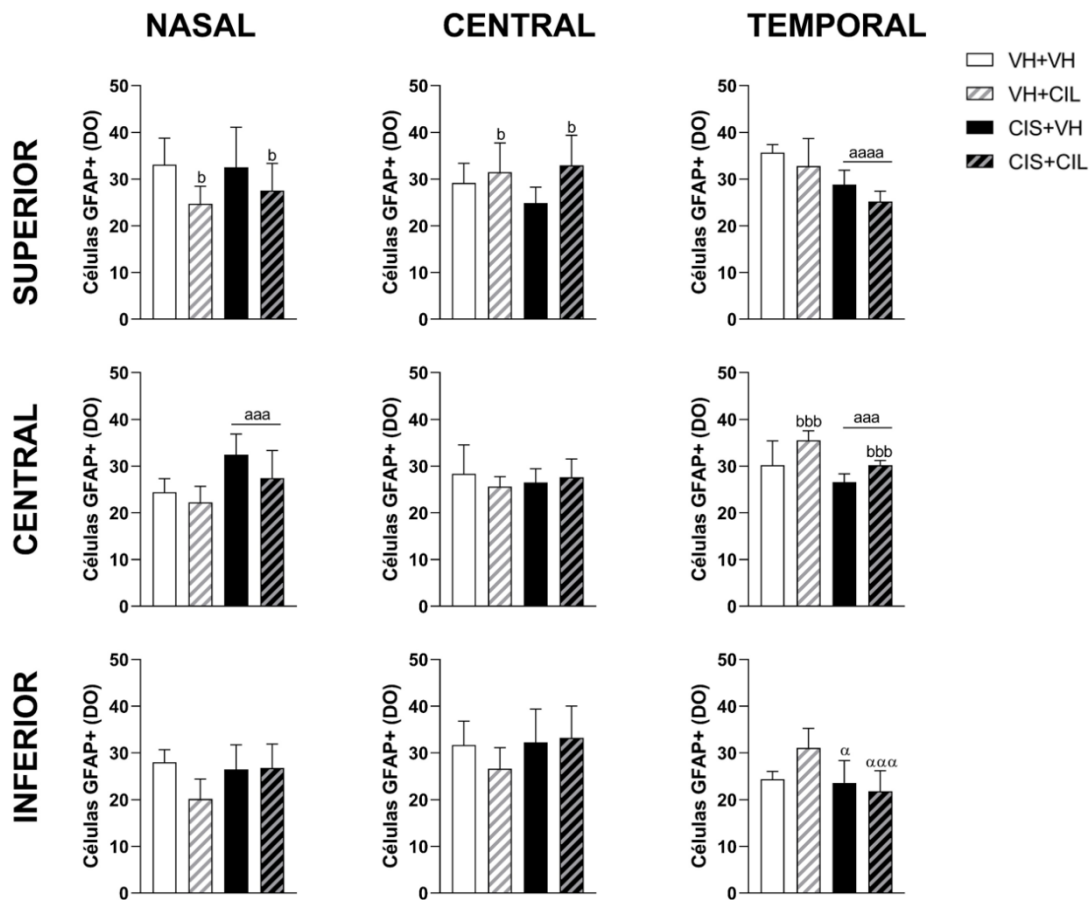


**Figura 53. Expresión de GFAP (Densidad Óptica, D.O.) en la retina completa.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. n=5 animales por cada grupo experimental. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

**Tabla 8. Análisis de la expresión de las células GFAP<sup>+</sup> en las diferentes áreas de la retina:** Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

GFAP <sup>+</sup>	NASAL	CENTRAL	TEMPORAL	
SUPERIOR	CIS	F=0,17; ns	F=0,34; ns	F=19,89; p<0,001
	CIL	F=5,77; p=0,03	F=4,89; p=0,042	F=4,04; ns
	CIS x CIL	F=0,38; ns	F=1,53; ns	F=0,05; ns
CENTRAL	CIS	F=11,59; p=0,004	F=0,00; ns	F=11,64; p=0,04
	CIL	F=3,45; ns	F=0,20; ns	F=11,35; p=0,01
	CIS x CIL	F=0,54; ns	F=1,11; ns	F=0,39; ns
INFERIOR	CIS	F=1,61; ns	F=1,83; ns	F=8,27; p=0,01
	CIL	F=3,52; ns	F=0,57; ns	F=1,95; ns
	CIS x CIL	F=4,11; ns	F=1,28; ns	F=5,91; p=0,03

Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,16), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); CIS x CIL, interacción de los factores CIS x CIL. n=5 animales en todos los grupos experimentales.



**Figura 54. Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes áreas de la retina.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, aaa  $p < 0,005$ , aaaa  $p < 0,001$ ; b, efecto general de CIL, b  $p < 0,05$ , bbb  $p < 0,005$ . ANOVA de 2 vías: post-hoc,  $\alpha$   $p < 0,05$  vs VH+CIL,  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0,005$  vs VH+CIL.  $n=5$  animales por cada grupo experimental.

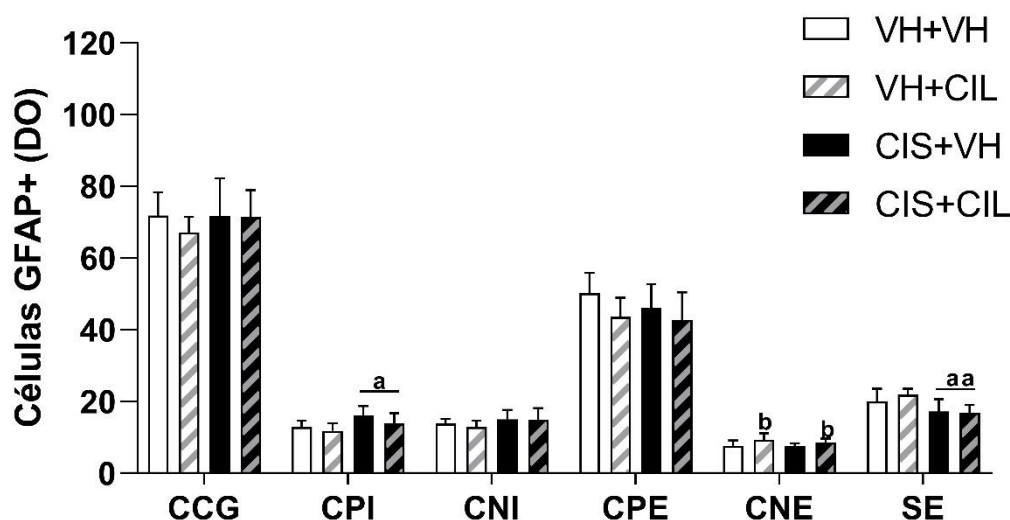
La expresión de GFAP se emplea tanto para estudiar la presencia y/o activación tanto de astrocitos como de células de Müller localizadas en capas diferentes de la retina: los astrocitos en las capas CCG y CFNO; mientras que las células de Müller tienen sus somas en la capa CNI y extienden sus prolongaciones por las distintas capas de la retina (ver Introducción). Por ello, en un análisis posterior, estudiamos la expresión de GFAP en las diferentes capas de la retina (Tabla 9, Fig. 55). Sólo encontramos un efecto estadísticamente significativo del CIS en las capas CPI ( $p=0,03$ ) y SE ( $p=0,006$ ), donde indujo un efecto opuesto: en CPI el CIS incremento de forma significativa la expresión de GFAP, mientras que en SE, la capa que incluye los segmentos externos de fotorreceptores la expresión de GFAP se vio reducida notablemente.

Por otro lado, la administración de CIL también provocó un efecto estadísticamente significativo en CNE ( $p=0,032$ ), capa en la que indujo un aumento en la expresión de GFAP.

**Tabla 9.** Análisis de la expresión de las células GFAP<sup>+</sup> en las diferentes capas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

GFAP <sup>+</sup>	CCG	CPI	CNI	CPE	CNE	SE
CIS	F=0,38; ns	F=5,64; p=0,03	F=2,36; ns	F=0,79; ns	F=0,50; ns	F=9,97; p=0,01
CIL	F=0,53; ns	F=2,29; ns	F=0,22; ns	F=3,01; ns	F=5,49; p=0,03	F=0,32; ns
CIS x CIL	F=0,43; ns	F=0,25; ns	F=0,20; ns	F=0,33; ns	F=0,18; ns	F=0,84; ns

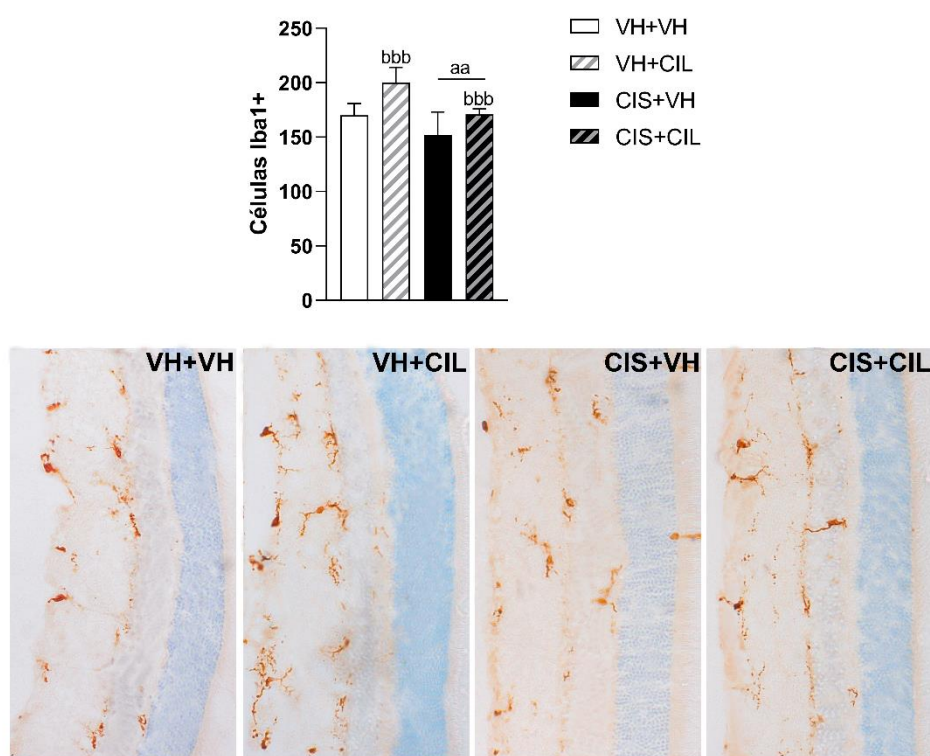
Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,16), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); Interacción de los factores CIS x CIL. n=5 animales en todos los grupos experimentales. CCG, capa células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; SE, segmento externo.



**Figura 55.** Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes capas de la retina. Análisis de la expresión de GFAP de cada capa retiniana (CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; SE, capa del segmento externo). Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: efecto general de CIS, a  $p<0,05$ , aa  $p<0,01$ ; efecto general de CIL, b  $p<0,05$ . n=5 animales por cada grupo experimental.

## • ANÁLISIS DE CÉLULAS MICROGLIALES ( Iba1)

El análisis de la expresión de células Iba1<sup>+</sup> en la retina, global, mostró un efecto estadísticamente significativo del CIS [ $F(1,12)=10,64$ ;  $p=0,007$ ], que fue capaz de reducir de forma general la expresión de Iba1; así como un efecto estadísticamente significativo de la CIL [ $F(1,12)=11,57$ ;  $p=0,005$ ], que indujo el efecto contrario, incrementando la expresión de Iba1 (Fig. 56). Estos tratamientos farmacológicos no mostraron una interacción significativa [CIS x CIL:  $F(1,12)=0,51$ ; ns].



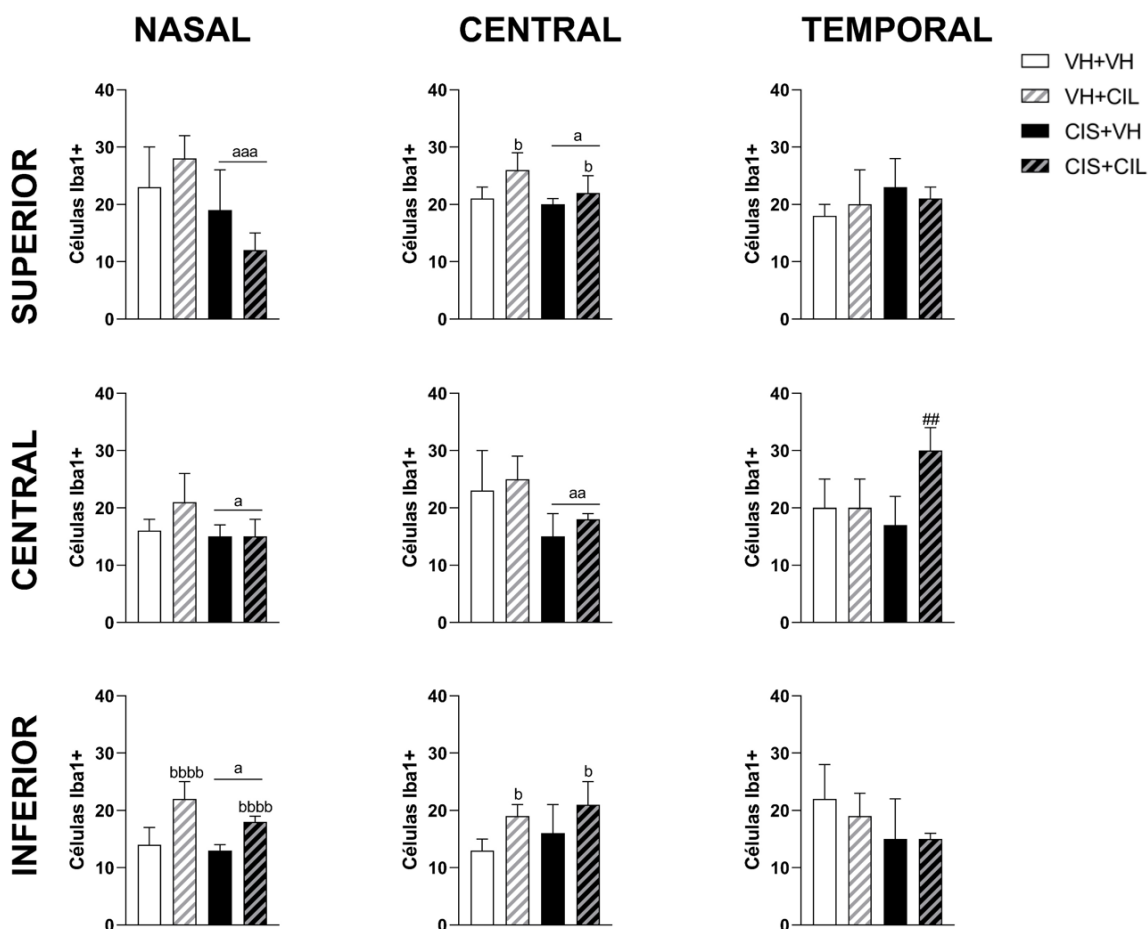
**Figura 56. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en la retina completa.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, aa  $p<0,01$ ; b, efecto general de CIL, bbb  $p<0,005$ . n=4 animales por cada grupo experimental. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

El análisis regional complementario (Fig. 57) reveló resultados estadísticos significativos (Tabla 10). Se observó un efecto generalizado de CIS reduciendo las células Iba1<sup>+</sup> en las zonas nasales y centrales (NI p=0,024; NC p=0,03; NS p=0,004; CC p=0,007; CS p=0,04; excepto en CI). La CIL produjo un aumento en el número de células Iba1<sup>+</sup> en dos de las zonas afectadas por el CIS (NI p<0,001; CS p=0,01), además de mostrar un aumento de número de células en la zona CI (p=0,02). Por último, se vio que la combinación de ambos fármacos podía producir un cambio en el número de células Iba1<sup>+</sup> solo en el área TC (p=0,02). La coadministración de CIS+CIL produjo un aumento de células que no se observa con la administración única del CIS [CIS+CIL vs CIS+VH, p=0,01].

**Tabla 10.** Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en las diferentes áreas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

Iba1 <sup>+</sup>		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	CIS	F=13,11; p=0,01	F=5,16; p=0,04	F=2,26; ns
	CIL	F=0,11; ns	F=8,55; p=0,01	F=0,02; ns
	CIS x CIL	F=4,21; ns	F=2,11; ns	F=1,19; ns
CENTRAL	CIS	F=6,02; p=0,03	F=10,52; p=0,01	F=1,90; ns
	CIL	F=2,31; ns	F=1,36; ns	F=7,78; p=0,02
	CIS x CIL	F=3,35; ns	F=0,07; ns	F=7,40; p=0,02
INFERIOR	CIS	F=6,70; p=0,02	F=1,92; ns	F=2,21; ns
	CIL	F=36,81; p<0,001	F=7,68; p=0,02	F=1,13; ns
	CIS x CIL	F=0,72; ns	F=0,15; ns	F=1,29; ns

Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,12), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); CIS x CIL, Interacción los factores CIS x CIL. n=4 animales en todos los grupos experimentales.



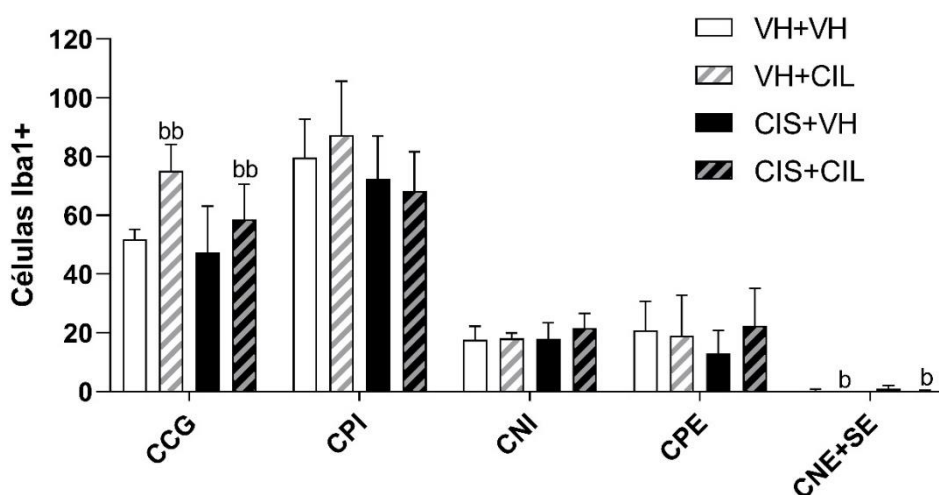
**Figura 57. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la retina.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, a  $p < 0,05$ ; aa  $p < 0,01$ ; aaa  $p < 0,005$ ; b, efecto general de CIL, b  $p < 0,05$ , bbbb  $p < 0,001$ . ANOVA de 2 vías: post-hoc ##  $p < 0,01$  vs CIS+VH. n=4 animales por cada grupo experimental.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los anteriores efectos, se realizó el conteo del número de células Iba1<sup>+</sup> en las diferentes capas de la retina (Fig. 58). El tratamiento con CIS no pareció alterar el número de células Iba1<sup>+</sup> en ninguna capa (Tabla 11), mientras que la administración de CIL sí produjo un efecto estadísticamente significativo en las capas CCG y CNE+SE [F(1,8)= 9,75;  $p=0,01$  y CNE+SE: F(1,8)=5,55;  $p=0,04$ , respectivamente]: CIL incrementó el número de células Iba1<sup>+</sup> en la CCG pero produjo una reducción en la capa de los segmentos externos de fotorreceptores y CNE (CNE+SE).

