

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central en modelos de fracaso multiorgánico. Búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas

Investigation of the central nervous system inflammatory response in animal model of multiorgan failure. Search for novel therapeutic approaches

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego San Felipe Riba

DIRIGIDA POR

Eva María Marco López
Alberto Lázaro Fernández
Meritxell López Gallardo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL EN MODELOS DE FRACASO MULTIORGÁNICO. BÚSQUEDA DE NUEVAS
ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.

//

INVESTIGATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFLAMMATORY
RESPONSE IN ANIMAL MODEL OF MULTIORGAN FAILURE. SEARCH FOR NOVEL
THERAPEUTIC APPROACHES.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego San Felipe Riba

DIRECTORES

Dra. Eva María Marco López

Dr. Alberto Lázaro Fernández

Dra. Meritxell López Gallardo

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL EN MODELOS DE FRACASO MULTIORGÁNICO. BÚSQUEDA DE
NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.

//

INVESTIGATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFLAMMATORY
RESPONSE IN ANIMAL MODEL OF MULTIORGAN FAILURE. SEARCH FOR NOVEL
THERAPEUTIC APPROACHES.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego San Felipe Riba

DIRECTORES

Dra. Eva María Marco López

Dr. Alberto Lázaro Fernández

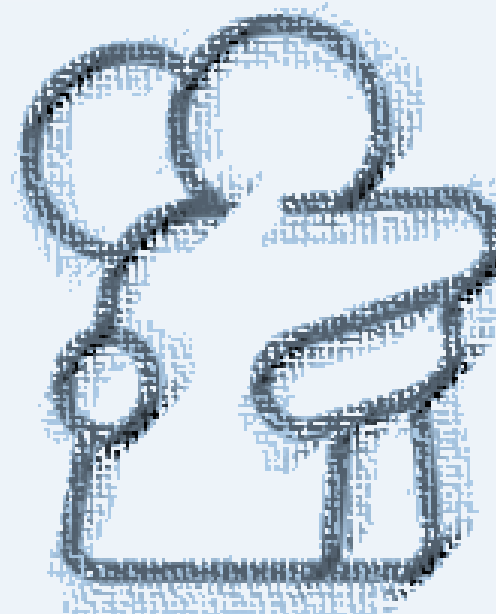
Dra. Meritxell López Gallardo

*"Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro"*

Santiago Ramón y Cajal

*A mi hermana Lorena,
mi suerte y mi apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS



Han pasado 7 años desde que comencé en el mundo de la investigación, y durante este tiempo he sido guiado y acompañado por personas excepcionales a las cuales quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

*En primer lugar, quiero dar las gracias al destino por aquella sustitución en Fisiología Animal que puso en mi camino a la mejor profesora que he tenido, quien además me brindó la oportunidad de empezar a trabajar con ella: muchas gracias a mi directora de Tesis la **Dra. Eva Marco**. Eva, hemos trabajado mucho tiempo juntos, en el cual me has enseñado la mayor parte de las cosas que sé sobre el mundo de la investigación, desde los análisis estadísticos y cómo trabajar correctamente con animales de experimentación hasta el “TOC” por los Excel, las presentaciones perfectas y a poder detectar un espacio de más en cualquier documento..., podría hacer un largo listado, pero me extendería demasiado. De mayor quiero ser como tú; quiero tener ese rigor científico, esa integridad en la investigación, y esa devoción por el trabajo bien hecho. Gracias, gracias y mil veces gracias.*

*De la mano de Eva llegué a la Facultad de Medicina, donde allí encontré a otra de mis directoras, la **Dra. Meritxell López-Gallardo**. Meri, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por transmitirme tu pasión por la inmunohistoquímica y la microscopía, y por compartir tu amplio conocimiento sobre la retina con esas dotes de docente que tienes. Gracias por ser la “mami” del grupo, por enseñarme cómo tratar a las personas, y por estar siempre ahí con tus ánimos y consejos.*

*Y muchas gracias a mi tercer director, el **Dr. Alberto Lázaro**. Alberto, tú fuiste el último que he conocido de los tres, empezando a trabajar juntos durante mi TFM. Muchas gracias por enseñarme la importancia de llevar a cabo la investigación básica a algo real y aplicable a la clínica. Gracias por acogerme como uno más de tu equipo y brindarme siempre tu apoyo.*

En resumen, gracias a los tres por toda la ayuda recibida durante el TFG, el TFM y la Tesis; por ayudarme a conseguir financiación para poder realizarla; por confiar en mí a la hora de participar en proyectos, congresos y en actividades docentes; y, sobre todo, muchas gracias por formarme como investigador.