**Tabla 11.** Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en las diferentes capas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

Iba1 <sup>+</sup>	CCG	CPI	CNI	CPE	CNE+SE
CIS	F=3,59; ns	F=3,11; ns	F=0,76; ns	F=0,16; ns	F=2,56; ns
CIL	F=9,75; p=0,01	F=0,06; ns	F=0,84; ns	F=0,48; ns	F=5,55; p=0,04
CIS x CIL	F=1,21; ns	F=0,62; ns	F=0,48; ns	F=1,01; ns	F=0,97; ns

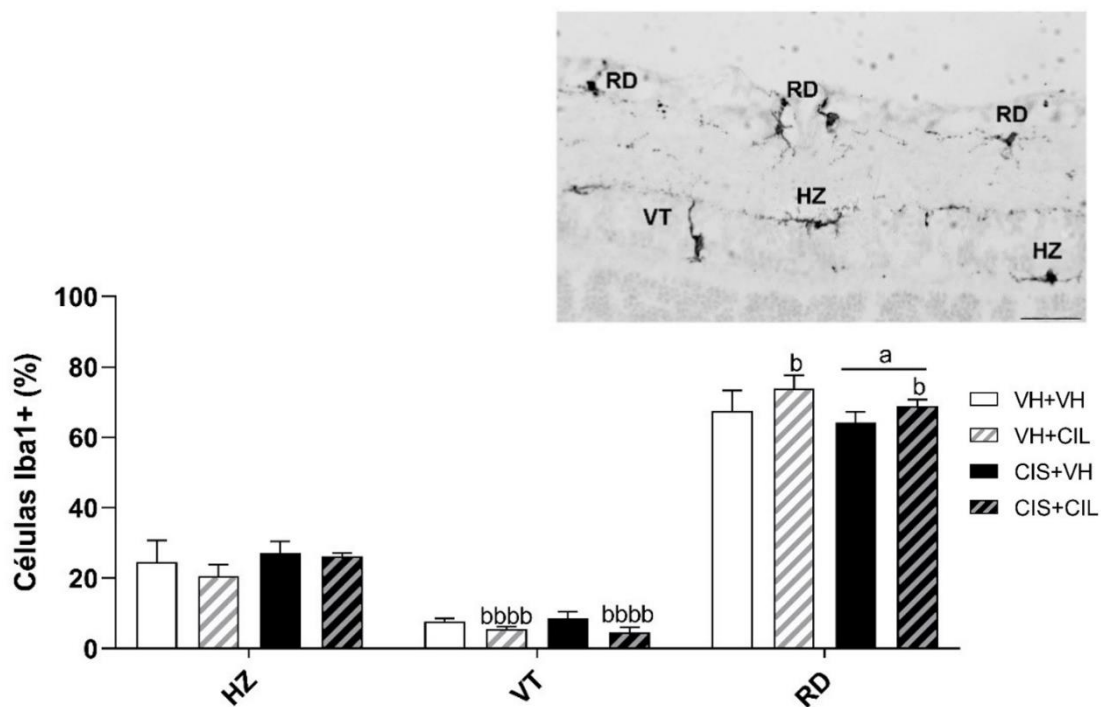
Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,12), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); CIS x CIL, Interacción, interacción de los factores CIS x CIL. n=4 animales en todos los grupos experimentales. CCG, capa células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE+SE, capa nuclear externa + segmento externo.



**Figura 58.** Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes capas de la retina. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias ± desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: b, efecto general de CIL, b p<0,05, bb p<0,01. n=4 animales por cada grupo experimental. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; SE, capa del segmento externo.

En cuanto al estudio de la expresión de Iba1 se evaluó además el grado de activación microglial mediante el análisis de los diferentes morfotipos en toda la retina (Fig. 59). El análisis de morfotipos mostró un efecto estadísticamente significativo del CIS en el número de microglía de morfotipo RD [F(1,12)=4,77; p=0,05], en ausencia de efectos sobre los VT [F(1,12)=0,00, ns], y una ligera tendencia en los HZ [F(1,12)=4,48; p=0,06].

El CIS produjo una reducción estadísticamente significativa en los morfotipos RD, de forma neta o quizás relacionada con el ligero incremento (no significativo) en los HZ. El ANOVA mostró además un efecto de la administración de CIL, en este caso, sobre los morfotipos RD y VT [ $F(1,12)=8,43$ ;  $p=0,013$  y  $F(1,12)=21,91$ ;  $p=0,001$ , respectivamente], en ausencia de efectos sobre HZ [ $F(1,12)=1,52$ , ns]. La administración de CIL incrementó la presencia de morfotipos RD, reduciendo los VT. No se detectó una interacción significativa entre los tratamientos a este nivel [CIS x CIL: HZ:  $F(1,12)=0,69$ , ns; VT:  $F(1,12)=1,39$ , ns; RD:  $F(1,12)=0,21$ , ns].



**Figura 59. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en la retina completa. Diversidad de morfotipos microgliales y representación fotográfica de cada uno de los morfotipos.** Análisis de los morfotipos (HZ, horizontal; VT, vertical; RD, radial) de células Iba1<sup>+</sup> expresados en porcentaje (%) en toda la retina. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, a  $p<0,05$ ; b, efecto general de CIL, b  $p<0,05$ , bbbb  $p<0,001$ . n=4 animales por cada grupo experimental.

## ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE MARCADORES DEL INFLAMASOMA EN LA RETINA

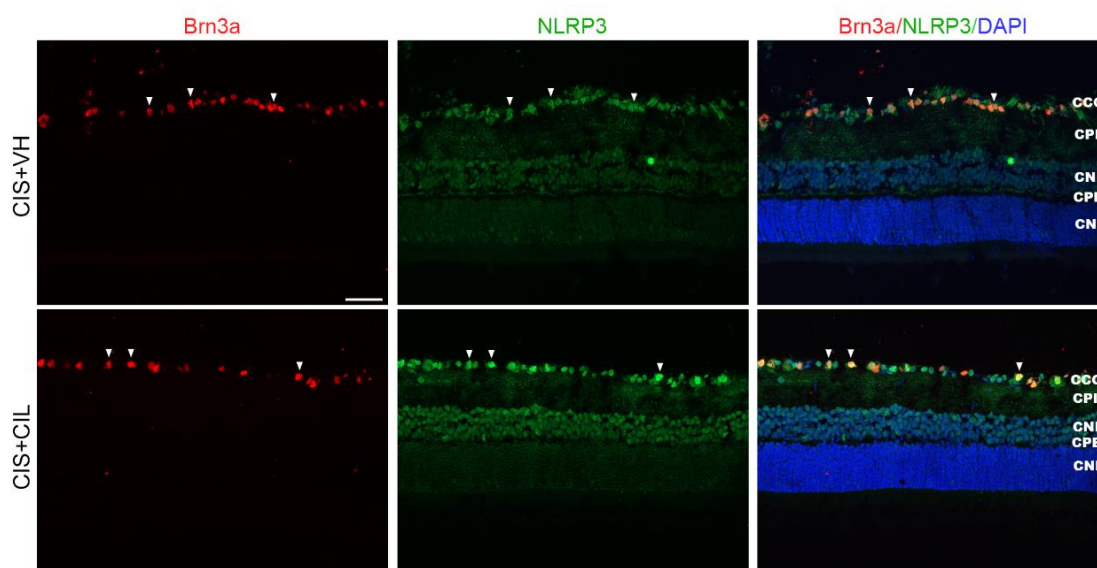
Con objeto de investigar los mecanismos moleculares implicados en el daño producido por el CIS en la retina, así como los posibles efectos protectores de las CIL nos centramos en el estudio del inflammasoma realizando para ello estudios de localización, por inmunofluorescencia, de los principales marcadores del inflammasoma: en concreto, se evaluó la expresión de los receptores NLRP3 y TLR4 en las diferentes poblaciones neuronales y gliales de la retina.

El estudio se realizó en animales de los grupos tratados, CIS+VH y CIS+CIL, donde se pudo observar la colocalización del marcador NLRP3 con las CGR, marcadas con Brn3a (Fig. 60), pero no se pudo describir una colocalización del mismo con astrocitos, células de Müller y/o microglía, identificados con GFAP e Iba1, respectivamente (Tabla 12). En las microfotografías resultantes (Fig. 60), se observan, en las muestras de CIS+VH, como las CGR (Brn3a<sup>+</sup>), se localizan en su capa correspondiente, en rojo, y son éstas mismas células las que expresan NLRP3, en verde, en la imagen conjunta; de hecho, en la imagen fusionada son numerosas las CGR que coexpresan ambos marcadores (Brn3a<sup>+</sup>/NLRP3<sup>+</sup>) y muestran un color anaranjado. Nuestros datos indican que las CGR son capaces de expresar este marcador de inflammasoma, NLRP3. Hemos de destacar que, en las muestras de CIS+CIL, este marcaje conjunto se ve reducido, ya que parecen ser menos las CGR que muestran este doble marcaje. NLRP3 parece reducir su expresión en las CGR tras el tratamiento con CIL. Además, la expresión de NLRP3 no sólo se restringe a la CCG, sino que también se expresa en la CNI, donde podría expresarse en otros tipos celulares como las células bipolares, las células amacrinas y/o horizontales.

**Tabla 12.** Análisis de la vía del inflamasoma en la retina: resultados de colocalización

Marcadores	Brn3a	GFAP	Iba1
<b>NLRP3</b>	SI (en CGR)	NO	NO
<b>TLR4</b>	NO	SI (en astrocitos)	NO

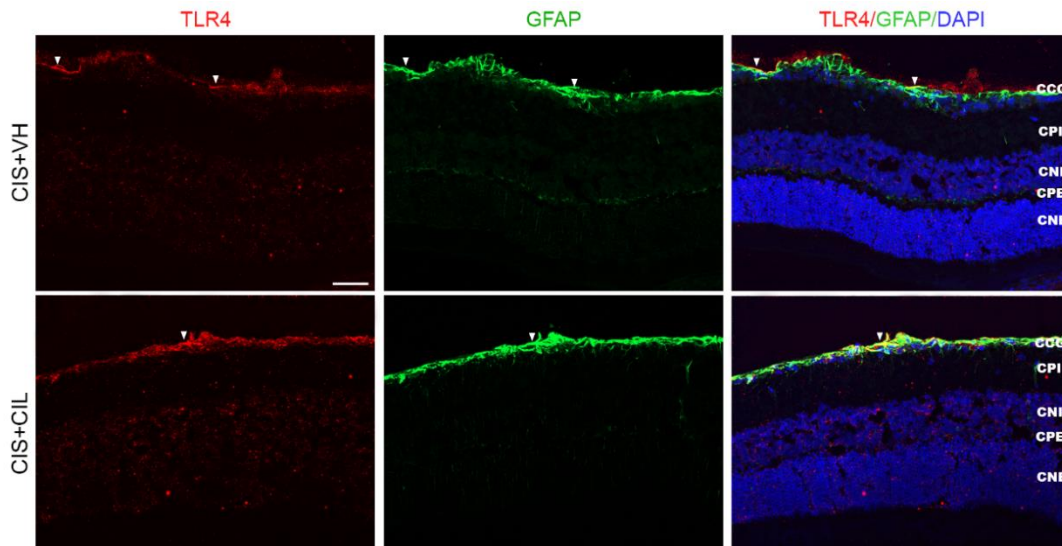
Colocalización por inmunofluorescencia de NLRP3 (dominio pirina 3 de la familia NLR) y TLR4, (receptor tipo *Toll* 4), con células ganglionares (Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A), astrocitos/células de Müller (GFAP, proteína ácida fibrilar glial) y células microgliales (Iba1, molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado) en un modelo de tratamiento con cisplatino en ratas.



**Figura 60.** Estudio inmunohistoquímico de la expresión de NLRP3 en retina. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En las figuras se muestran microfotografías representativas con marcaje individual en cada canal de color NLRP3 (verde), Brn3a (rojo), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: CIS+VH; CIS+CIL. Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A; NLRP3, dominio pirina 3 de la familia NLR; DAPI, 4',6'-diamidino-2-fenilindol; CCG, capa de células ganglionares, CPI, capa plexiforme interna, CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

También se realizó un estudio de la colocalización del marcador NLRP3 con la macroglía, marcada con GFAP en animales de los grupos tratados, CIS+VH y CIS+CIL (Fig. 64), pero no se pudo describir una colocalización del mismo con CGR y microglía, identificados con Brn3a e Iba1, respectivamente (Tabla 12).

Se observan en las microfotografías resultantes de ambos animales como la macroglía (GFAP<sup>+</sup>) localizada en la CCG en verde (Fig. 61), es la que expresa TLR4 en rojo. En la imagen fusionada se muestran algunos astrocitos que coexpresan ambos marcadores (GFAP<sup>+</sup>/TLR4<sup>+</sup>) y muestran un color amarillo. Esto parece sugerir que los astrocitos presentes en la CCG expresan este receptor de daño, TLR4. Hemos de destacar que, en las muestras de CIS+CIL, este marcaje conjunto se ve reducido, ya que parecen ser menos las CGR que muestran este doble marcaje. TLR4 parece reducir su expresión en las CGR tras el tratamiento con CIL. Cabe destacar también que la expresión de TLR4 no sólo se restringe a la CCG, sino que también se expresa en la CNI, donde al igual que ocurría con NLRP3 podría expresarse en otros tipos celulares que también estarían expresando factores del inflamasoma.



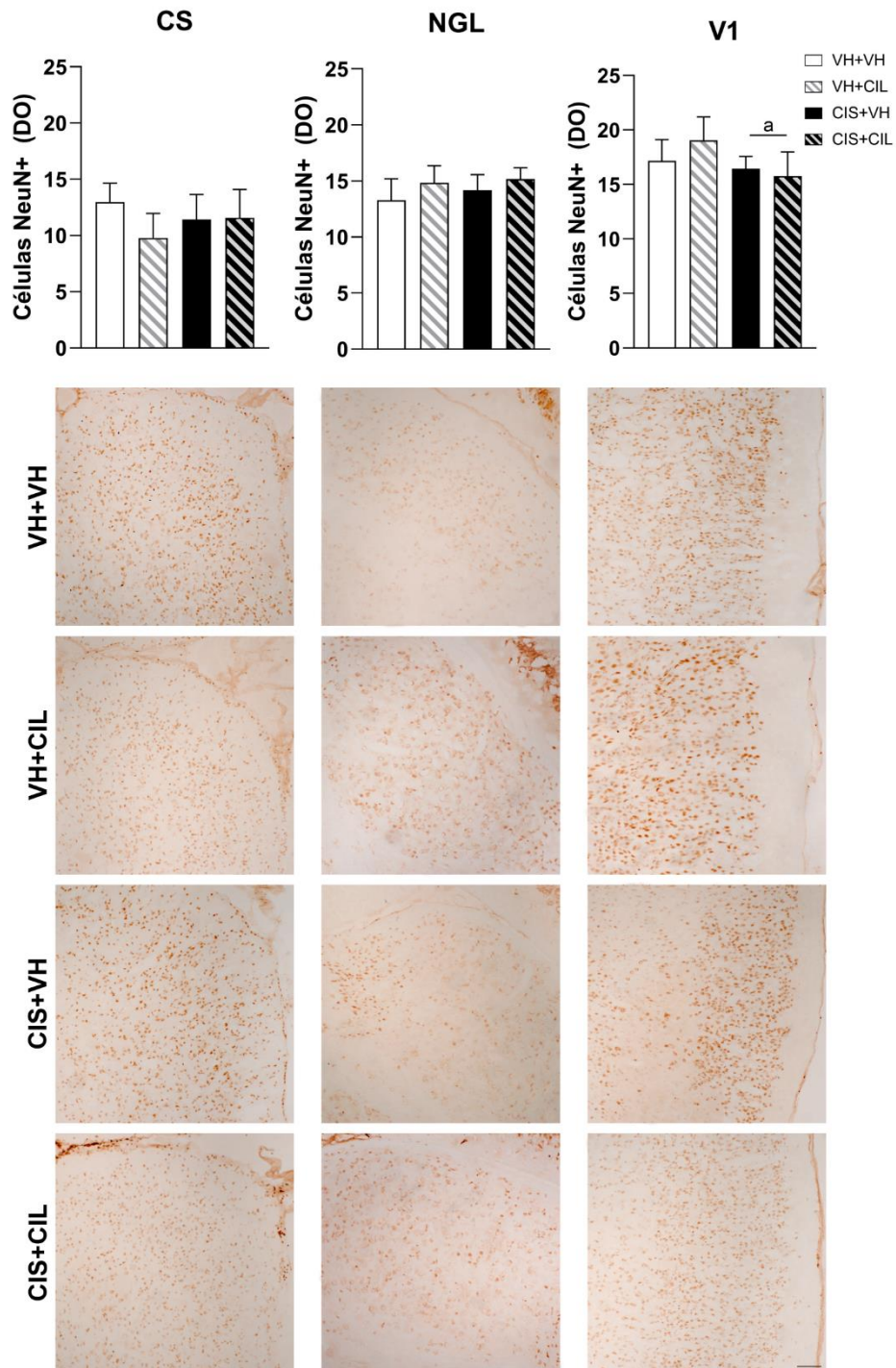
**Figura 61. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de TLR4 en retina.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En las figuras se muestran microfotografías representativas con marcaje individual en cada canal de color GFAP (verde), TLR4 (rojo), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: CIS+VH; CIS+CIL. TLR4, receptor tipo *Toll* 4; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; CCG, capa de células ganglionares, CPI, capa plexiforme interna, CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

Este estudio de colocalización es aún preliminar, pero proporciona evidencias de la implicación del inflamasoma, mediado por NLRP3 y TLR4, en el daño inducido por el CIS en la retina, y además permite señalar un posible mecanismo de acción de la CIL que reduce y/o atenúa la expresión de NLRP3 en la población dañada de CGR.

## ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA VÍA VISUAL

- ANÁLISIS DE NEURONAS ( NEUN)

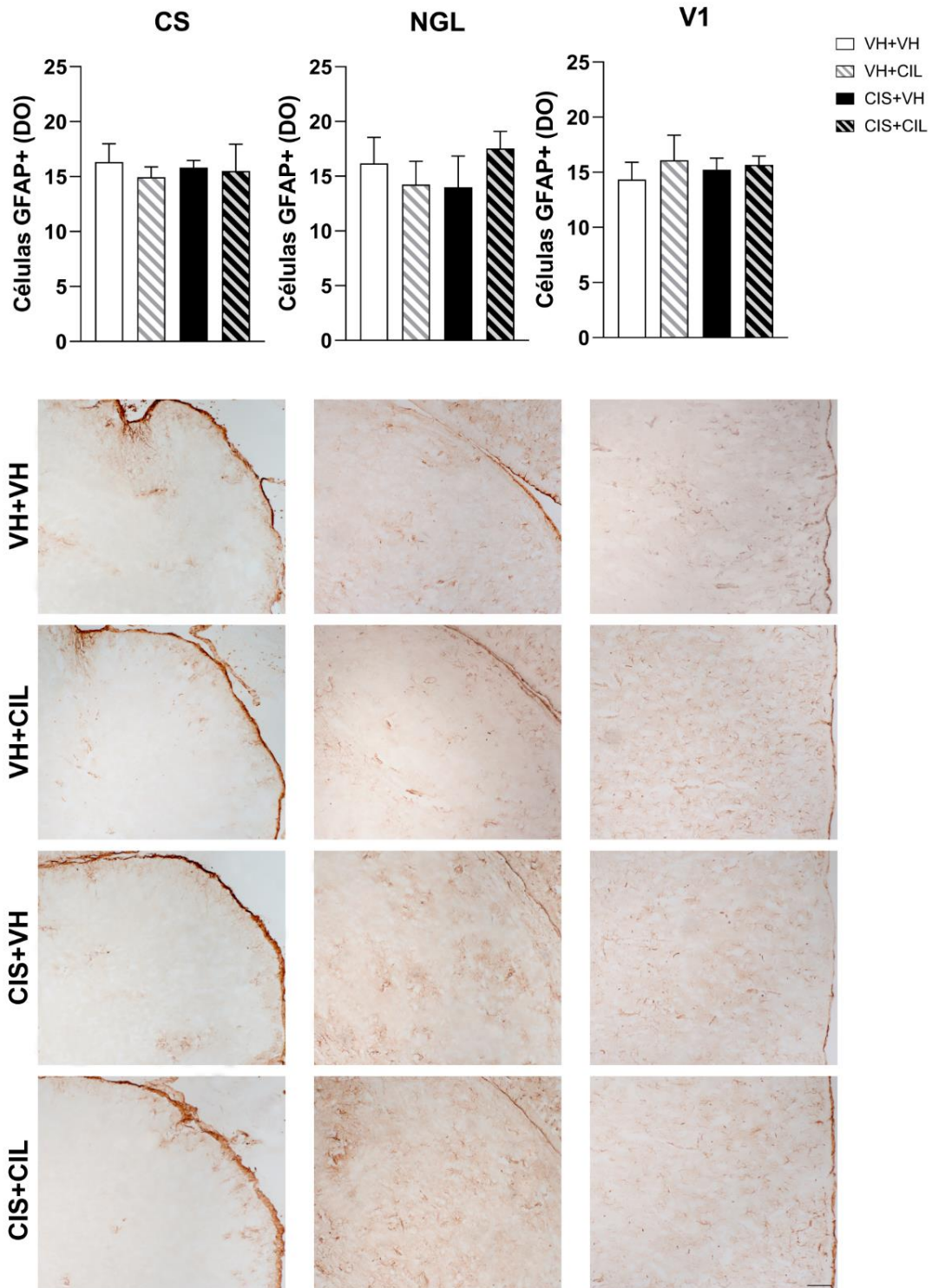
Se analizó la expresión celular de NeuN en tres zonas de la vía visual: CS, NGL y V1, anteriormente explicadas. Ninguno de los tratamientos farmacológicos, ni su interacción, afectó a la expresión de NeuN en el CS [CIS:  $F(1,16)=0,02$ ; ns; CIL:  $F(1,16)=3,68$ ; ns; CIS x CIL:  $F(1,16)=0,17$ ; ns] ni en el NGL [CIS:  $F(1,16)=0,85$ ; ns;  $F(1,16)=2,43$ ; ns; CIS x CIL:  $F(1,16)=2,89$ ; ns]. Sólo en V1 se observó un efecto estadísticamente significativo de la administración de CIS [ $F(1,16)=5,50$ ;  $p=0,03$ ], que redujo de forma general la expresión de este marcador; no se detectó ningún efecto de CIL [ $F(1,16)=0,55$ ; ns], ni de la interacción de los fármacos [ $F(1,16)=2,23$ ; ns] -(Fig.62).



**Figura 62. Expresión de células NeuN<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en los principales núcleos de relevo de la vía visual.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma (panel superior) se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, a  $p < 0,05$ .  $n = 5$  animales por cada grupo experimental. CS, colículo superior, NGL, núcleo geniculado lateral, V1, corteza visual primaria. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

- **ANÁLISIS DE CÉLULAS MACROGLIALES ( GFAP)**

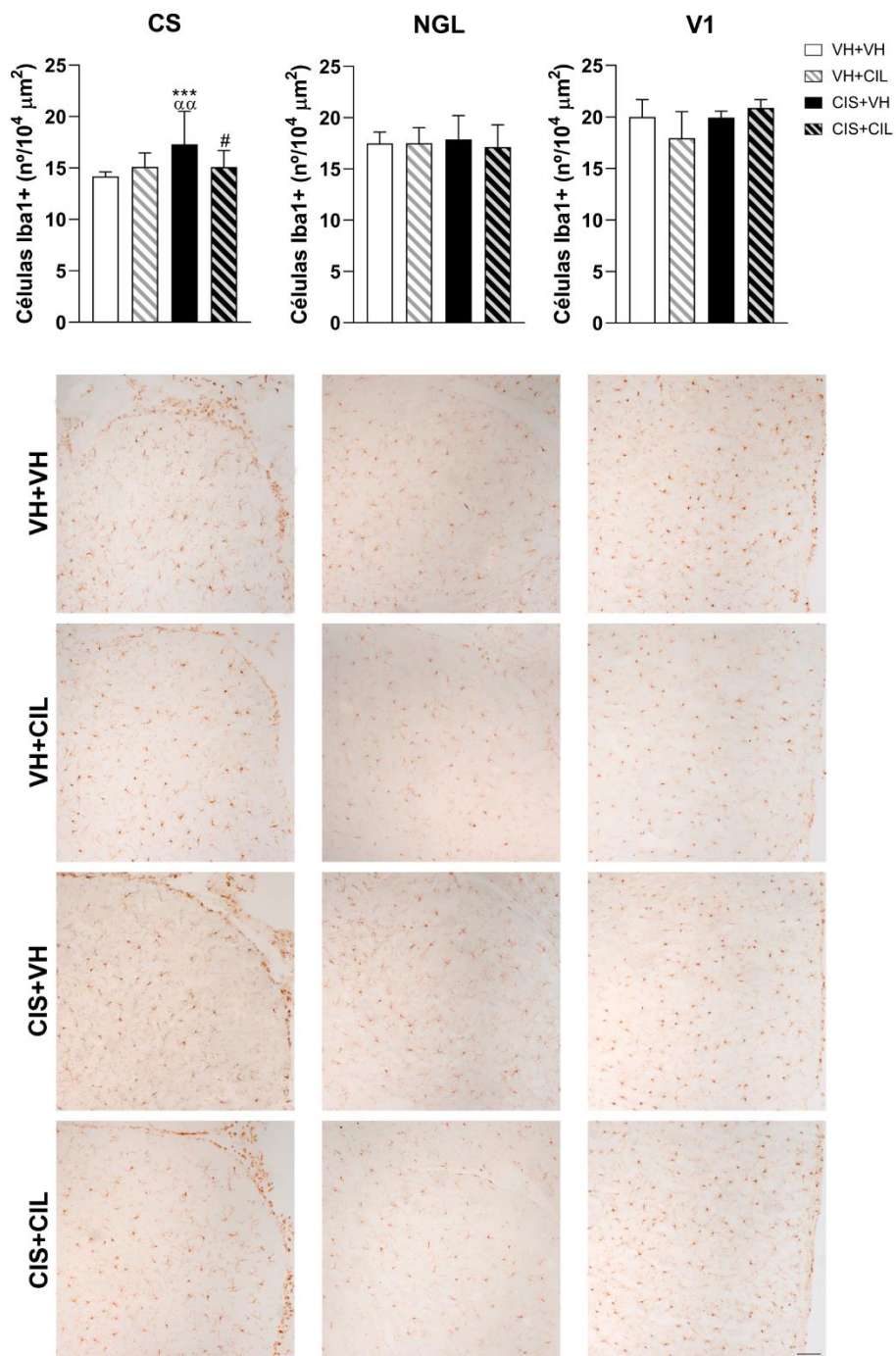
Los ANOVA de 2 vías realizados para cada una de las áreas no mostraron ningún efecto estadísticamente significativo ni de los fármacos ni de la interacción, ni en el CS [CIS:  $F(1,16)=0,00$ ; ns; CIL:  $F(1,16)=1,44$ ; ns; CIS x CIL:  $F(1,16)=0,58$ ; ns], ni en V1 [CIS:  $F(1,16)=0,12$ ; ns; CIL:  $F(1,16)=2,57$ ; ns; CIS x CIL:  $F(1,16)=0,90$ ; ns]; sólo en el NGL se observó una interacción significativa en ausencia de efectos generales de los fármacos [CIS:  $F(1,16)=2,88$ ; ns; CIL:  $F(1,16)=0,63$ ; ns; CIS x CIL:  $F(1,16)=7,27$ ;  $p=0,016$ ], aunque los posteriores análisis *post-hoc* no lograron mostrar ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales en la expresión de GFAP (Fig.63).



**Figura 63. Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes áreas de la vía visual.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. n=5 animales por cada grupo experimental. CS, colículo superior, NGL, núcleo geniculado lateral, V1, corteza visual primaria. Barra de aumentos: 50  $\mu$ m.

- ANÁLISIS DE CÉLULAS MICROGLIALES ( IBA1)

El análisis de la expresión de Iba1 (Fig. 64) mostró en el CS un efecto estadísticamente significativo de la administración de CIS [F (1,16)=11,12; p=0,004], en ausencia de efectos generales de la administración de CIL [F (1,16)=3,93; p=0,065], y una interacción significativa entre los fármacos [F (1,16)=8,53; p=0,010]. Las comparaciones a posteriores mostraron un incremento estadísticamente significativo en el número de células Iba1<sup>+</sup> en el grupo CIS+VH (CIS+VH vs VH+VH, p=0,002) que se revertía tras la administración de CIL (CIS+VH vs CIS+CIL, p=0,015). En las dos regiones restantes, NGL y V1 no se observaron efectos estadísticamente significativos de ninguno de los fármacos analizados [CIS, en NGL: F(1,16)=0,14 y en V1: F(1,16)=3,95; p=0,064; CIL, en NGL: F(1,16)=0,01; ns; y en V1: F(1,16)=0,60; ns] ni de su interacción [NGL: F(1,16)=0,01; ns; y V1: F(1,16)=4,33; p=0,054].



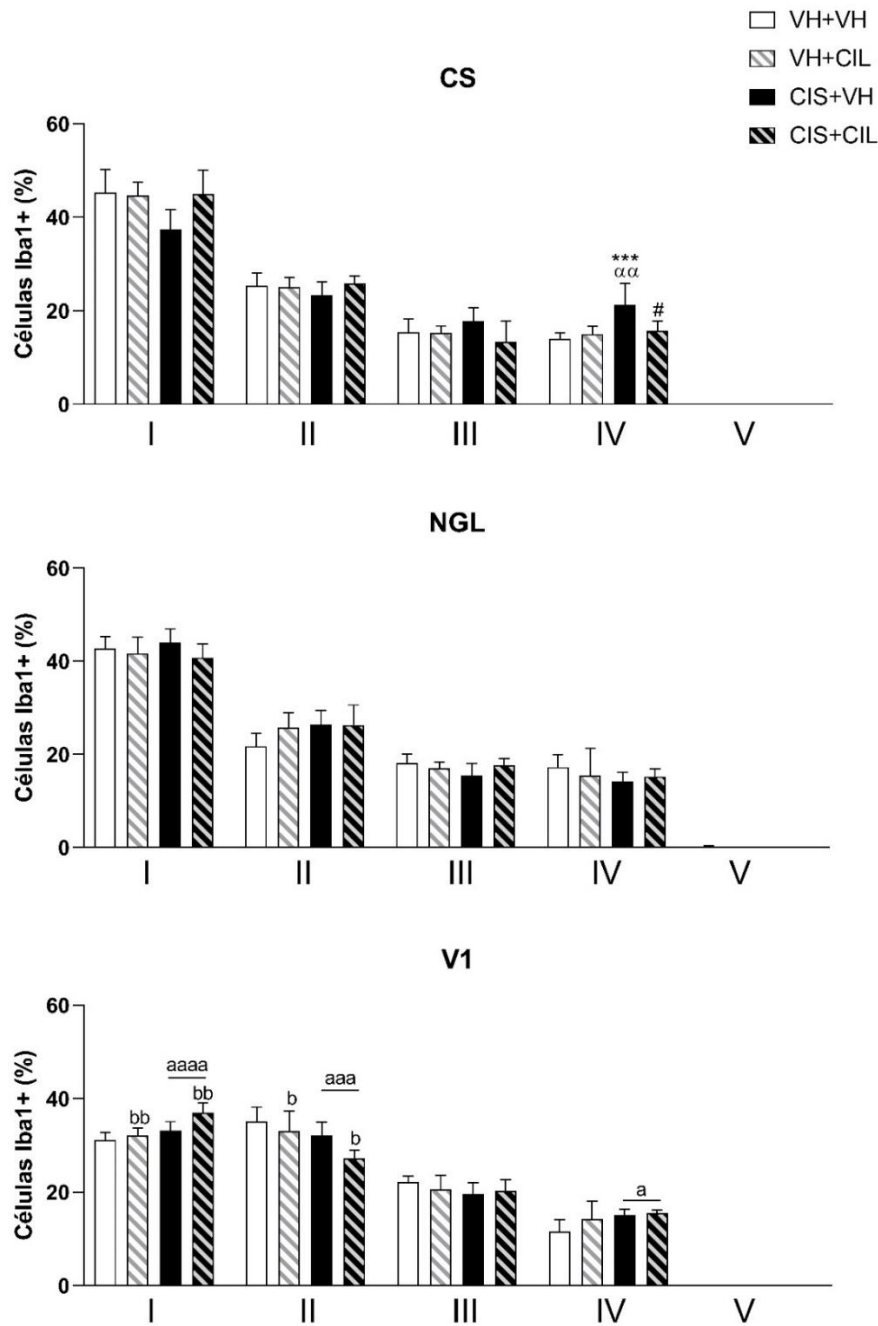
**Figura 64. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la vía visual.** Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: post-hoc \*\*\*  $p < 0,005$  vs VH+VH, #  $p < 0,05$  vs CIS+VH,  $\alpha\alpha$   $p < 0,005$  vs VH+CIL.  $n = 5$  animales por cada grupo experimental. CS, colículo superior, NGL, núcleo geniculado lateral, V1, corteza visual primaria. Barra de aumentos: 50  $\mu\text{m}$ .

Al evaluar la expresión de Iba1 se analizó además el grado de activación de la microglía cuantificando el porcentaje de cada uno de los morfotipos presentes en cada región analizada (Tabla 13). Los resultados más significativos demuestran que en el CS la administración de CIS provocó una reducción en la presencia del morfotipo I, posiblemente a expensas del morfotipo IV que se ve significativamente incrementado en el grupo CIS+VH (CIS+VH vs VH+VH,  $p=0,003$ ); este incremento en el morfotipo IV en CS se ve completamente atenuado y/o revertido por la administración de CIL (CIS+CIL vs CIS+VH,  $p=0,023$ ). En el NGL no se observan cambios en los niveles de activación de la microglía. Sin embargo, en V1 se observa un efecto general de la administración de CIS, que parece incrementar la presencia del morfotipo I, reducir la del morfotipo II, e incrementar ligeramente la presencia del morfotipo IV; de forma similar, la administración de CIL también incremento la presencia del morfotipo I y redujo la del morfotipo II, sin modificar el porcentaje de los demás morfotipos (Fig. 65).

**Tabla 13.** Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en los distintos núcleos de la vía visual, colículo superior (CS), núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) y corteza visual primaria (V1): Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías

	Iba1 <sup>+</sup>	I	II	III	IV	V
CS	CIS	F=3,68; p=0,07	F=0,26; ns	F=0,04; ns	F=11,24; p=0,01	-
	CIL	F=3,28; p=0,09	F=1,06; ns	F=2,76; ns	F=3,68; ns	-
	CIS x CIL	F=4,36; ns	F=1,68; ns	F=2,48; ns	F=7,29; p=0,02	-
dNGL	CIS	F=0,01; ns	F=2,96; ns	F=1,52; ns	F=1,20; ns	F=1,00; ns
	CIL	F=2,41; ns	F=1,68; ns	F=0,42; ns	F=0,06; ns	F=1,00; ns
	CIS x CIL	F=0,64; ns	F=1,88; ns	F=3,82; ns	F=0,90; ns	F=1,00; ns
V1	CIS	F=18,02; p=0,001	F=10,24; p=0,006	F=1,80; ns	F=5,09; p=0,04	-
	CIL	F=8,79; p=0,01	F=6,14; p=0,025	F=0,19; ns	F=1,94; ns	-
	CIS x CIL	F=2,85; ns	F=1,12; ns	F=1,34; ns	F=1,11; ns	-

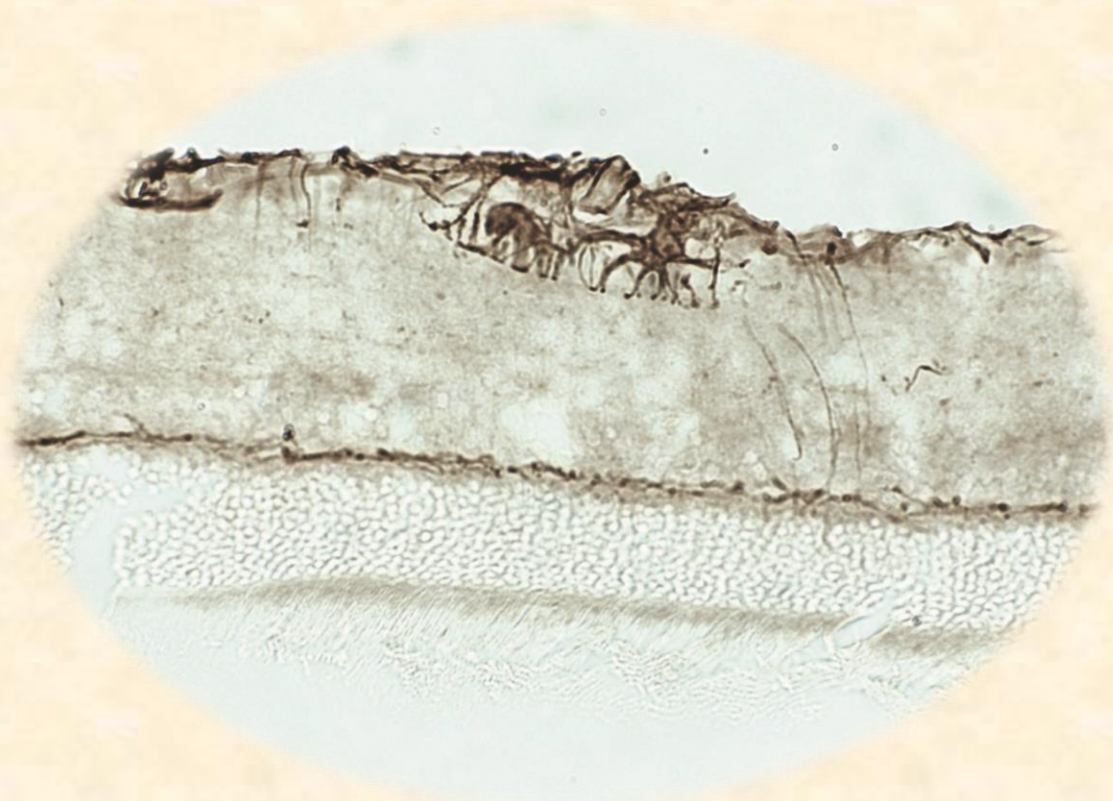
Se muestran los valores del estadístico F, con sus grados de libertad (1,16), seguidos del p-valor (p) en el caso de efectos estadísticamente significativos; o ns (no significativo), en el caso de no encontrar efectos estadísticamente significativos. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); Interacción, interacción de los factores CIS x CIL. n=4 animales en todos los grupos experimentales. CS, colículo superior, NGL, núcleo geniculado lateral, V1, corteza visual primaria.



**Figura 65. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la vía visual. Diversidad de morfotipos microgliales.** Análisis de los morfotipos (I, II, III, IV y V) de las células Iba1<sup>+</sup>, expresados en porcentaje (%) respecto al número total de células de cada animal, en cada uno de los núcleos de interés de la vía visual. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de cisplatino (CIS, 5 mg/kg i.p.), o su vehículo (VH), y, a continuación, dosis repetidas de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH, durante un total de cinco días; los análisis se realizaron a los 6 días tras la administración con CIS. En el histograma se muestran las medias ± desviación estándar (D.E.) de los grupos experimentales: VH+VH; VH+CIL; CIS+VH; CIS+CIL. ANOVA de 2 vías: a, efecto general de CIS, a p<0,05, aaa p<0,005, aaaa p<0,001; b, efecto general de CIL, b p<0,05, bb p<0,01. ANOVA de 2 vías: post-hoc \*\*\* p<0,005 vs VH+VH, # p<0,05 vs CIS+VH, αα p<0,005 vs VH+CIL. n=5 animales por cada grupo experimental. CS, colículo superior, NGL, núcleo geniculado lateral, V1, corteza visual primaria.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral encontramos que la administración de CIS induce, en nuestro modelo animal, una marcada reducción del peso y fallo renal; la administración repetida de CIL fue capaz de revertir parcialmente la pérdida de peso y bloquear el daño renal asociado. Al evaluar los efectos del CIS en la retina, en el estudio preliminar de TCO encontramos un ligero engrosamiento en la zona más alejada del disco óptico (AS2), lo cual sugiere un posible edema, que fue prevenido y/o atenuado por la administración de CIL. El análisis inmunohistoquímico de la retina permitió describir que el efecto del CIS produjo un descenso de células Brn3a positivas, pero solo en la zona de retina CC y TS; un aumento de la expresión de GFAP en el área NC y una disminución en todas las áreas temporales; y el principal efecto se observa sobre todo a nivel de las células de microglía cuya expresión se reduce, afectando principalmente a las células de morfología radial. La administración de CIL no modificó los efectos inducidos por la administración de CIS en la retina. En la vía visual el CIS produce una reducción significativa la expresión del marcador neuronal NeuN en la V1, y produce un incremento significativo en la expresión de Iba1 en las células microgliales en el CS y un aumento de células microgliales activas tanto, en el CS como en la V1. La administración de CIL consiguió atenuar o revertir los efectos inducidos por el CIS en cuanto al número de células microgliales y su mayor activación en el CS.