*Continuaré con mi “cuarto director”, el **Dr. Ricardo Llorente**, quien ha estado día tras día conmigo. Sin quererlo he ido siguiendo tus pasos... desde el pontón de Cantimpalos hasta hacer la Tesis en el mismo laboratorio. ¡El mundo es un pañuelo! Muchas gracias, pesadilla, primero por tus habilidades informáticas y tus consejos (que no siempre seguimos); segundo por la ayuda con los apasionantes densitometrados y contajes de microglía, con los cuales hemos pasado muchas pero que muchas horas juntos; y tercero por la gran compañía y los chistes malos que a veces tienen incluso gracia.*

*Me gustaría hacer una mención especial al **Dr. Alberto Tejedor**, quien comenzó siendo mi director de Tesis, pero lamentablemente la COVID nos dejó sin ti. Muchas gracias por todo el legado que has dejado gracias al gran investigador y docente que fuiste. Aunque no tuve el placer de trabajar contigo todo lo que me hubiera gustado, he tenido la enorme oportunidad de conocer y trabajar con tu hija, la **Dra. Marta Tejedor**. Marta eres una de las mejores personas que he conocido durante estos años; derrochas alegría y bondad allá por donde vas. Muchas gracias por el gran apoyo que has sido para mí estos últimos años.*

*Ahora es el turno de hablar de todos los compañeros y amigos con los que he pasado mucho tiempo en la poyata. En primer lugar, dar las gracias a mis dos “hermanos mayores”: la ya **Dra. Marta Moya** y al futuro **Dr. Mariano de la Serna-Soto**. Mi Martis, la chica más trabajadora que he conocido en este mundillo, ¡eres un gran ejemplo a seguir! Mi chica Podcast... con todos los audios que nos hemos ido mandando podríamos hacer un disco. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado, por siempre tenerme en cuenta e incluirme en todo, por esas palabras de ánimo y de desahogo que siempre son necesarias, por esos momentos cantando reggaetón y por esas cañitas que hemos disfrutado (¡y por todas las que nos quedan pendientes!). Mi Marians, qué alegría tienes siempre, aunque a las 8:30 de la mañana te prefería no ver xD. Eras el rey del labo... hasta que te destroné. Lo*

siento por ser mejor que tú en todo incluso bailando;) ¡Ojalá poder haber trabajado mucho más tiempo juntos! Os echo mucho de menos y espero que nuestros caminos se vuelvan a cruzar pronto.

Ahora es el turno de mi “siamesa”, la reciente **Dra. Beatriz Martín-Sánchez**, con quien he ido de la mano durante toda esta aventura y sin duda quien se merece el GRACIAS más grande por toda la ayuda recibida, por tu apoyo incondicional, y por estar ahí, sobre todo estos últimos meses. Bea, Bea, Bea ahora sí que sí, yo era ateo, pero AHORA CREO. Han sido siete añitos trabajando codo con codo (que se dice pronto), en los cuales hemos vivido muchas cosas: buenas, malas, momentos de tensión, cafés de desahogo, cursos insoportables... Pero yo me quedo con esos momentos de risas que nos hemos echado: tupperts al sol, noches de cruces, pérdidas de llaves, tazas de “café”... ¡Sin duda no podría haber tenido mejor compañera! Aunque esta “tortura” se haya acabado, no creas que te vas a librar de mi llamadita diaria.

Mi Lauris, mi “hermanita pequeña”, ¡cómo te he echado de menos en el labo! Muchísimas gracias por toda la ayuda recibida los fines de semana de la FERP, a ayudarme a colocar una y otra vez las muestras de plasma, y a procesar gran parte de las muestras de mi Tesis. Para mí, la mejor cortadora de criostato que he visto hasta el momento, te quedabas tan concentrada, en las nubes, que era muy fácil darte un susto. Gracias por siempre estar disponible para todo lo que se te pidiera, y, sobre todo, por todas las risas que nos hemos echado juntos.

Sara y Miguel Ángel, mis “bebes inseparables”, los futuros Bea y Diego del labo, muchísimas gracias a los dos por estos últimos años de compañía, congresos, partidas de parchís y de desayunos de gordis; y por haber tenido la oportunidad de ir traspasando todo el conocimiento a los siguientes doctorandos. Sara mi fiel compañera de Avanza, gracias por todas esas sesiones de dermoestética, por dejarme enseñarte algo de inglés y por esos momentos de cotilleos ¡Qué pena que seas del peor pueblo de Segovia! Miguel, el niño pequeño del labo pero a la vez el más grandullón, gracias en primer lugar por tu ayuda con el montaje de láminas. Pero, lo más importante, muchas gracias por esos reels y chistes de humor negro que te alegran el día. Ha sido genial compartir este camino con vosotros, y espero que sigamos trabajando juntos.

Blanca, muchas gracias por tu ayuda con el modelo de sepsis y por haber confiado en mí para formarte. **Dani**, gracias por empezarme todas esas inmunos para que no me dieran las tantas de la tarde, por ayudarnos a todos y siempre estar atento por si necesitamos cualquier cosa. **Víctor**, aunque hayamos coincidido poco tiempo, ha sido un placer conocerte, y espero que podamos trabajar juntos en el futuro.