Nuestro estudio (y previos) muestran que una única administración de CIS, incluso a dosis menores de las empleadas por otros autores, es capaz de reducir el peso corporal de los animales (Ali *et al.*, 2007; Humanes *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Goswami *et al.*, 2019); esta reducción en el peso se ha relacionado, en algunos casos, con una reducción en la ingesta (Chen *et al.*, 2019; Goswami *et al.*, 2019) o con la toxicidad gastrointestinal inducida por el CIS cuando este se administró de forma crónica (Uranga *et al.*, 2017; Nardini *et al.*, 2020).

En estudios iniciales (Sugihara & Gemba, 1986), la administración de una dosis similar de CIS produjo una pérdida de peso muy marcada, asociada muy posiblemente a la presencia de diarrea en dichos animales; en nuestro estudio no hemos observado este efecto. La pérdida de peso podría también relacionarse con los efectos nefrotóxicos del CIS, de hecho, en este trabajo hemos descrito un marcado daño renal tras una administración única de CIS similar al descrito en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Moreno-Gordaliza *et al.*, 2011; Humanes *et al.*, 2012; 2017) y en otros estudios (Ali *et al.*, 2007; Arita *et al.*, 2021; Li & Zhao, 2024). En estos trabajos el daño renal no solo se infirió a través de los niveles incrementados de creatinina y NUS en suero, sino también a través de estudios histológicos, y/o análisis de otros marcadores de fracaso renal. Ali *et al.* (2007) sugirieron que la reducción del peso corporal tras el tratamiento con CIS pudiera deberse al daño nefrotóxico, por la lesión de los túbulos renales y a la consiguiente pérdida de células tubulares encargadas de la reabsorción de agua, lo que provocaría la deshidratación y pérdida de peso corporal en los animales.

En nuestro modelo, la administración de CIL atenuó la pérdida de peso asociada a la administración de CIS, como en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.* 2012; 2017; González-Fernández *et al.*, 2022). En este caso, es posible que esa atenuación en la pérdida de peso sea consecuencia del efecto de CIL a nivel renal, ya que la administración repetida de CIL logró recuperar los parámetros renales alterados, creatinina y NUS, y, por tanto, la pérdida de peso derivada.

En este estudio se ha realizado una primera aproximación que permitiera evaluar el posible daño retinotóxico del CIS, *in vivo*, mediante la aplicación de la TCO. En este caso, nuestros resultados no mostraron grandes modificaciones en el grosor de la retina, ni el grosor de la CFNO. Sin embargo, al reevaluarlos agrupándolos por sectores, encontramos un incremento significativo en el grosor de la retina tras el tratamiento con CIS, de forma específica en el área sectorial que dista 2 mm del disco óptico, el AS2. Este incremento en el grosor de la retina sugiere la presencia de un edema en la retina, similar al descrito en estudios previos (Yazici *et al.*, 2014).

Yazici y colaboradores mostraron, mediante estudios histológicos, un aumento en el grosor de la retina de forma global, como consecuencia de la administración de CIS, y además vieron que este incremento en el grosor era también evidente en diferentes capas de la retina: CNE, CNI y CPI. Los autores relacionan la presencia del edema con el daño citotóxico encontrado, que demostraron mediante el incremento en el índice apoptótico, tanto en CNI como en CCG. Sin embargo, el daño descrito por estos autores parece mucho mayor y más extendido que el observado en nuestro estudio, posiblemente debido a las diferencias en la dosis y perfil de administración de CIS: en nuestro estudio empleamos una dosis única de CIS de 5 mg/kg, mientras que en este estudio la dosis aplicada fue de 16 mg/kg durante 3 días consecutivos.

En este sentido, cabe reseñar que los efectos retinotóxicos del CIS descritos en humanos (Tabla 2 del apartado “Introducción”) se han encontrado, en todos los casos, tras la administración de dosis mayores de CIS, y tras la administración repetida del quimioterápico. En pacientes, el rango de dosis recomendado se encuentra entre los 50 y los 100 mg/kg<sup>2</sup> (Fresenius Kabi, 2017), y, en nuestro estudio la dosis aplicada (5 mg/kg<sup>2</sup>) trasladada a humanos ha sido algo menor, 30 mg/kg<sup>2</sup> (U.S. FDA & CDER, 2005). Además, los efectos del CIS parecen ser dosis dependiente, alcanzando un mayor interés la dosis acumulada de CIS, que es la resultante tras la administración repetida del fármaco durante los diversos ciclos de tratamiento con el quimioterápico. De hecho, en la TCO se ha descrito que el efecto del CIS sobre la reducción del CFNO es dosis dependiente, correlacionándose con la dosis acumulada de CIS (Dulz *et al.*, 2017). En nuestro estudio no observamos ningún efecto a este nivel, posiblemente debido a la dosis empleada. En estudios futuros, posiblemente sea de interés valorar un reajuste en la dosis, y extender la administración de una dosis mayor de CIS a varios ciclos con el fin de hacer el tratamiento más similar al administrado en pacientes humanos.

La administración de CIL fue capaz de atenuar y/o revertir el incremento en el grosor de la retina observado en el área AS2, sugiriendo un posible potencial terapéutico al corregir el edema asociado al tratamiento con CIS.

Esta observación va en línea con nuestros resultados más recientes, en los que demostramos que CIL es capaz de atenuar y/o prevenir tanto la activación macroglial como microglial presente en la retina tras la inducción experimental de un glaucoma (Martínez-López *et al.*, 2024), y el edema observado en la retina sería, por tanto, bloqueado y/o reducido gracias a las propiedades antiinflamatorias de CIL. Por otro lado, en este estudio se encontró un efecto de la administración de CIL, *per se*, en la zona C0, o centro óptico, donde el grosor de la retina pareció reducido frente al grosor observado en las retinas de los animales control.

Serán necesarios más estudios para verificar si este efecto es consistente al incrementar el número de animales, o si se replica en alguna otra área de la retina.

En los estudios inmunohistoquímicos hemos podido demostrar que la administración de una única dosis de CIS afecta a diferentes poblaciones celulares de la retina (Tabla 14), ejerciendo un efecto más marcado en las células microgliales. La administración de CIS no pareció afectar a las CGR al considerarse la retina completa, pero, al analizar por separado cada una de las 9 áreas de ésta, encontramos que el CIS provocó una reducción en la expresión del marcador de CGR en las áreas CC y TS. Estos resultados discrepan de la literatura anterior, en la que se había descrito en la CCG un incremento en el índice de apoptosis (Yazici *et al.*, 2014), una marcada degeneración (Raheem & Mahmood, 2023) e incluso la degradación total (Karakurt *et al.*, 2018); aunque, en estos casos, tras la administración de dosis mayores (Yazici *et al.*, 2014; Karakurt *et al.*, 2018; Raheem & Mahmood, 2023). En dos de estos estudios la administración de CIS se realiza de forma repetida durante 3 días (Yazici *et al.*, 2014) o 14 días (Karakurt *et al.*, 2018) de forma que la dosis acumulada que se alcanza en cada uno de los estudios es mucho mayor (48-70 mg/kg) y, tal y como se ha descrito previamente, la toxicidad retiniana parece ser dosis-dependiente (Dulz *et al.*, 2017); por tanto, nuestros resultados parecen indicar que la dosis empleada en nuestro modelo resulta más baja que la necesaria para provocar un daño similar, de degeneración de CGR, al encontrado en estudios previos.

**Tabla 14.** Resumen de los principales resultados obtenidos en la retina, en las distintas áreas analizadas, tras la administración de cisplatino (CIS).

		NASAL			CENTRAL			TEMPORAL		
		S	C	I	S	C	I	S	C	I
Brn3a	CIS					↓		↓		
	CIL		↑					↑		
	CISxCIL									
GFAP	CIS		↑					↓	↓	↓
	CIL	↓			↑				↑	
	CISxCIL									↓
Iba1	CIS	↓	↓	↓	↓	↓				
	CIL			↑	↑		↑		↑	
	CISxCIL								↑	

Principales resultados del análisis inmunohistoquímico de células ganglionares (Brn3a), astrocitos/células de Müller (GFAP) y células microgliales (Iba1). CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); CISxCIL, interacción de los factores CISxCIL; Brn3a, homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba1, molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; S, superior; C, central; I, inferior

La literatura existente describe también un daño muy marcado en las otras capas nucleares de la retina. La capa de fotorreceptores aparece afectada en todos los estudios encontrados: Yazici *et al.* (2014) indica la presencia de edema tanto en la CNE como en la CNI, encontrando además en esta última un mayor índice de apoptosis; Karakurt *et al.* (2018) muestra una atrofia y desorganización en el segmento externo de los fotorreceptores, y la degeneración de la CNI; y Raheem & Mahmood (2023) describen una marcada degeneración de la capa de fotorreceptores. Los estudios en humanos (Tabla 2 del apartado “Introducción”) muestran también, de forma bastante consistente, una afectación en la percepción del color, lo que implicaría alteraciones en los fotorreceptores, fundamentalmente en los conos, que han sido demostradas en algunos casos tras los registros ERG (Wilding *et al.*, 1985; Marmor *et al.*, 1993; Dulz *et al.*, 2017); aunque en los estudios histológicos *post-mortem* no siempre se han observado alteraciones en la capa de fotorreceptores (Katz *et al.*, 2003).

En estudios futuros, los análisis inmunohistoquímicos serán ampliados a otras poblaciones celulares de la retina, incorporando análisis de la capa de fotorreceptores y de otros tipos celulares presentes en la CNI, prestando un especial interés a las células bipolares que conectan los fotorreceptores y las CGR. De forma complementaria se realizarán valoraciones funcionales de las diferentes poblaciones celulares de la retina, mediante registros ERG, con el fin de evaluar si el daño funcional precede a la degeneración celular, pudiendo así discernir si en nuestro modelo actual nos encontramos en estadios tempranos del daño o si, por el contrario, se ha administrado una dosis tan baja de CIS que no es capaz de inducir una degeneración celular.

Un daño en la retina provoca, generalmente, una macrogliosis (Shinozaki & Koizumi, 2021). Sin embargo, en nuestro estudio, no hemos observado diferencias en la expresión de GFAP entre nuestros grupos experimentales al analizar la retina completa. Aunque el estudio detallado por áreas sí nos ha permitido observar un incremento en la expresión de GFAP, una activación macroglial, en el área NC, y una reducción en la expresión de GFAP en todas las áreas temporales (véase Tabla 14). Los estudios en los que se analiza la retinotoxicidad de CIS y cómo afecta a las células macrogliales de la retina muestran resultados contradictorios: Zueva *et al.* (2014) en un estudio realizado mediante técnicas de microscopía electrónica en relación a la acumulación intracelular de CIS, han demostrado que la acumulación de CIS ocurre, mayoritariamente, en células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) y no en neuronas; mientras que otros autores han mostrado resultados similares a los nuestros, en los que no encontraron cambios en la expresión de GFAP tras la administración de dosis mayores de CIS en regiones específicas del SNC (Zhou *et al.*, 2016; Chiu *et al.*, 2017). En este sentido, se ha descrito, en estudios *in vitro*, con cultivos de astrocitos, que el CIS a dosis bajas produce una detención permanente del crecimiento de estos, suprimiendo además su capacidad autofágica (Jiang *et al.*, 2018). Por tanto, no podemos descartar que el daño inducido por el CIS en los astrocitos, incluso a la dosis empleada en el presente Tesis Doctoral, sea mucho mayor del observado con nuestro marcador, GFAP.

Es posible, quizás, que, en nuestro estudio, la administración de CIS haya dañado notablemente a los astrocitos de la retina, que su función y proliferación se haya visto comprometida (aunque no su expresión de GFAP) y que, en las áreas temporales se haya iniciado un proceso de degeneración que, con el tiempo, podría extenderse a regiones más centrales y/o nasales de la retina.

De manera alternativa, nuestros resultados podrían también explicarse si se considera que los astrocitos afectados por CIS en nuestro estudio fueran sólo aquellos más próximos a la zona del disco óptico (NC), donde se observa una ligera activación macroglial, reflejada por el incremento de la expresión de GFAP, ya que es a esta zona a la que llega en primer lugar el CIS, tanto en el caso de una llegada directa del fármaco, tras la ruptura de la BHE y BHR (como ya se ha indicado en la Introducción), como en el caso de la llegada de las moléculas inflamatorias circulantes resultantes de la inflamación sistémica inducida por CIS; se produciría así la activación de las células macrogliales en la zona nasal, y, en estadios posteriores, esta oleada de activación se iría extendiendo hacia las zonas más temporales de la retina. Sin embargo, no podemos descartar que, en nuestro estudio, la dosis haya sido tan baja que sólo haya alcanzado a producir una activación en las zonas más próximas al disco óptico, donde llega a la mayor concentración, y que no se observa un daño mayor ya que esta dosis de CIS no alcanza áreas más distantes de la retina. En estudios futuros ampliaremos las técnicas empleadas para caracterizar en mayor profundidad la funcionalidad de esta población macroglial.

Por último, nuestros resultados del estudio de la expresión por capas de la retina de GFAP muestran que en las retinas de los animales tratados con CIS se ha producido un incremento significativo en la expresión de GFAP solo en la CPI, pero no en las nucleares. Estos resultados difieren de los de Raheem & Mahmood (2023) quienes demostraron una marcada gliosis, con un elevado contenido celular en las CNI y CNE.

Es posible que, quizás, esa activación macroglial (incremento en la expresión de GFAP) en CPI se produzca en una población glial específica, recientemente descrita en la retina de ratones precisamente en dicha localización (CPI y CCG) (Holden *et al.*, 2024). Estos astrocitos desplazados presentan una distribución radial con mayor concentración en la cabeza del NO, de manera que puede que su migración se haya producido a partir del nicho de células madre presente en esta, coincidente con la activación glial encontrada en el área NC de la retina, área cercana a la entrada del NO.

En nuestro modelo la administración de CIS afecta de forma mucho más marcada a la población de células microgliales (véase Tabla 14). De hecho, ya en el estudio global de la retina encontramos que la administración de CIS redujo de forma significativa la expresión del marcador molecular empleado para detectar las células microgliales, Iba1. En el análisis por áreas vemos que este descenso en la población microglial se manifiesta principalmente en las áreas nasales y centrales, encontrando además que la reducción se produce mayoritariamente en la microglía radial, que es la que se encuentra en un estado de inmunovigilancia basal. En este estudio la administración de CIS parece tener efectos citotóxicos en las células de microglía, que se manifiestan fundamentalmente en las regiones próximas al disco óptico (regiones nasal y central en todas sus zonas), quizá porque es por la irrigación del disco óptico como llega principalmente el quimioterápico a la retina, lo que nos lleva a pensar en el efecto directo de CIS o de las sustancias proinflamatorias que llegan por el circulatorio a la retina.

Es importante destacar que, aunque se reduce el número total de células de microglía, y de entre ellas las que presentan un morfotipo RD, es cierto que se observa una ligera tendencia a que la administración de CIS provoque un aumento en el porcentaje relativo al morfotipo HZ, morfotipo migratorio, activado, que se desplaza a lo largo de una misma capa, explicando así también la ausencia de diferencias en la expresión de células microgliales entre las diferentes capas de la retina.

Al igual que se ha indicado en el caso de las células macrogliales de las áreas cercanas al disco óptico, los resultados obtenidos nos llevan a plantear que la reducción del número de células microgliales se deba al daño generado, que ha causado su destrucción o disminución de su funcionalidad; mientras que, las que no hayan sido tan afectadas, empiecen a activarse en la zona de mayor daño, adquiriendo morfotipos migratorios activos, como respuesta y que en estadios posteriores esta activación se extienda hacia las zonas más temporales de la retina.

Nuestros datos mostraron que el CIS afecta principalmente a todos los grupos celulares estudiados de las regiones nasales y centrales de la retina (Tabla 14). Aunque las moléculas grandes como el CIS no traspasan la BHE, múltiples factores pueden contribuir a que se produzca la ruptura de esta y permita el paso al SNC (Santos *et al.*, 2020), el hecho de que las regiones nasal y central de la retina, las más próximas al disco óptico, sean las más afectadas tras la administración de CIS sugiere una alteración importante de la BHR y/o de la BHE. Lo que concuerda con la bibliografía previa que demuestra que el nervio óptico se encuentra dañado tras la administración de CIS, aunque en una dosis superior (7 mg/mg) a la empleada por nuestro grupo (González *et al.*, 2001; Raheem & Mahmood, 2023), lo que también podría ser indicativo de que en nuestro modelo el daño retinotóxico del CIS está en una etapa muy inicial aún. Junto con la reducción en la expresión de Iba1 en casi todas las áreas de las zonas nasal y central podemos apreciar un incremento en la expresión de GFAP de la macroglía presente en dicha zona (CC). Sería interesante evaluar el daño en las diferentes poblaciones de la retina a diversos tiempos con el fin de conocer el patrón temporal de progreso del daño, así como la secuencia de activación y/o degeneración del daño descrito en los diferentes tipos celulares.

La administración repetida de CIL causó algún efecto sobre las poblaciones celulares de la retina, en especial sobre las gliales. CIL aumentó la expresión de GFAP en las áreas CS y TC, así como la expresión de Iba1 en las áreas NI, CI y TS. Esto podría deberse a que, en situaciones fisiológicas, CIL ejerciese un ligero efecto de activación macroglial y microglial, que mejorase la protección endógena de la retina frente a otros posibles daños; de hecho, se observa que la administración de CIL incrementa los morfotipos RD de microglía, es decir, aquellos encargados de la inmunovigilancia basal, sin modificar, o incluso reduciendo los morfotipos reactivos migratorios HZ y VT, respectivamente. Es más, es en la CCG donde se ve un incremento en el número de células de microglía, y puede que este incremento se observe en esta localización ya que es la capa en la que se localizan las CGR, las neuronas encargadas de la transmisión de la información visual hacia otros núcleos de relevo de la vía visual.

En nuestro estudio no observamos una interacción entre los fármacos, un bloqueo o reversión de los daños inducidos por CIS. Esta falta de efecto podría deberse a que el daño ha sido muy leve o sutil, y CIL sólo resulte efectivo antes situaciones de daño más graves. De hecho, en nuestro estudio previo en un modelo experimental de glaucoma, donde la pérdida de CGR es muy marcada, se observa una notable activación macroglial, y la activación microglial es masiva, CIL se mostró como un fármaco efectivo con propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras (Martínez-López *et al.*, 2024).

Queda pendiente, por tanto, para un futuro, la evaluación de la posible interacción de estos dos fármacos en condiciones de mayor daño; condiciones que se logren, muy posiblemente, incrementando la dosis de CIS y extendiendo su frecuencia de administración a varios ciclos.

Los resultados obtenidos en la retina por la acción de CIS nos llevaron a plantear la búsqueda de los posibles mecanismos de acción. Como se ha indicado en la Introducción algunos de los efectos de CIS podrían estar mediados por la activación del receptor TLR4 (Squillace *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2008) y a que éste, entre otros, activa el inflammasoma mediado por NLRP3 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2013), implicado en mecanismos de neurotoxicidad (Squillace *et al.*, 2022). Por lo anterior nos planteamos analizar la colocalización de NLRP3, así como la de TLR4, con las distintas poblaciones retinianas estudiadas.

NLRP3 se expresa en diversas partes de la retina, incluyendo el epitelio pigmentario, los astrocitos y las células de Müller (Rathnasamy *et al.*, 2018; para revisión consultar: Coyle *et al.*, 2021), las células de microglía (Johann *et al.*, 2015; Deora *et al.*, 2020); así como en la conjuntiva, la malla trabecular y las células epiteliales de la córnea en situaciones patológicas (McGilligan *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2019). Estudios recientes han demostrado que NLRP3 parece estar implicado en los procesos de muerte de las CGR tras una lesión del NO (Feng *et al.*, 2016; Puyang *et al.*, 2016). Nuestros resultados muestran una colocalización de NLRP3 con Brn3a, lo cual podría demostrar cierta activación de la vía del inflammasoma tras el tratamiento con CIS, potencial mediador responsable de la afectación a estas neuronas. La expresión de NLRP3 en células gliales está bien caracterizada en la literatura en modelos murinos (Devi *et al.*, 2012; Johann *et al.*, 2015).

Sin embargo, en nuestro estudio no hemos sido capaces de detectar su co-expresión con células gliales retinianas, por lo que las modificaciones por el tratamiento con CIS en la reducción del número de células gliales no parecen deberse a la actuación directa del fármaco sobre el inflamasoma mediado por NLRP3.

Se ha demostrado que TLR4 se expresa en las CGR y desempeña un papel importante en su función y supervivencia (Zhao *et al.*, 2016); que la activación de TLR4 en astrocitos induce respuestas inflamatorias (Bowman *et al.*, 2003; Rodríguez- Gómez *et al.*, 2020); y que es indispensables en la activación microglial (Yao *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran que los receptores TLR4 colocan solo con células macrogliales, por lo que es posible que el aumento de la expresión de GFAP en la zona NC de la retina, la más cercana al disco óptico, pudiera deberse a que CIS, que es un DAMP, activase estos receptores e iniciase un proceso neuroinflamatorio mediado por las células macrogliales.

En resumen, en nuestro estudio hemos caracterizado la expresión de NLRP3 en CGR y de TLR4 en células que expresan GFAP. Esta activación de TLR4 puede conducir a la generación de citoquinas proinflamatorias y a la generación de ROS y podrían llevar a la célula a la apoptosis vía NF- $\kappa$ B y con ello a producir una retinotoxicidad (Zhang *et al.*, 2007; Kono & Rock, 2008). En estudios futuros profundizaremos en el análisis completo de la vía del inflamasoma, analizando otros mediadores de esta como gasdermina y/o caspasas, en las distintas poblaciones celulares. La realización de técnicas como TUNEL, nos permitirá dilucidar si la reducción de expresión presente en los distintos marcadores celulares empleados es por pérdida de funcionalidad o es debida a un proceso apoptótico. Además, se ampliará el estudio a las áreas de la vía visual.

Los efectos neurotóxicos producidos por la administración de CIS tanto en el SNP (muy frecuentes) como en el SNC (poco frecuentes) han sido estudiados tanto en pacientes como en modelos animales (Tabla 2 y 3 del apartado “Introducción”). Sin embargo, como ya hemos indicado, aunque si hay estudios que demuestran la retinotoxicidad causada por el CIS, el análisis de sus efectos en los principales núcleos de relevo de la vía visual es un estudio novedoso del que aún, hasta donde sabemos, no hay información en la literatura.

Nuestro modelo ha demostrado que el tratamiento con CIS produce algunas alteraciones celulares en los núcleos de relevo de la vía visual analizados: redujo de manera significativa la expresión del marcador neuronal NeuN únicamente en la corteza visual primaria (V1); no afectó a la expresión de GFAP en las células macrogliales; y produjo un incremento significativo en la expresión de Iba1 en las células microgliales en el colículo superior (CS) y una tendencia al aumento en V1; y un aumento de células microgliales del morfotipo IV, activo, en el CS y en la V1.

La administración sistémica de agentes quimioterapéuticos se ha asociado con un aumento de la muerte celular y una disminución de la división celular en determinadas áreas del SNC (Shabani *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016). La neurotoxicidad inducida por quimioterápicos en el SNP se ha relacionado con el aumento de las concentraciones de glutamato, provocando estrés oxidativo y alteración del metabolismo energético mitocondrial que puede inducir la muerte neuronal (Carozzi *et al.*, 2010).

Diversos estudios en modelos animales (Tabla 3 del apartado “Introducción”) demostraron, en roedores, que el tratamiento con CIS induce déficits cognitivos (Chiu *et al.*, 2016; Chiu *et al.*, 2017; Chiang *et al.*, 2017; Alexander *et al.*, 2021; Squillace *et al.*, 2022) que se asocian con modificaciones estructurales en el SNC (Zhou *et al.*, 2016), entre ellas una reducción de las espinas dendríticas de las neuronas de la corteza cingulada, lo cual dificultan su correcto funcionamiento y podría explicar los problemas cognitivos detectados. Otros estudios han demostrado que existe una alteración en las sinapsis tras la administración de CIS, en concreto se modifican los niveles de marcadores de integridad sináptica: se reduce la expresión de los marcadores presinápticos sinaptofisina y el glutamatérgico vGlut2, y aumenta la de marcador GABAérgico vGAT en la corteza prefrontal (Huo *et al.*, 2018); y aumenta los marcadores de taupatia e induce pérdida de la integridad sináptica en la formación hipocampal (Chiang *et al.*, 2019). Kanat *et al.* (2017) realizaron una revisión de los posibles mecanismos responsables de algunos síntomas neurotóxicos detectados en el SNP asociados a los tratamientos con quimioterápicos como CIS.

Los autores destacan, entre otros factores, la importancia de la dosis y el tiempo de administración, pues existe una relación directa entre la acumulación de los quimioterápicos en el organismo y la intensidad de los síntomas neurológicos que presentan los pacientes. En relación con los mecanismos asociados al daño que CIS induce en el sistema nervioso destacan, entre otros: el daño directo producido en el ADN neuronal; y el aumento de las corrientes de calcio, lo que produciría un aumento de la concentración ion intracelular de este ion, que a su vez induce la activación de la caspasa 3 y la apoptosis.

El estudio de los trabajos publicados sobre los efectos de CIS en el sistema nervioso y las alteraciones en la retina por el tratamiento con CIS en nuestro modelo animal nos llevaron a analizar si en algunos núcleos de relevo de la vía visual podría haber inducido también daño neuronal. Es importante considerar que los núcleos analizados en la vía visual podrían estar afectados tanto por la acción directa de CIS en dichas estructuras cerebrales: tras atravesar la BHE como ya se ha discutido, o por la inflamación sistémica que CIS induce la cual, vía el sistema circulatorio, podría llegar al SNC; como de forma indirecta por las alteraciones que CIS produce en la retina y que se podrían transmitir al resto de la vía visual.

En nuestro modelo los niveles de NeuN solo se ven reducidos de forma significativa en V1, lo que nos llevan a pensar más en la acción indirecta al considerar que en la retina ha habido disminución de las CGR en las áreas TS y CC, lo cual puede alterar el envío de aferencias hacia el resto de la vía visual; es posible que en las estructuras anteriores a V1 no haya daño neuronal o no sea detectable, pero que las neuronas de V1, al converger en ellas información de múltiples núcleos de relevo previos, si puedan verse afectadas. Si el daño se hubiera producido directamente por CIS, se esperaría un daño más generalizado y mayor, aunque puede que la dosis empleada y el tiempo del tratamiento, como ya hemos discutido, no hubieran sido suficientes para provocar alteraciones mayores. Los resultados obtenidos son prometedores, demuestran por primera vez, hasta donde sabemos, que CIS afecta a neuronas de V1, y podrían explicar que pacientes con tratamientos con CIS acumulativos, y en mayores dosis, además de la retinotoxicidad pudieran tener afectaciones en los núcleos de relevo de la vía visual, lo cual explicaría algunas de las alteraciones y déficits visuales asociados al tratamiento.

La neuroinflamación es uno de los posibles mecanismos asociados a la neurotoxicidad inducida por CIS y las células gliales forman parte de los mediadores de los procesos neuroinflamatorios en el sistema nervioso. Existen estudios que han demostrado que la expresión de GFAP, marcador de células macrogliales, no se ve alterada en el SNC en los animales tratados con CIS, independientemente de la dosis empleada (Zhou *et al.*, 2016; Chiu *et al.*, 2017), resultados que serían coincidentes con los obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Respecto a las células microgliales existen contradicciones en la literatura respecto a su implicación en la neuroinflamación del SNC asociada al tratamiento con CIS. Unos autores indican que no se producen cambios ni en número ni en la morfología de las células de microglía en el SNC (Chiang *et al.*, 2019), mientras que otros describen un aumento de la expresión de macrófagos Iba1<sup>+</sup> o macrófagos similares a microglía a los 8 días del tratamiento, seguido de una reducción significativa en el día 15 (Bedeir *et al.*, 2022).

El CS en roedores es uno de los primeros núcleos de relevo de la vía visual. El aumento de la expresión de Iba1 que detectamos en nuestro modelo en este núcleo podría indicar que, en el caso del daño indirecto como hipótesis más posible con los resultados obtenidos, todas las alteraciones inducidas por CIS en la retina le llegarían al CS antes que a las otras estructuras analizadas. La reducción en las expresiones de Brn3a e Iba1 y el aumento de la de GFAP en la retina en las áreas más próximas al disco óptico, generarían un estado inflamatorio que se transmitirían vía el nervio hacia el resto de la vía visual. Pensamos que en nuestro modelo nos encontramos en un estado inicial de la neurotoxicidad, por lo que es posible que la estructura de la vía visual más afectada por la neuroinflamación, tras la retina, fuera el CS y, si aumentamos la dosis de CIS o prolongamos el tiempo del estudio para que se acumule más cantidad de CIS, el daño inflamatorio sería mayor y ya podría progresar hacia otras estructuras. Los resultados de activación microglial obtenidos en el CS, así como la tendencia al aumento de la expresión de Iba1 observado en V1, tampoco nos permiten descartar la posibilidad de una acción directa por CIS en el SNC o por la inflamación sistémica que induce y que podría llegar al SNC.

En determinadas situaciones puede no producirse una modificación significativa del número de células microgliales, pero sí de su nivel de activación, lo cual indicaría también un estado proinflamatorio. La evaluación de los morfotipos microgliales en las áreas de la vía visual analizadas (Tabla 15) demostró que tanto en el CS como en la V1 hay un aumento de células del morfotipo IV, activo.

En el CS se incrementa el número de morfotipos IV sin alterar el de los otros morfotipos, es decir, existe un incremento de la expresión de Iba1 en todo el CS que podría deberse al incremento numérico de morfotipos activos. Sin embargo, en la V1 se produciría un incremento del número de morfotipos IV y una reducción de morfotipos II, lo que explicaría que no haya más que una tendencia a aumentar la expresión total de Iba1, pero sí una respuesta al tratamiento con CIS mediada por un aumento en el nivel de activación de las células microgliales existentes en la estructura. Como ya se ha indicado en la Introducción existen dos fenotipos microgliales M1 y M2, relacionados con la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria, respectivamente.

Cuando el daño se cronifica puede incrementarse la respuesta del fenotipo M1, produciendo un incremento de citoquinas y quimioquinas en el SNC que inducen un estado neuroinflamatorio. A pesar de que no se ha estudiado aún el efecto del CIS sobre los fenotipos microgliales, nuestro trabajo demuestra que produce un incremento de morfotipo IV el cual representa un estado de microglía muy activa.

**Tabla 15.** Resumen esquemático de los principales resultados del estudio de los morfotipos microgliales tras el tratamiento con cisplatino (CIS) en los distintos núcleos de la vía visual.

MORFOTIPOS		I	II	III	IV	V
CS	CIS				↑	
	CIL					
	CISxCIL				↑	
NGL	CIS					
	CIL					
	CISxCIL					
V1	CIS	↑	↓		↑	
	CIL	↑	↓			
	CISxCIL					

Principales resultados de las IHQ de los morfotipos microgliales en la vía visual. CIS, cisplatino, efecto de dosis única (5 mg/kg i.p.); CIL, cilastatina, dosis repetida durante 5 días (150 mg/kg, i.p.); CISxCIL, interacción de los factores CISxCIL. CS, colículo superior; NGL, núcleo geniculado lateral; V1, corteza visual primaria.

En resumen, los resultados de la afectación de las células gliales con CIS demuestran que puede inducir en determinadas áreas del SNC una activación microglial y que ésta ocurre de manera independiente a la activación astrocitaria, lo cual es similar a lo que Hu *et al.* (2018) demostraron en modelos de neuropatía periférica. Esta situación indicaría que los astrocitos no son partícipes directos de la generación de neurotoxicidad en el CS y V1, al menos en estas etapas iniciales del daño por CIS; y que la neuroinflamación se debería a la acción de la microglía. No se puede descartar que, en etapas más avanzadas del proceso de daño por CIS, tanto por emplear dosis más elevadas, como por el uso de dosis repetidas y el acúmulo de CIS, se produzca un aumento de la neurotoxicidad por aumento de la neuroinflamación en la cual ya participen no solo las células de microglía, sino también los astrocitos.

Sin embargo, los resultados son contrarios a los que hemos obtenido en el presente trabajo en determinadas áreas de la retina, dónde no observamos activación microglial, pero si macroglial con el mismo modelo; lo cual también nos lleva a pensar en una respuesta diferencial en las distintas áreas afectadas por CIS en el SNC.

En conjunto nuestros datos muestran una reducción de la expresión de Brn3a, GFAP e Iba1, en algunas áreas de la retina, y un aumento en la expresión de GFAP en la zona del disco óptico; junto a una disminución de la expresión de NeuN en V1, así como un incremento en la expresión de Iba1 en CS y un aumento de los morfotipos de microglía activada en CS y V1. Las estructuras del SNC están en estrecha comunicación, lo que hace que cuando se produzca un daño o alteración en alguna de ellas, aumente la probabilidad de que el daño se transmita a aquellas áreas que conectan con la afectada. Eso ocurre entre la retina y el resto de las estructuras de la vía visual: un daño en la retina que produzca una neuroinflamación y/o una afectación de las CGR puede transmitirse hacia la corteza visual, a través de los distintos núcleos de relevo (degeneración anterógrada); y lo mismo ocurre al revés (degeneración retrógrada). En la actualidad se está profundizando mucho en el estudio de esta relación bidireccional (para revisión consultar: Sharma *et al.*, 2020) y se está empleando la retina como modelo, pues presenta una mayor facilidad para ser estudiada de manera no invasiva y permite ser empleada como biomarcador en muchas enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Costello & Burton., 2018; López-Cuenca *et al.*, 2020).

En un daño retrógrado, es decir, de cerebro a retina, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas lo primero que se observa es la neuroinflamación y la pérdida neuronal del área cerebral implicado y el daño se propaga luego hacia la retina, en la cual algún tiempo después se observan alteraciones como pérdida de CGR y un menor grosor de las capas CPI y CCG (Kirbas *et al.*, 2013; Al-Louizi *et al.*, 2017). Mientras que, en un daño anterógrado de retina a cerebro, la primera estructura que vemos dañada es la retina, así, en patologías como el glaucoma, se produce un aumento de la presión intraocular que se ha visto relacionada con alteraciones en la retina las cuales, un tiempo después afecta a núcleos de la vía visual como la disminución en el número de neuronas del NGL (Yücel *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2007).

Otro ejemplo de daño anterógrado es la reducción del número de neuronas y el incremento de los procesos apoptóticos en V1 tras una axotomía del NO (You *et al.*, 2012). Sin embargo, el daño por quimioterápicos aún no está lo suficientemente estudiado como para poder dilucidar si el daño es anterógrado o retrógrado, y los resultados de la presente Tesis Doctoral no permiten aún aclarar por completo el sentido del daño, es decir si es indirecto causado por el daño de CIS en la retina que luego se distribuiría a otras estructuras del SNC o al revés; o bien si es directo, causado por la llegada por el sistema vascular del CIS o del inflammasoma periférico que éste produce; o una combinación de ambos.

La CIL, a diferencia de lo observado en la retina, no causó alteraciones en ninguna de las áreas de la vía visual y tipos celulares analizadas cuando se administró a los animales sola. Sin embargo, sí encontramos resultados prometedores en cuanto a los cambios detectados en las células microgliales cuando se administró junto con CIS. La combinación de ambos fármacos consiguió disminuir el número total de células Iba1 positivas en el CS, y el número de células de microglía con morfotipo IV, activos, que habían aumentado por la administración de CIS.

Las células microgliales parece que se ven protegidas por la acción antiapoptótica y antiinflamatoria de la CIL, que ya ha sido descrita en modelos preclínicos (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.* 2012; 2015; 2017; Blanco-Codesido *et al.*, 2013; Jado *et al.*, 2020; González-Fernández *et al.*, 2022).

Esta acción podría deberse a que CIL, al igual que otros fármacos antitumorales (docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida) que producen un incremento de los fenotipos M1 y una reducción de los M2 (Shi *et al.*, 2019), favoreciese que se mantenga el papel antiinflamatorio de la microglía. Aunque hay que profundizar en este estudio y realizar un nuevo modelo con dosis mayores y mantenidas durante más tiempo, es importante considerar que incluso en las condiciones de la presente investigación los resultados son muy prometedores y CIL podría ser un buen abordaje terapéutico para minimizar los efectos inflamatorios generados por el quimioterápico CIS en el SNC. Resultados previos de nuestro grupo en un modelo murino de glaucoma (Martínez-López *et al.*, 2024) ya demostraron el efecto neuroprotector de CIL en la retina, la presente Tesis Doctoral lo ratifica y amplía a otras áreas del SNC.

### **Limitaciones y Perspectivas futuras**

Una de las principales limitaciones de este trabajo es la dosis de CIS empleada en este estudio. La dosis usada parece no haber sido lo suficientemente alta como para observar un daño consistente en la retina y la vía visual. Como se ha discutido en varios puntos a lo largo de esta Tesis, en estudios futuros se valorará reajustar la dosis empleada, incrementando la dosis y/o modificando el régimen de administración, prolongando el tiempo de administración de esta con el fin de conseguir una dosis acumulada de CIS mayor que, tal y como hemos indicado, es el parámetro que mejor correlaciona con el daño observado en la retina (Dulz *et al.*, 2017).

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es que se realiza únicamente en machos. Aunque la dosis es uno de los factores claves asociados a la toxicidad del CIS, el sexo parece estar implicado también en la severidad de la retinopatía. De hecho, con dosis similares de CIS se observó que mujeres que recibieron quimioterapia por cáncer de ovario presentaban afectación de la visión (Wilding *et al.*, 1985), mientras que sujetos varones con un tratamiento con quimioterápico similar para el cáncer de testículos no tuvieron alteraciones visuales (Ozols *et al.*, 1983). En modelos animales hay gran controversia al respecto, estudios iniciales de Nematbakhsh *et al.*, (2013) demostraron que los machos podrían ser más susceptibles a la nefrotoxicidad que las hembras; Sin embargo, trabajos más recientes parecen indicar lo contrario (para revisión consultar: Eshraghi-Jazi & Nematbakhsh, 2023).

En futuros estudios se incluirá la perspectiva de género con el fin de analizar, en animales macho y hembra, las posibles diferencias sexuales existentes con relación a la neurotoxicidad inducida por CIS, y, profundizar, además, en los mecanismos subyacentes y en las posibles diferencias en cuanto a la eficacia de los diferentes tratamientos farmacológicos testados.

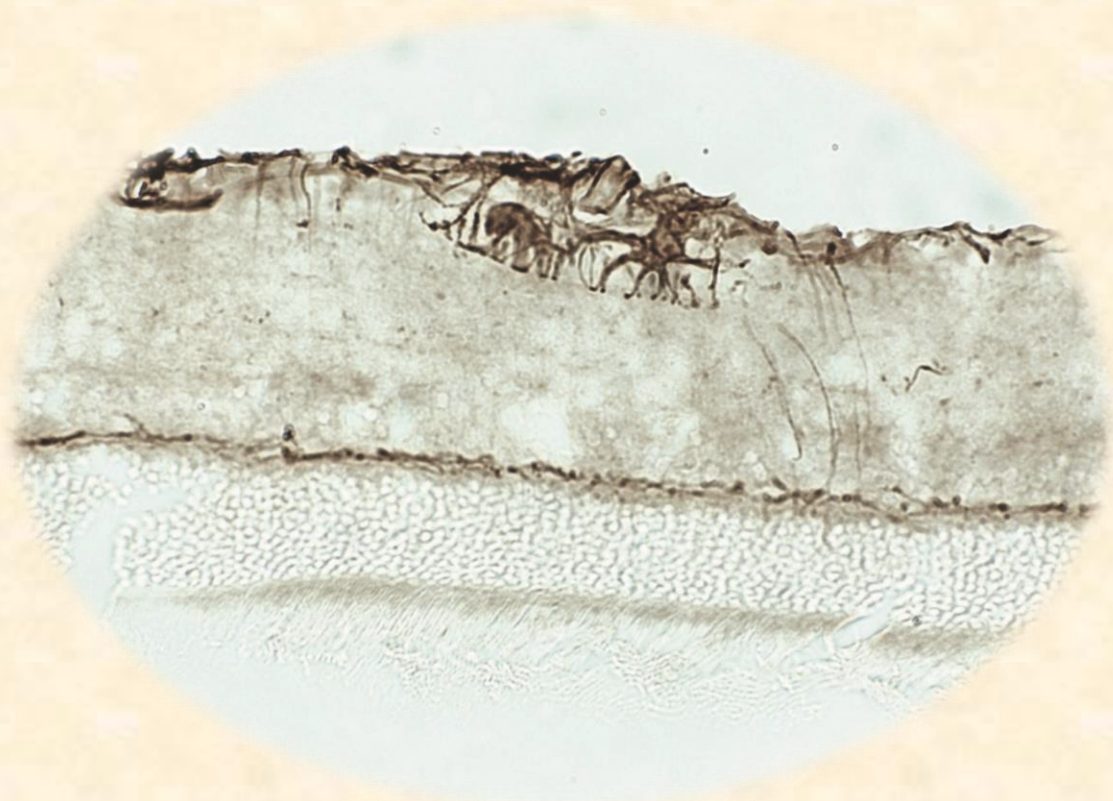
La literatura ha demostrado que otro factor a considerar en el tratamiento de CIS son los antecedentes médicos de los pacientes. En dos casos clínicos descritos en la Introducción (Tabla 2 del apartado “Introducción”) han podido relacionar patologías del sistema cardiovascular como son la fibrilación auricular (Langevin *et al.*, 2019) o la anemia y la hemoglobinemia (González *et al.*, 2001) con la aparición de retinopatía. Por ello creemos importante incluir parámetros de vascularización en futuros estudios, como los niveles de hemoglobina en sangre, para valorar su implicación en el desarrollo de neurotoxicidad.

En el presente estudio de retinotoxicidad por CIS nos hemos centrado en las principales poblaciones celulares de la retina: las neuronas encargadas de la codificación final y de la salida de la información visual, y las células gliales, macro y microgliales. Sin embargo, no se han analizado otras poblaciones celulares que también podrían verse afectadas. De hecho, en los estudios en humanos (ver Tabla 2 en el apartado “Introducción”), son varios en los que se describen datos de afectación en los fotorreceptores, fundamentalmente en los conos (Wilding *et al.*, 1985). En estudios futuros analizaremos también la población de fotorreceptores, y se incluirá además el estudio de los registros de ERG que nos permitirán caracterizar funcionalmente las células dañadas (Blanco *et al.*, 2019) por la administración de CIS en las retinas de nuestros animales.

En este trabajo hemos propuesto, como posible mecanismo de toxicidad del CIS en el SNC, la activación de la cascada inflamatoria mediada por la activación del receptor TRL4 y la vía del inflamasoma por NLRP3 la cual, en última instancia, puede resultar en un proceso neuroinflamatorio y la apoptosis celular al afectar a las células gliales y a diversas poblaciones celulares (Bowman *et al.*, 2003; Rodríguez- Gómez *et al.*, 2020).

Sin embargo, otros estudios han propuesto mecanismos alternativos que incluyen la disfunción mitocondrial (Squillace *et al.*, 2021), CIS también puede unirse al ADN mitocondrial ocasionando alteraciones en los complejos respiratorios mitocondriales (Kruidering *et al.*, 1997) y aumentar la producción de ROS (Jesse *et al.*, 2014; Marullo *et al.*, 2013). En futuros estudios se ampliará el conjunto de vías de daño a analizar, incluyendo vías relacionadas con la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Así como posibles mecanismos de muerte celular que incluyan diversas vías de apoptosis. Lo anterior pensamos que nos permitirá dilucidar los mecanismos implicados en la neurotoxicidad del CIS en el SNC. En cuanto a la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos, la CIL ha demostrado una potencial utilidad en el tratamiento de la toxicidad asociada al CIS, aunque los resultados en este estudio no hayan sido del todo concluyentes. En este sentido, creemos que CIL será efectiva sólo en aquellos casos patológicos en los que el daño sea más marcado, por lo que realizaremos un nuevo modelo con dosis de CIS más altas y acumulativas para aumentar el daño y poder obtener resultados más concluyentes de la eficacia del fármaco.

# CONCLUSIONES

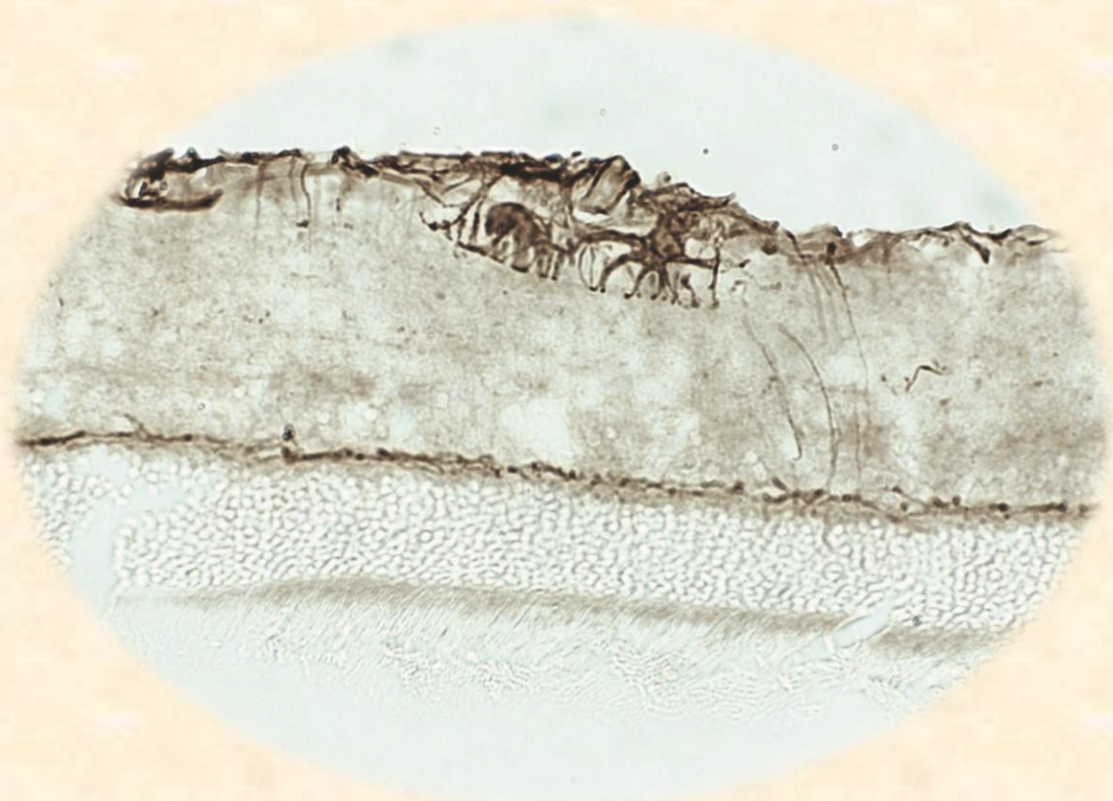


## CONCLUSIONES

1. Una única dosis de cisplatino redujo el peso corporal de los animales y produjo un efecto nefrotóxico caracterizado por el incremento de los niveles séricos de creatinina y nitrógeno ureico en sangre. La cilastatina resultó eficaz previniendo y/o revertiendo los efectos nefrotóxicos y consiguió evitar parcialmente la reducción del peso.
2. La tomografía de coherencia óptica resulta una técnica eficaz a la hora de evaluar el daño retinotóxico del cisplatino de forma no invasiva. El cisplatino incrementó el grosor de la retina en las zonas más lejanas al nervio óptico (AS2), posiblemente asociado a la aparición de un edema. La cilastatina parece ser una estrategia prometedora para evitar dicho efecto.
3. El cisplatino afecta a las diferentes poblaciones celulares de la retina, aunque de manera más marcada a la microglía y en las regiones nasal y central. El hecho de que estas sean las más afectadas tras la administración de cisplatino podría indicar una alteración de la barrera hematoencefálica.
4. La cilastatina presenta un potencial terapéutico en algunas áreas de la retina, pero no en todas, lo que parece indicar que su acción es dependiente del área. Será necesario realizar estudios posteriores para caracterizar su mecanismo de entrada en la retina, así como su mecanismo de acción en esta.
5. El cisplatino produjo la activación del inflammasoma vía NLRP3 en las células ganglionares de la retina, y el incremento de la expresión de TLR4 en las células microgliales de la capa de células ganglionares.
6. En la vía visual el cisplatino produjo un efecto moderado similar al descrito en la retina, afectando mayoritariamente a los morfotipos activos microgliales en los primeros núcleos de relevo de esta.
7. La cilastatina consiguió disminuir parcialmente los efectos tóxicos del cisplatino descritos en la vía visual.



# BIBLIOGRAFÍA



# BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, J. F., Seua, A. V., Arroyo, L. D., Ray, P. R., Wangzhou, A., Heiß-Lückemann, L., Schedlowski, M., Price, T. J., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2021). Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. *Theranostics*, *11*(7), 3109–3130. <https://doi.org/10.7150/THNO.53474>
- Ali, B. H., Al Moundhri, M. S., Tag Eldin, M., Nemmar, A., & Tanira, M. O. (2007). The ameliorative effect of cysteine prodrug L-2-oxothiazolidine-4- carboxylic acid on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, *21*(5), 547–553. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00495.x>
- Ali, R., Aouida, M., Sulaiman, A. A., Madhusudan, S., & Ramotar, D. (2022). Can Cisplatin Therapy Be Improved? Pathways That Can Be Targeted. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23137241>
- Al-Louzi, O., Button, J., Newsome, S. D., Calabresi, P. A., & Saidha, S. (2017). Retrograde trans-synaptic visual pathway degeneration in multiple sclerosis: A case series. *Multiple Sclerosis*, *23*(7), 1035–1039. <https://doi.org/10.1177/1352458516679035>
- Al-Tweigeri, T., Ch, B., Magliocco, A. M., & Decoteau, J. F. (1999). *CASE REPORT Cortical Blindness as a Manifestation of Hypomagnesemia Secondary to Cisplatin Therapy: Case Report and Review of Literature*. <http://www.idealibrary.com>
- Arita, M., Watanabe, S., Aoki, N., Kuwahara, S., Suzuki, R., Goto, S., Abe, Y., Takahashi, M., Sato, M., Hokari, S., Ohtsubo, A., Shoji, S., Nozaki, K., Ichikawa, K., Kondo, R., Hayashi, M., Ohshima, Y., Kabasawa, H., Hosojima, M., ... Kikuchi, T. (2021). Combination therapy of cisplatin with cilastatin enables an increased dose of cisplatin, enhancing its antitumor effect by suppression of nephrotoxicity. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80853-6>
- Astolfi, L., Ghiselli, S., Guaran, V., Chicca, M., Simoni, E., Olivetto, E., Lelli, G., & Martini, A. (2013). Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncology Reports*, *29*(4), 1285–1292. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2279>
- Barry, N. P. E., & Sadler, P. J. (2014). 100 years of metal coordination chemistry: From Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry*, *86*(12), 1897–1910. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-0504>
- Becher, R., Schfitt, P., Osieka, R., & Schmidt, C. G. (1980). Peripheral Neuropathy and Ophthalmologic Toxicity After Treatment with cis-Dichlorodiaminoplatinum II. In *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* (Vol. 96). Springer-Verlag.
- Bedeir, M., Niyonu, Y., Nakamura, T., Tsujikawa, T., & Hirano, S. (2022). *Multiplex immunohistochemistry reveals cochlear macrophage heterogeneity and local auditory nerve inflammation in cisplatin-induced hearing loss*.

- Bickford, M. E., Zhou, N., Krahe, T. E., Govindaiah, G., & Guido, W. (2015). Retinal and tectal “Driver-Like” inputs converge in the shell of the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Neuroscience*, *35*(29), 10523–10534. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3375-14.2015>
- Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguch, S. L., & Marriott, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *GLIA*, *43*(3), 281–291. <https://doi.org/10.1002/glia.10256>
- Brazionis, L., Rowley, K., Itsiopoulos, C., & o’dea, K. (2009). Plasma carotenoids and diabetic retinopathy. *British Journal of Nutrition*, *101*(2), 270–277. <https://doi.org/10.1017/S0007114508006545>
- Breglio, A. M., Rusheen, A. E., Shide, E. D., Fernandez, K. A., Spielbauer, K. K., mclachlin, K. M., Hall, M. D., Amable, L., & Cunningham, L. L. (2017). Cisplatin is retained in the cochlea indefinitely following chemotherapy. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01837-1>
- Camaño, S., Lazaro, A., Moreno-Gordaliza, E., Torres, A. M., De Lucas, C., Humanes, B., Lazaro, J. A., Gomez-Gomez, M. M., Bosca, L., & Tejedor, A. (2010a). Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *334*(2), 419–429. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.165779>
- Caraceni A, Martini C, & Spatti G. (1997). Recovering optic neuritis during systemic cisplatin and carboplatin chemotherapy. *Acta Neurol Scand*, *96*, 260–261.
- Carmellini, M., Frosini, F., Filipponi, F., Boggi, U., & Mosca, F. (1997). EFFECT OF CILASTATIN ON CYCLOSPORINE-INDUCED ACUTE NEPHROTOXICITY IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation*, *64*(1), 164–166. <https://doi.org/10.1097/00007890-199707150-00029>
- Carozzi, V. A., Canta, A., & Chiorazzi, A. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? In *Neuroscience Letters* (Vol. 596, pp. 90–107). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.014>
- Carozzi, V. A., Chiorazzi, A., Canta, A., Lapidus, R. G., Slusher, B. S., Wozniak, K. M., & Cavaletti, G. (2010). Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. *Neurotoxicity Research*, *17*(4), 380–391. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9114-1>
- Caviness, V. S. (1975). *Architectonic Map of Neocortex of the Normal Mouse*.
- Chen, J. M., Yang, T. T., Cheng, T. S., Hsiao, T. F., Chang, P. M. H., Leu, J. Y., Wang, F. S., Hsu, S. L., Huang, C. Y. F., & Lai, J. M. (2019). Modified Sijunzi decoction can alleviate cisplatin-induced toxicity and prolong the survival time of cachectic mice by recovering muscle atrophy. *Journal of Ethnopharmacology*, *233*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.035>
- Cheng, S., Butrus, S., Tan, L., Xu, R., Sagireddy, S., Trachtenberg, J. T., Shekhar, K., & Zipursky, S. L. (2022). Vision-dependent specification of cell types and function in the developing cortex. *Cell*, *185*(2), 311–327.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.022>

- Cherry, S. M., Hunt, P. A., & Hassold, T. J. (2004). Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(2), 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.08.010>
- Chiang, A. C. A., Huo, X., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2019). Chemotherapy accelerates age-related development of tauopathy and results in loss of synaptic integrity and cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.005>
- Chiu, G. S., Maj, M. A., Rizvi, S., Dantzer, R., Vichaya, E. G., Laumet, G., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2017). Pifithrin-m prevents cisplatin-induced chemobrain by preserving neuronal mitochondrial function. *Cancer Research*, 77(3), 742–752. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1817>
- Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., Pavenstä, H., Koepsell, H., Rgen Piechota, H.-J., Rg Haier, J., Jaehde, U., Zisowsky, J., & Schlatter, E. (2005). Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2. In *Pulmonary and Renal Pathology American Journal of Pathology* (Vol. 167, Issue 6).
- Costello, F., & Burton, J. M. (2018). Retinal imaging with optical coherence tomography: A biomarker in multiple sclerosis? In *Eye and Brain* (Vol. 10, pp. 47–63). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/EB.S139417>
- Coyle, S., Khan, M. N., Chemaly, M., Callaghan, B., Doyle, C., Willoughby, C. E., Atkinson, S. D., Gregory-Ksander, M., & mcgilligan, V. (2021). Targeting the nlrp3 inflammasome in glaucoma. *Biomolecules*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/biom11081239>
- Cruz-Martín, A., El-Danaf, R. N., Osakada, F., Sriram, B., Dhande, O. S., Nguyen, P. L., Callaway, E. M., Ghosh, A., & Huberman, A. D. (2014). A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex. *Nature*, 507(7492), 358–361. <https://doi.org/10.1038/nature12989>
- Dana, R., Spartacus, R. K., Mutha, S., & Bhat, P. (2016). Seizure following chemotherapy (paclitaxel and cisplatin) in a patient of carcinoma cervix. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(6), 736–738. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.194863>
- Deora, V., Lee, J. D., Albornoz, E. A., mcalary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A. B., Atkin, J. D., Cooper, M. A., Schroder, K., Yerbury, J. J., Gordon, R., & Woodruff, T. M. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *GLIA*, 68(2), 407–421. <https://doi.org/10.1002/glia.23728>
- Devi, T. S., Lee, I., Hüttemann, M., Kumar, A., Nantwi, K. D., & Singh, L. P. (2012). TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal muller glia under chronic hyperglycemia: Implications for diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/438238>
- Dhande, O. S., & Huberman, A. D. (2014). Retinal ganglion cell maps in the brain: Implications for visual processing. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 133–142). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.006>

- Diz-Chaves, Y., Pernía, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of Neuroinflammation*, *9*.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>
- Dos Santos, N. A. G., Rodrigues, M. A. C., Martins, N. M., & Dos Santos, A. C. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. In *Archives of Toxicology* (Vol. 86, Issue 8, pp. 1233–1250). <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0821-7>
- Dräger, U. C. (1975). *Receptive Fields of Single Cells and Topography in Mouse Visual Cortex*.
- Dräger, U. C., & Olsen, J. F. (1980). Origins of Crossed and Uncrossed Retinal Projections in Pigmented and Albino Mice. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 191).
- Du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lázic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Plos Biology*, *18*(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Dulz, S., Asselborn, N. H., Dieckmann, K. P., Matthies, C., Wagner, W., Weidmann, J., Seidel, C., Oing, C., Berger, L. A., Alsdorf, W., Mankichian, B., Meyer, C., Vetterlein, M. W., Gild, P., Ludwig, T. A., Soave, A., Schriefer, P., Becker, A., Ahyai, S. A., ... Kluth, L. A. (2017). Retinal toxicity after cisplatin-based chemotherapy in patients with germ cell cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *143*(7), 1319–1325.  
<https://doi.org/10.1007/s00432-017-2384-8>
- Edwards, M. D., White, A.-M., & Platt, B. (2002). *CHARACTERISATION OF RAT SUPERFICIAL SUPERIOR COLLICULUS NEURONES : FIRING PROPERTIES AND SENSITIVITY TO GABA*.  
[www.neuroscience-ibro.com](http://www.neuroscience-ibro.com)
- Eng, L. F. (1985). Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)" the Major Protein of Glial Intermediate Filaments in Differentiated Astrocytes. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 8).
- Erskine, L., & Herreral, E. (2015). Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro*, *6*(6).  
<https://doi.org/10.1177/1759091414562107>
- Eshraghi-Jazi, F., & Nematbakhsh, M. (2023). Sex Difference in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity: Laboratory and Clinical Findings. In *Journal of Toxicology* (Vol. 2023). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/3507721>
- Essig, J., Hunt, J. B., & Felsen, G. (2021). Inhibitory neurons in the superior colliculus mediate selection of spatially-directed movements. *Communications Biology*, *4*(1).  
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02248-1>
- Feng, L., & Liu, X. (2016). NLRP3 inflammasome in retinal ganglion cell loss in optic neuropathy. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 11, Issue 7, pp. 1077–1078). Editorial Board of Neural Regeneration Research. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.187036>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. *Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020*.

- Fernández-Albarral, J. A., de Hoz, R., Matamoros, J. A., Chen, L., López-Cuenca, I., Salobar-García, E., Sánchez-Puebla, L., Ramírez, J. M., Triviño, A., Salazar, J. J., & Ramírez, A. I. (2022). Retinal Changes in Astrocytes and Müller Glia in a Mouse Model of Laser-Induced Glaucoma: A Time-Course Study. *Biomedicines*, *10*(5).  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10050939>
- Fernández-Albarral, J. A., Salazar, J. J., Hoz, R. De, Marco, E. M., Martín-Sánchez, B., Flores-Salguero, E., Salobar-García, E., López-Cuenca, I., Barrios-Sabador, V., Avilés-Trigueros, M., Valiente-Soriano, F. J., Miralles de Imperial-Ollero, J. A., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J. M., López-Gallardo, M., & Ramírez, A. I. (2021). Retinal molecular changes are associated with neuroinflammation and loss of rgcs in an experimental model of glaucoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–29.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22042066>
- Fitzgibbon, T., & Reese, B. E. (1996). Organization of retinal ganglion cell axons in the optic fiber layer and nerve of fetal ferrets. In *Visual Neuroscience* (Vol. 13).
- Fresenius Kabi. Cisplatin Injection. 2017. Available at: [http://editor.fresenius-kabi.us/pis/US-PH-cisplatin\\_Inj\\_FK-45628H-03-2017-PI.pdf](http://editor.fresenius-kabi.us/pis/US-PH-cisplatin_Inj_FK-45628H-03-2017-PI.pdf)
- Froudarakis, E., Fahey, P. G., Reimer, J., Smirnakis, S. M., Tehovnik, E. J., & Tolia, A. S. (2019). *The Visual Cortex in Context*. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517>
- Fumagalli, G., Monza, L., Cavaletti, G., Rigolio, R., & Meregalli, C. (2021). Neuroinflammatory Process Involved in Different Preclinical Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626687>
- Ghitani, N., Bayguinov, P. O., Vokoun, C. R., mcmahon, S., Jackson, M. B., & Basso, M. A. (2014). Excitatory synaptic feedback from the motor layer to the sensory layers of the superior colliculus. *Journal of Neuroscience*, *34*(20), 6822–6833.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3137-13.2014>
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 88). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>
- Godement, P., Salaun, J., & Imbert, M. (1984). Prenatal and Postnatal Development of Retinogeniculate and Retinocollicular Projections in the Mouse. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 230).
- Gomes, F. V., Llorente, R., Del Bel, E. A., Viveros, M. P., López-Gallardo, M., & Guimarães, F. S. (2015). Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophrenia Research*, *164*(1–3), 155–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.015>
- González, F., Menendez, D., & Gomez-Ulla, F. (2001). Monocular visual loss in a patient undergoing cisplatin chemotherapy. In *International Ophthalmology* (Vol. 24).
- González-Fernández, R., González-Nicolás, M. Á., Morales, M., Ávila, J., Lázaro, A., & Martín-Vasallo, P. (2022). FKBP51, amotl2 and IQGAP1 Involvement in Cilastatin Prevention of Cisplatin-Induced Tubular Nephrotoxicity in Rats. *Cells*, *11*(9).  
<https://doi.org/10.3390/cells11091585>

- González-Nicolás, M. (2022). Cilastatina en la prevención y tratamiento del fracaso renal agudo parenquimatoso de origen endotóxico: Sepsis y rabdomiólisis
- Goswami, C., Dezaki, K., Wang, L., Inui, A., Seino, Y., & Yada, T. (2019). Ninjin-yoeito activates ghrelin-responsive and unresponsive NPY neurons in the arcuate nucleus and counteracts cisplatin-induced anorexia. *Neuropeptides*, *75*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.03.001>
- Gunturk, E. E., Yucel, B., Gunturk, I., Yazici, C., Yay, A., & Kose, K. (2019). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin induced cardiotoxicity. *Bratislava Medical Journal*, *120*(6), 423–428. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2019\\_068](https://doi.org/10.4149/BLL_2019_068)
- Gupta, N., Ly, T., Zhang, Q., Kaufman, P. L., Weinreb, R. N., & Yücel, Y. H. (2007). Chronic ocular hypertension induces dendrite pathology in the lateral geniculate nucleus of the brain. *Experimental Eye Research*, *84*(1), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.09.013>
- Himmelhan, D. K., Rawashdeh, O., & Oelschläger, H. H. A. (2018). Early postnatal development of the visual cortex in mice with retinal degeneration. *Mechanisms of Development*, *151*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.03.002>
- Holden, J. M., Wareham, L. K., & Calkins, D. J. (2024). Morphological and electrophysiological characterization of a novel displaced astrocyte in the mouse retina. *GLIA*, *72*(7), 1356–1370. <https://doi.org/10.1002/glia.24536>
- Hori, Y., Aoki, N., Kuwahara, S., Hosojima, M., Kaseda, R., Goto, S., Iida, T., De, S., Kabasawa, H., Kaneko, R., Aoki, H., Tanabe, Y., Kagamu, H., Narita, I., Kikuchi, T., & Saito, A. (2017). Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology*, *28*(6), 1783–1791. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016060606>
- Hu, L. Y., Zhou, Y., Cui, W. Q., Hu, X. M., Du, L. X., Mi, W. L., Chu, Y. X., Wu, G. C., Wang, Y. Q., & Mao-Ying, Q. L. (2018). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) dependent microglial activation promotes cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *68*, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.011>
- Hübener, M. (2003). Mouse visual cortex. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 413–420). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00102-8)
- Huberman, A. D., Feller, M. B., & Chapman, B. (2008). Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 31, pp. 479–509). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125533>
- Humanes, B., Camaño, S., Lara, J. M., Sabbisetti, V., González-Nicolás, M. Á., Bonventre, J. V., Tejedor, A., & Lázaro, A. (2017). Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *32*(10), 1645–1655. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx005>
- Humanes, B., Jado, J. C., Camaño, S., López-Parra, V., Torres, A. M., Álvarez-Sala, L. A., Cercenado, E., Tejedor, A., & Lázaro, A. (2015). Protective Effects of Cilastatin against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity. *Biomed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/704382>

- Humanes, B., Lazaro, A., Camano, S., Moreno-Gordaliza, E., Lazaro, J. A., Blanco-Codesido, M., Lara, J. M., Ortiz, A., Gomez-Gomez, M. M., Martín-Vasallo, P., & Tejedor, A. (2012). Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney International*, 82(6), 652–663. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.199>
- Huo, X. J., Reyes, T. M., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2018). Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the prefrontal cortex in mice. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35919-x>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. In *Molecular Brain Research* (Vol. 57).
- Ito, S., & Feldheim, D. A. (2018). The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function. *Frontiers in Neural Circuits*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00010>
- Jado, J. C., Humanes, B., González-Nicolás, M. Á., Camaño, S., Lara, J. M., López, B., Cercenado, E., García-Bordas, J., Tejedor, A., & Lázaro, A. (2020). Nephroprotective effect of cilastatin against gentamicin-induced renal injury in vitro and in vivo without altering its bactericidal efficiency. *Antioxidants*, 9(9), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox9090821>
- Jesse, C. R., Bortolatto, C. F., Wilhelm, E. A., Roman, S. S., Prigol, M., & Nogueira, C. W. (2014). The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 34(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/jat.2818>
- Jiang, N., Meng, C., Han, X., Guo, J., Li, H., & Yu, Z. (2018). Low-dose cisplatin causes growth inhibition and loss of autophagy of rat astrocytes in vitro. *Neuroscience Letters*, 682, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.027>
- Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., Troost, D., & Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *GLIA*, 63(12), 2260–2273. <https://doi.org/10.1002/glia.22891>
- Johnson, K. O., & Triplett, J. W. (2021). Wiring subcortical image-forming centers: Topography, laminar targeting, and map alignment. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 142, pp. 283–317). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.10.004>
- Jurgens, C. W. D., Bell, K. A., mcquiston, A. R., & Guido, W. (2012). Optogenetic Stimulation of the Corticothalamic Pathway Affects Relay Cells and gabaergic Neurons Differently in the Mouse Visual Thalamus. *Plos ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045717>
- Kanat, O., Ertas, H., & Caner, B. (2017). Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. In *World Journal of Clinical Oncology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 329–333). Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i4.329>
- Kandel, E. R., Jessell, T. M., Schwartz, J. H., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. (2013). Principles of Neural Science, Fifth Edition. Mcgraw Hill Professional.

- Karakurt, Y., Uçak, T., Tasli, N. G., Ahiskali, I., Şipal, S., Kurt, N., & Süleyman, H. (2018). The effects of lutein on cisplatin-induced retinal injury: an experimental study. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 37(4), 374–379. <https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1482494>
- Karavelioglu, E., Boyaci, M. G., Simsek, N., Sonmez, M. A., Koc, R., Karademir, M., Guven, M., & Eser, O. (2015). Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30(6), 394–400. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150060000004>
- Katz, B. J., Ward, J. H., Digre, K. B., Creel, D. J., Mamalis, N., & Moran, J. A. (2003). Persistent Severe Visual and Electroretinographic Abnormalities After Intravenous Cisplatin Therapy. In *J Neuro-Ophthalmol* (Vol. 23, Issue 2). <http://journals.lww.com/jneuro-ophthalmology>
- Kerschensteiner, D., & Feller, M. B. (2024). Mapping the Retina onto the Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 16(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041512>
- Kerschensteiner, D., & Guido, W. (2017). Organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. In *Visual neuroscience* (Vol. 34, p. E008). <https://doi.org/10.1017/S0952523817000062>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. In *Neuron* (Vol. 77, Issue 1, pp. 10–18). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 160, Issue 7, pp. 1577–1579). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>
- Kirbas, S., Turkyilmaz, K., Anlar, O., Tufekci, A., & Durmus, M. (2013). Retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 33(1), 58–61. <https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e318267fd5f>
- Knight, K. R. G., Kraemer, D. F., & Neuwelt, E. A. (2005). Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8588–8596. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.5355>
- Kondo, Y., Takada, M., Honda, Y., & Mizuno, N. (1993). Bilateral projections of single retinal ganglion cells to the lateral geniculate nuclei and superior colliculi in the albino rat. In *Brain Research* (Vol. 608).
- Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 279–289). <https://doi.org/10.1038/nri2215>
- Krahe, T. E., El-Danaf, R. N., Dilger, E. K., Henderson, S. C., & Guido, W. (2011). Morphologically distinct classes of relay cells exhibit regional preferences in the dorsal lateral geniculate nucleus of the mouse. *Journal of Neuroscience*, 31(48), 17437–17448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4370-11.2011>
- Kropp, H., Sundelof, J. G., Hajdu, R., & Kahan, F. M. (1982). Metabolism of Thienamycin and Related Carbapenem Antibiotics by the Renal Dipeptidase, Dehydropeptidase-I. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 22, Issue 1).

- Kruidering, M., Water, B. Van De, Heer, E. De, Mulder, G. J., & Nagelkerke, J. F. (1997). Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Porcine Proximal Tubular Cells: Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Complexes I to IV of the Respiratory Chain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(2), 638.  
[Http://jpet.aspetjournals.org/content/280/2/638.abstract](http://jpet.aspetjournals.org/content/280/2/638.abstract)
- Kumar, P., Sulakhiya, K., Barua, C. C., & Mundhe, N. (2017). TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 431(1–2), 113–122.  
[Https://doi.org/10.1007/s11010-017-2981-5](https://doi.org/10.1007/s11010-017-2981-5)
- Langevin, S., Chang, J. S., & Chang, S. (2017). *SEROUS RETINOPATHY ASSOCIATED WITH CISPLATIN TREATMENT*.
- Lavin-Dapena, C, & Alcocer, P. (2016). Cirugía microincisional del glaucoma: mesa redonda, 92 *Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología*, Málaga 2016.
- Lázaro, A., Camaño, S., Humanes, B., & Tejedor, A. (2012). 8 Novel Strategies in Drug-Induced Acute Kidney Injury. [Www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- Li, S., & Zhao, Z. (2024). Thymoquinone alleviates cisplatin-induced kidney damage by reducing apoptosis in a rat model. *Heliyon*, 10(2). [Https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24840](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24840)
- Liang, F., Xiong, X. R., Zingg, B., Ji, X. Ying, Zhang, L. I., & Tao, H. W. (2015). Sensory Cortical Control of a Visually Induced Arrest Behavior via Corticotectal Projections. *Neuron*, 86(3), 755–767. [Https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.048](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.048)
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. [Https://doi.org/10.1038/nature21029](https://doi.org/10.1038/nature21029)
- Lind, M. J. (2011). Principles of cytotoxic chemotherapy. In *Medicine* (Vol. 39, Issue 12, pp. 711–716). Elsevier Ltd. [Https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.009](https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.009)
- Liu, X., Huang, H., Snutch, T. P., Cao, P., Wang, L., & Wang, F. (2022). The Superior Colliculus: Cell Types, Connectivity, and Behavior. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 38, Issue 12, pp. 1519–1540). Springer. [Https://doi.org/10.1007/s12264-022-00858-1](https://doi.org/10.1007/s12264-022-00858-1)
- López-Cuenca, I., de Hoz, R., Salobar-García, E., Elvira-Hurtado, L., Rojas, P., Fernández-Albarral, J. A., Barabash, A., Salazar, J. J., Ramírez, A. I., & Ramírez, J. M. (2020). Macular thickness decrease in asymptomatic subjects at high genetic risk of developing alzheimer's disease: An OCT study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1–13.  
[Https://doi.org/10.3390/jcm9061728](https://doi.org/10.3390/jcm9061728)
- López-Cuenca, I., Salobar-García, E., Elvira-Hurtado, L., Fernández-Albarral, J. A., Sánchez-Puebla, L., Salazar, J. J., Ramírez, J. M., Ramírez, A. I., & de Hoz, R. (2021). The value of oct and octa as potential biomarkers for preclinical alzheimer's disease: A review study. In *Life* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. [Https://doi.org/10.3390/life11070712](https://doi.org/10.3390/life11070712)

- Lu, L. H., Oh, D. J., Dursun, B., He, Z., Hoke, T. S., Faubel, S., & Edelstein, C. L. (2008). Increased macrophage infiltration and fractalkine expression in cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.130161>
- Lund, R. D. (1969). *Synaptic Patterns of the Superficial Layers of the Superior Colliculus of the Rat*.
- Markewitz, A., Claus, H., Pfeiffer, M., Stephan, Z., Drechsel, J., Reichenspurner, H., & Reichart, B. (1994). Reduction of Cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation*, 865–870.
- Marmor MF. (1993). Negative-type electroretinogram from cisplatin toxicity. In *Documenta Ophthalmologica* (Vol. 84).
- Martersteck, E. M., Hirokawa, K. E., Evarts, M., Bernard, A., Duan, X., Li, Y., Ng, L., Oh, S. W., Ouellette, B., Royall, J. J., Stoecklin, M., Wang, Q., Zeng, H., Sanes, J. R., & Harris, J. A. (2017). Diverse Central Projection Patterns of Retinal Ganglion Cells. *Cell Reports*, *18*(8), 2058–2072. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.075>
- Martínez-López, M. A., Rubio-Casado, S., San Felipe, D., Martín-Sánchez, B., Fernández-Albarral, J. A., Salobar-García, E., Matamoros, J. A., Ramírez, J. M., de Hoz, R., Salazar, J. J., Marco, E. M., Ramírez, A. I., Lázaro, A., & López-Gallardo, M. (2024). Cilastatin as a Potential Anti-Inflammatory and Neuroprotective Treatment in the Management of Glaucoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(6), 3115. <https://doi.org/10.3390/ijms25063115>
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., & Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *Plos ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>
- Medchemexpress. (2024). Cilastatin. Medchemexpress.com. Recuperado el 11 de julio de 2024, de <https://www.medchemexpress.com/Cilastatin.html>
- Mcgilligan, V. E., Gregory-Ksander, M. S., Li, D., Moore, J. E., Hodges, R. R., Gilmore, M. S., Moore, T. C. B., & Dartt, D. A. (2013). Staphylococcus aureus Activates the NLRP3 Inflammasome in Human and Rat Conjunctival Goblet Cells. *Plos ONE*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074010>
- Miller, D. F., Bay, J. W., Lederman, R. J., Purvis, J. D., Rogers, L. R., & Tomsak, R. L. (1985). Ocular and Orbital Toxicity Following Intracarotid Injection of BCNU (Carmustine) and Cisplatin for Malignant Gliomas. *Ophthalmology*, *92*(3), 402–406. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(85\)34036-8](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(85)34036-8)
- Miller, W., & Vogt, B. A. (1984). Direct With Connections of Rat Visual Cortex Sensory, Motor, and Association Cortices. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 226).
- Mize, R. R. (1992). The organization of gabaergic neurons in the mammalian superior colliculus. In *Progress in Brain Research* (Vol. 90).

- Monavarfeshani, A., Sabbagh, U., & Fox, M. A. (2017). Not a one-trick pony: Diverse connectivity and functions of the rodent lateral geniculate complex. In *Visual neuroscience* (Vol. 34, p. E012). <https://doi.org/10.1017/S0952523817000098>
- Moreno-Gordaliza, E., Giesen, C., Lázaro, A., Esteban-Fernández, D., Humanes, B., Cañas, B., Panne, U., Tejedor, A., Jakubowski, N., & Gómez-Gómez, M. M. (2011). Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Analytical Chemistry*, *83*(20), 7933–7940. <https://doi.org/10.1021/ac201933x>
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). Neun, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, *116*(1), 201–211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-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 naïve and optic nerve-injured retinas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *50*(8), 3860–3868. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267>
- Nakamura, T., Yonezawa, A., Hashimoto, S., Katsura, T., & Inui, K. I. (2010). Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, *80*(11), 1762–1767. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.019>
- Nardini, P., Pini, A., Bessard, A., Duchalais, E., Niccolai, E., Neunlist, M., & Vannucchi, M. G. (2020). Glp-2 prevents neuronal and glial changes in the distal colon of mice chronically treated with cisplatin. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21228875>
- Nematbakhsh, M., Ebrahimian, S., Toyserkani, M., Eshraghi-Jazi, F., Talebi, A., & Ashrafi, F. (2013). *Gender Difference in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in a Rat Model: Greater Intensity of Damage in Male Than Female*. <https://doi.org/10.5812/numonth>
- Norrby, S. R., Alestig, K., Bjornegard, B., Burman, L. A., Ferber, F., Huber, J. L., Jones, K. H., Kahan, F. M., Kahan, J. S., Kropp, H., Meisinger, M. A. P., & Sundelof, J. G. (1983). Urinary Recovery of N-Formimidoyl Thienamycin (MK0787) as Affected by Coadministration of N-Formimidoyl Thienamycin Dehydropeptidase Inhibitors. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*.
- Ognjanović, B. I., Djordjević, N. Z., Matić, M. M., Obradović, J. M., Mladenović, J. M., Štajn, A. Š., & Saičić, Z. S. (2012). Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: A possible protective effect of selenium. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(2), 1790–1803. <https://doi.org/10.3390/ijms13021790>
- Ortín-Martínez, A., Jimenez-Lopez, M., Nadal-Nicolás, F. M., Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martínez, L., Sauve, Y., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2010). Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *51*(6), 3171–3183. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4861>

- Ortiz Adaro, A. (2006). Anatomía comparada de la corteza cerebral occipital, en dos especies de octodones. [Http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130959](http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130959)
- Ostrow S, Hahn D, Wiernik PH, Richards RD. Ophthalmologic toxicity after cis-dichlorodiammineplatinum(II) therapy. *Cancer Treat Rep.* 1978 Oct;62(10):1591-4. PMID: 709562.
- Ozols, R. F., Javadpour, N., Barlock, A., Messerschmidt, G. L., & Young, R. C. (1983). Treatment of Poor Prognosis Nonseminomatous Testicular Cancer with A “High-Dose” Platinum Combination Chemotherapy Regimen. In *Cancer* (Vol. 51).
- Pabla, N., & Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. In *Kidney International* (Vol. 73, Issue 9, pp. 994–1007). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>
- Park, B., Jo, K., Lee, T. G., Hyun, S. W., Kim, J. S., & Kim, C. S. (2019). Polydatin inhibits NLRP3 inflammasome in dry eye disease by attenuating oxidative stress and inhibiting the nf-kb pathway. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112792>
- Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2001). Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. In *Biochem. J* (Vol. 358).
- Pastel DA. Imipenem-cilastatin sodium, a broad-spectrum carbapenem antibiotic combination. *Clin Pharm.* 1986 Sep;5(9):719-36. PMID: 3530614.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6<sup>o</sup> Edición. (1st ed.).
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). ASTROCYTE REACTIVITY AND REACTIVE ASTROGLIOSIS: COSTS AND BENEFITS. *Physiol Rev*, 94, 1077–1098. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013.-Astrocytes>
- Pérez, M., Castilla, M., Torres, A. M., Lázaro, J. A., Sarmiento, E., & Tejedor, A. (2004). Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(10), 2445–2455. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh397>
- Peters, A., Kara, D. A., & Harriman, K. M. (1985). The Neuronal Composition of Area 17 of Rat Visual Cortex. 111. Numerical Considerations. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*.
- Peyrone M, “Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorur” [On the action of ammonia on platinum chloride], *Ann. Chem. Pharm.* 51 (1) (1844) 1–29.
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: Structure, function and concept. In *Brain Research Reviews* (Vol. 46, Issue 1, pp. 1–31). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., Schlattau, A., Lathroum, L., & Windebank, A. J. (2011). Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiology of Disease*, 41(3), 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.017>
- Purves, E. (2023). Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated.

- Puyang, Z., Feng, L., Chen, H., Liang, P., Troy, J. B., & Liu, X. (2016). Retinal ganglion cell loss is delayed following optic nerve crush in nlrp3 knockout mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20998>
- Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., & Wang, F. (2019). Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 32, Issue 8, pp. 1469–1486). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00204>
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). *Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents*.
- Raheem, N. M., & Mohammed Ali Mahmood, N. (2023). Azilsartan suppresses the antiapoptotic biomarker and pro-inflammatory cytokines in rat model of cisplatin-induced retinal and optic nerve toxicity. *Human and Experimental Toxicology*, 42. <https://doi.org/10.1177/09603271231155092>
- Ramirez, J. M., Trivino, A., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., & Garcia-Sanchez, J. (1996). *Structural Specializations of Human Retinal Glial Cells*.
- Ramón y Cajal, S. (1900). Esquema de la estructura de la retina de los mamíferos. Ucm.es. <https://www.ucm.es/cultura//esquema-de-la-estructura-de-la-retina-de-los>
- Rathnasamy, G., Foulds, W. S., Ling, E. A., & Kaur, C. (2019). Retinal microglia – A key player in healthy and diseased retina. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 173, pp. 18–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.006>
- Read, J. C. A. (2021). *Binocular Vision and Stereopsis Across the Animal Kingdom*. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-093019>
- Reese, B. E. (1988). 1988, Reese. *Brain Research Reviews*, 13, 119–137.
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2020). Glia of the human retina. *GLIA*, 68(4), 768–796. <https://doi.org/10.1002/glia.23727>
- Rezvanfar, M. A., Rezvanfar, M. A., Shahverdi, A. R., Ahmadi, A., Baeeri, M., Mohammadirad, A., & Abdollahi, M. (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(3), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.025>
- Rodríguez-Gómez, J. A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M. K. R., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J. L., & Burguillos, M. A. (2020). Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9071717>
- Rosenberg, B. (1968). CISPLATIN: ITS HISTORY AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION. In *Cisplatin* (pp. 9–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-565050-2.50006-1>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature Publishing Group*.

- Salobar-García, E., López-Cuenca, I., Sánchez-Puebla, L., de Hoz, R., Fernández-Albarral, J. A., Ramírez, A. I., Bravo-Ferrer, I., Medina, V., Moro, M. A., Saido, T. C., Saito, T., Salazar, J. J., & Ramírez, J. M. (2021). Retinal Thickness Changes Over Time in a Murine AD Model APPNL-F/NL-F. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.625642>
- Santos, N. A. G. Dos, Ferreira, R. S., & Santos, A. C. Dos. (2020). Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 136). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111079>
- Schaeppli, U., Heyman, I. A., Fleischman, R. W., Rosenkrantz, H., Ilievski, V., Phelan, R., Cooney, D. A., & Davis, R. D. (1973). Cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875): Preclinical Toxicologic Evaluation of Intravenous Injection in Dogs, Monkeys and Mice 1-3. In *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* (Vol. 25).
- Schmid, K. E., Kornek, G. V., Scheithauer, W., & Binder, S. (2006). Update on ocular complications of systemic cancer chemotherapy. In *Survey of Ophthalmology* (Vol. 51, Issue 1, pp. 19–40). <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2005.11.001>
- Sefton, A. J., Dreher, B., Harvey, A. R., & Martin, P. R. (2015). Visual System. In *The Rat Nervous System: Fourth Edition* (pp. 947–983). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00030-9>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2024). Las cifras del cáncer en España 2023. Seom.org. Recuperado el 11 de julio de 2024, de [https://seom.org/images/Las\\_cifras\\_del\\_Cancer\\_en\\_Espana\\_2023.pdf](https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf)
- Shabani, M., Larizadeh, M. H., Parsania, S., Hajali, V., & Shojaei, A. (2012). Evaluation of destructive effects of exposure to cisplatin during developmental stage: No profound evidence for sex differences in impaired motor and memory performance. *International Journal of Neuroscience*, 122(8), 439–448. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.673515>
- Shang C, Liu Z, Chen Z, Shi Y, Wang Q, Liu S, Li D, Cao P. BRAIN CIRCUITS. A parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice. *Science*. 2015 Jun 26;348(6242):1472-7. Doi: 10.1126/science.aaa8694. PMID: 26113723.
- Sharma S, Chitranshi N, Wall RV, Basavarajappa D, Gupta V, Mirzaei M, Graham SL, Klistorner A, You Y. Trans-synaptic degeneration in the visual pathway: Neural connectivity, pathophysiology, and clinical implications in neurodegenerative disorders. (2022) *Surv Ophthalmol*. 67(2):411-426. Doi: 10.1016/j.survophthal.2021.06.001. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34146577
- Sherman, S. M., & Guillery, R. W. (2002). The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1428), 1695–1708. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1161>
- Shi, D. D., Huang, Y. H., Lai, C. S. W., Dong, C. M., Ho, L. C., Li, X. Y., Wu, E. X., Li, Q., Wang, X. M., Chen, Y. J., Chung, S. K., & Zhang, Z. J. (2019). Ginsenoside Rg1 Prevents Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment: Associations with Microglia-Mediated Cytokines, Neuroinflammation, and Neuroplasticity. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5626–5642. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1474-9>

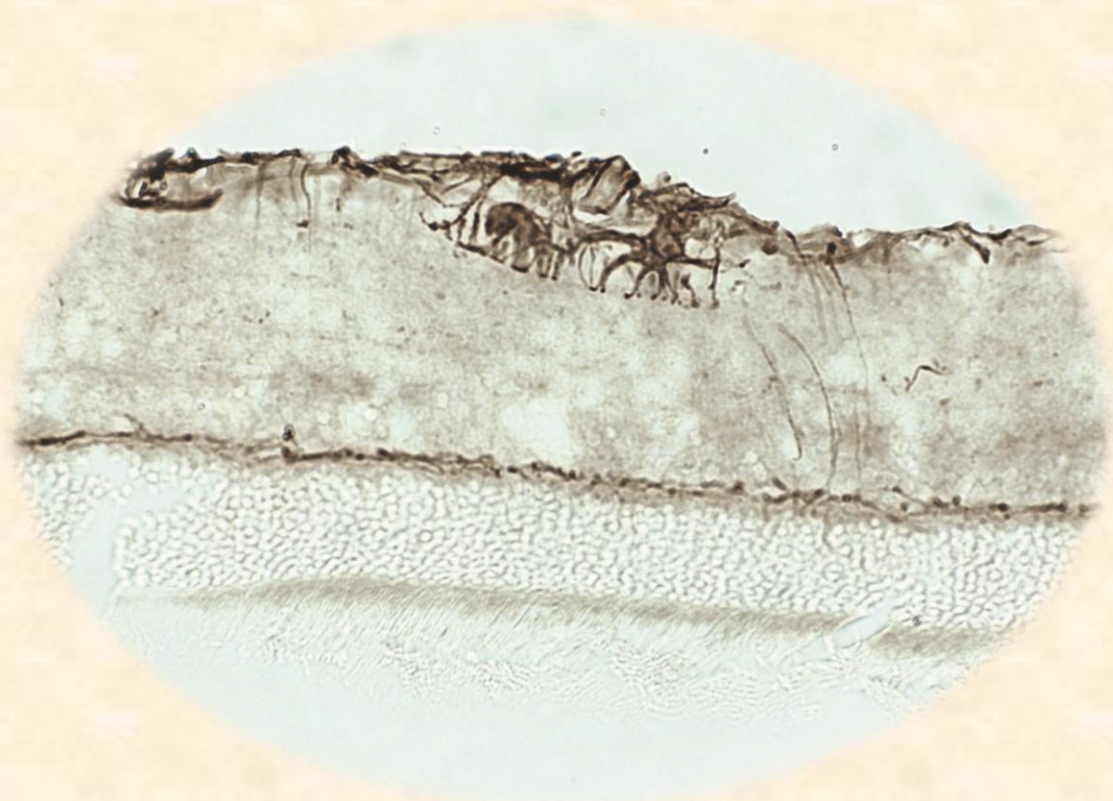
- Shinozaki, Y., & Koizumi, S. (2021). Potential roles of astrocytes and Müller cells in the pathogenesis of glaucoma. In *Journal of Pharmacological Sciences* (Vol. 145, Issue 3, pp. 262–267). Japanese Pharmacological Society. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.12.009>
- Squillace, S., Niehoff, M. L., Doyle, T. M., Green, M., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Arnatt, C. K., Spiegel, S., Farr, S. A., & Salvemini, D. (2022). Sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation in the central nervous system drives cisplatin-induced cognitive impairment. *Journal of Clinical Investigation*, 132(17). <https://doi.org/10.1172/JCI157738>
- Sugihara, K., & Gemba, M. (1986). *Modification of Cisplatin Toxicity by Antioxidants*.
- Szabo, G., Dolganiuc, A., Dai, Q., & Pruetz, S. B. (2007). TLR4, Ethanol, and Lipid Rafts: A New Mechanism of Ethanol Action with Implications for other Receptor-Mediated Effects. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1243–1249. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1243>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 53, Issue 2, pp. 1181–1194). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tejedor, A., Torres, A. M., Castilla, M., Lazaro, J. A., De Lucas, C., & Caramelo, C. (2007). Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: Clinical evidence. *Current Medical Research and Opinion*, 23(3), 505–513. <https://doi.org/10.1185/030079906X167633>
- Uranga, J. A., García-Martínez, J. M., García-Jiménez, C., Vera, G., Martín-Fontelles, M. I., & Abalo, R. (2017). Alterations in the small intestinal wall and motor function after repeated cisplatin in rat. *Neurogastroenterology and Motility*, 29(7). <https://doi.org/10.1111/nmo.13047>
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers (2005). *Pharmacology and Toxicology*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 51, pp. 1–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
- Vidal-Villegas., B. (2024). Respuestas de las células ganglionares de la retina a la lesión y su prevención.
- Walsh, T. J., Clark, A. W., Parhad, I. M., & Green, W. R. (1982). *Neurotoxic Effects of Cisplatin Therapy*. <http://archneur.jamanetwork.com/>
- Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 4, pp. 307–320). <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2011). Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *Journal of Neuroinflammation*, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-173>

- World Health Organization: WHO. (2022). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Whyland, K. L., Slusarczyk, A. S., & Bickford, M. E. (2020). Gabaergic cell types in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *Journal of Comparative Neurology*, 528(2), 308–320. <https://doi.org/10.1002/cne.24754>
- Wilding, G., Caruso, R., Lawrence, T. S., Ostchega, Y., Ballintine, E. J., Young, R. C., & Ozols, R. F. (1985). Retinal Toxicity After High-Dose Cisplatin Therapy. In *J Clin Oncol* (Vol. 3).
- Wiltshaw, E. (1979). Cisplatin in the Treatment of Cancer THE FIRST METAL ANTI-TUMOUR DRUG.
- Yao, L., Kan, E. M., Lu, J., Hao, A., Dheen, S. T., Kaur, C., & Ling, E.-A. (2013). *Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia*. <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/23>
- Yazici, A., Sogutlu-Sari, E., Yay, A., Aksit, H., Kilic, A., Aksit, D., Yildiz, O., & Ermis, S. S. (2014). The protective effect of selenium in cisplatin-related retinotoxicity. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 33(4), 327–332. <https://doi.org/10.3109/15569527.2013.879877>
- You, Y., Gupta, V. K., Graham, S. L., & Klistorner, A. (2012). Anterograde Degeneration along the Visual Pathway after Optic Nerve Injury. *Plos ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052061>
- Yücel, Y. H., Zhang, Q., Weinreb, R. N., Kaufman, P. L., & Gupta, N. (2001). *Atrophy of Relay Neurons in Magno-and Parvocellular Layers in the Lateral Geniculate Nucleus in Experimental Glaucoma*.
- Zaballos, M., Power, M., Canal-Alonso, M. I., González-Nicolás, M. Á., Vasquez-Jimenez, W., Lozano-Lominchar, P., Cabrerizo-Torrente, P., Palencia-García, N., Gago-Quiroga, S., Ginel-Feito, M. D., Jiménez, C., Lázaro, A., & González-Bayón, L. (2021). Effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in patients undergoing hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22031239>
- Zahir, M. N., Masood, N., & Shabbir-Moosajee, M. (2012). Cisplatin-induced posterior reversible encephalopathy syndrome and successful re-treatment in a patient with non-seminomatous germ cell tumor: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 6. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-6-409>
- Zajchowski, L. D., & Robbins, S. M. (2002). Lipid rafts and little caves Compartmentalized signalling in membrane microdomains.
- Zeiss, C. J., Tu, D. C., Phan, I., Wong, R., & Treuting, P. M. (2017). Special Senses: Eye. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition* (pp. 445–470). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00021-X>
- Zeng, H., & Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: Challenges, opportunities and the path forward. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 9, pp. 530–546). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>

- Zhang, B., Ramesh, G., Norbury, C. C., & Reeves, W. B. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$  produced by renal parenchymal cells. *Kidney International*, 72(1), 37–44. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002242>
- Zhang, Z., Liu, W. Y., Diao, Y. P., Xu, W., Zhong, Y. H., Zhang, J. Y., Lazarus, M., Liu, Y. Y., Qu, W. M., & Huang, Z. L. (2019). Superior Colliculus gabaergic Neurons Are Essential for Acute Dark Induction of Wakefulness in Mice. *Current Biology*, 29(4), 637-644.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.031>
- Zhao, M., Li, C. H., & Liu, Y. L. (2016). Toll-like receptor (TLR)-2/4 expression in retinal ganglion cells in a high-glucose environment and its implications. *Genetics and Molecular Research*, 15(2). <https://doi.org/10.4238/gmr.15026998>
- Zhou, W., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2016). Metformin prevents cisplatin-induced cognitive impairment and brain damage in mice. *Plos ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151890>
- Zueva, L., Rivera, Y., Kucheryavykh, L., Skatchkov, S. N., Eaton, M. J., Sanabria, P., & Inyushin, M. (2014). Electron Microscopy in Rat Brain Slices Reveals Rapid Accumulation of Cisplatin on Ribosomes and Other Cellular Components Only in Glia. *Chemotherapy Research and Practice*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/174039>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



# ÍNDICE DE FIGURAS

1. Anatomía del ojo humano.
2. Áreas anatómicas de la retina.
3. Dibujo clásico de la retina de Ramón y Cajal.
4. Estructura de la retina.
5. Esquema de los tipos celulares de la retina y sus conexiones.
6. Células gliales de la retina.
7. Morfotipos microgliales en la retina.
8. Representación esquemática de la vía visual en roedores.
9. Núcleos de proyección de las eferencias retinianas en roedores nocturnos.
10. Esquema de la organización morfológica del colículo superior (CS) y la organización topográfica de las aferencias que recibe.
11. Organización de las proyecciones retinianas en territorios oculares específicos y mapas topográficos en el sistema visual de ratón.
12. Ejemplos de los tipos celulares del colículo superior (CS) identificados mediante tinción con *Lucifer Yellow*.
13. Conexiones aferentes y eferentes del colículo superior (CS) en ratón.
14. Organización de las proyecciones retinianas en los núcleos del núcleo geniculado lateral (NGL).
15. Esquema de la organización del núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) de ratón.
16. Diagrama de circuito del núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL).
17. Proyecciones aferentes y eferentes del núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) en roedores.
18. Esquema de la corteza visual (V1) del ratón.
19. Esquema del sistema visual de roedores.
20. Esquema de las neuronas glutamatérgicas en la corteza visual primaria (V1) dispuestas en las capas L1-L6.
21. Esquema de las neuronas GABAérgicas de la corteza visual primaria (V1).
22. Proyecciones aferentes y eferentes de la corteza visual primaria (V1).
23. Estructura molecular y estructura 3D del cisplatino (CIS).

24. Hitos del uso del cisplatino (CIS).
25. Mecanismos de movilización del cisplatino (CIS) a través de la membrana celular.
26. Formación y efectos de los aductos del cisplatino (CIS).
27. Estructura molecular de la cilastatina.
28. Diseño experimental.
29. Procesamiento y análisis de las muestras de sangre.
30. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas para analizar.
31. Esquema del procesamiento de cortes de las muestras para inmunohistoquímica y su posterior análisis.
32. Organización anatómica espacial de la retina.
33. Principales núcleos de relevo de la vía visual.
34. Imagen de la retina obtenida por tomografía de coherencia óptica (TCO). Áreas descritas en el análisis.
35. Esquema de la retina en el análisis del espesor total de la retina por tomografía de coherencia óptica (TCO).
36. Esquema de la retina en el análisis del espesor de capas de fibras por tomografía de coherencia óptica (TCO).
37. Análisis por conteo de las células Brn3a positivas en retina.
38. Análisis por densitometrado del marcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en retina.
39. Análisis por conteo de las células Iba1 positivas en retina.
40. Morfotipos representativos de las células microgliales en la retina.
41. Análisis por densitometrado del marcaje con NeuN en núcleos de la vía visual.
42. Análisis por densitometrado del marcaje con GFAP en núcleos de la vía visual.
43. Análisis por conteo de las células Iba1 positivas.
44. Morfotipos de las células de microglía cerebrales.
45. Efectos sobre el peso corporal (en gramos, g).
46. Efecto sobre el NUS y la creatinina sérica (en mg/dL).
47. Evolución del peso corporal (en gramos, g).
48. Espesor total de la retina (en micras).
49. Espesor total de la retina (en micras).
50. Espesor de la capa de fibras del nervio óptico (en micras).

51. Expresión de células Brn3<sup>+</sup> (número) en la totalidad de la retina.
52. Expresión de células Brn3<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la retina.
53. Expresión de GFAP (Densidad Óptica, D.O.) en la totalidad de la retina.
54. Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes áreas de la retina.
55. Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes capas de la retina.
56. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en la totalidad de la retina.
57. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la retina.
58. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes capas de la retina.
59. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en la totalidad de la retina. Diversidad de morfotipos microgliales y representación fotográfica de cada uno de los morfotipos.
60. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de NLRP3 en retina.
61. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de TLR4 en retina.
62. Expresión de células NeuN<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes áreas de la vía visual.
63. Expresión de células GFAP<sup>+</sup> (Densidad Óptica, D.O.) en las diferentes áreas de la vía visual.
64. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la vía visual
65. Expresión de células Iba1<sup>+</sup> (número) en las diferentes áreas de la vía visual. Diversidad de morfotipos microgliales.

# ÍNDICE DE TABLAS

1. Principales diferencias en la retina de humanos y ratas.
2. Principales estudios que muestran retinotoxicidad asociada a cisplatino (CIS) en humanos.
3. Modelos animales de daño orgánico por cisplatino (CIS) empleados en el estudio de la neurotoxicidad.
4. Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos.
5. Anticuerpos empleados en los análisis de inmunofluorescencia.
6. Análisis de la variación de peso corporal durante los días de modelo experimental: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías
7. Análisis de la expresión de las células Brn3<sup>+</sup> en las diferentes áreas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.
8. Análisis de la expresión de las células GFAP<sup>+</sup> en las diferentes áreas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.
9. Análisis de la expresión de las células GFAP<sup>+</sup> en las diferentes capas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.
10. Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en las diferentes zonas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.
11. Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en las diferentes capas de la retina: Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.
12. Análisis de la vía del inflammasoma en la retina: resultados de colocalización
13. Análisis de la expresión de las células Iba1<sup>+</sup> en los distintos núcleos de la vía visual, colículo superior (CS), núcleo geniculado lateral dorsal (dNGL) y corteza visual primaria (V1): Resultados estadísticos del ANOVA de dos vías
14. Resumen de los principales resultados obtenidos en la retina, en las distintas áreas analizadas, tras la administración de cisplatino (CIS).
15. Resumen esquemático de los principales resultados del estudio de los morfotipos microgliales tras el tratamiento con cisplatino (CIS) en los distintos núcleos de la vía visual.