Y para finalizar con mi grupo UCM, muchas gracias a las dos personas más sabias que he conocido: la **Dra. Carmen Prada** y el **Dr. Jorge García-Seoane**. Carmen, siempre me ha encantado escuchar todas tus historias de cómo llegaste a conseguir todo lo que te has propuesto con esfuerzo y lucha, gracias por ser una investigadora tan fuerte y por dejarnos este laboratorio y este gran grupo. Jorge, muchas gracias por toda tu ayuda informática, por todo lo que me has enseñado sobre la fisiología, en especial el ecocardiograma y por transmitirme la empatía y el humor necesarios para tratar con los alumnos. Y a la **Dra. Rosario López-López**, gracias por siempre estar pendiente de mi progreso y por mostrarme siempre una sonrisa de apoyo.

Aunque mi grupo principal se encuentra en la Facultad de Medicina, he tenido la grandísima suerte de trabajar en otros laboratorios en los cuales he coincidido con personas increíbles que han enriquecido mi experiencia investigadora.

En primer lugar, dar las gracias a mi segundo grupo, a los “primos carnales”, al grupo del Gregorio Marañón, en especial a la **Dra. María Ángeles González-Nicolas**. Marian, muchísimas gracias por tu inmensa ayuda con los dos modelos animales, por siempre habernos coordinado perfectamente en los experimentos, y por la disponibilidad que has tenido siempre para mí. Y muchas gracias a mis compis: **Lara, David y Elena**. Ha sido una lástima no haberos conocido antes... porque... ¿Qué hubiera sido?, si antes os hubiera conocido... En especial, gracias a mi Helen, que meses de risas

nos hemos echado los cuatro fantásticos de siempre, con las jotas, los profesores fantasmas, las rimas y los chistes fáciles. Y por supuesto, muchísimas gracias por toda tu inmensa ayuda con el modelo de malaria y por tener la oportunidad de enseñarte todo lo que sé sobre inmunohistoquímica.

Muchas gracias al **Dr. Juan J. García-Rodríguez** por toda la ayuda con el modelo, por enseñarme a realizar correctamente la evaluación de la parasitemia y por tratarme siempre con cariño.

Gracias a todo el grupo del **Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo** con los que he podido colaborar durante estos años. En especial a la **Dra. Elena Salobrar-García** por su inmensa ayuda con la realización de las OCTs y por estar siempre disponible para cualquier duda.

No puedo dejar de mencionar a la **Dra. Laura Orio** y al **Dr. Borja García-Bueno**, con los cuales tuve el placer de comenzar a trabajar durante mi TFG. Gracias a este proyecto, tuve la oportunidad de aprender varias técnicas de comportamiento animal donde surgió mi gran interés por ellas. Muchas gracias por siempre haber contado conmigo. Y muchas gracias a los compañeros con los que he trabajado allí: **Antonio, Leti y Berta**.

A la familia de Bio: **Miguel, Aitana, Nuria, Diego e Lisbeth**; gracias por esas comidas juntos, por las celebraciones de Navidad y por las conversaciones que servían cómo momentos de desconexión y de salseo.

A mi “familia extranjera”, aquella que conocí durante una de mis mejores etapas de estos años, mi estancia en Manchester. En primer lugar, dar las gracias a la **Dra. Gloria López-Castejón** por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, por toda la ayuda con el papeleo, y por hacerme sentir como uno más desde el primer momento. A **Fátima y Rodrigo**, muchas gracias por enseñarme con ese cariño y paciencia los cultivos y las PCRs. A mi pequeño griego, **Loukas**, ¡que paciencia he tenido que tener contigo para enseñarte los WB pero qué risas más buenas nos hemos echado! Y al resto de compañeros que he tenido **Chiara, Rajia, Joana...** pero en especial a mi **Illesita**. Chamaquita, que alegría haberte conocido. Gracias por darme compañía todos los días de vuelta a casa a las tantas, por enseñarme la citometría de flujo, por esas cervezas en el TurinTap, por esas noches de reggaetón y, sobre todo, porque eres una grandísima persona que me llevo para siempre.

Agradecer a todas esas instituciones donde he podido trabajar. En primer lugar, al **Dpto. de Fisiología**, donde he tenido el placer de estar estos siete años, en el cual he podido iniciar mi formación docente; muchas gracias a todos los profesores por siempre estar dispuestos a enseñarme. Al **Dpto. de Genética, Fisiología y Microbiología**, donde tuve mi primer contacto con el mundo de la investigación gracias a la Beca de Colaboración en Departamentos y donde inicié mi primer contrato como investigador de la Comunidad de Madrid. A la **Universidad Complutense de Madrid**, por haberme concedido la Beca de Formación de Personal Investigador que me ha permitido realizar la Tesis y la Beca de Movilidad que me ha permitido realizar una estancia predoctoral. Y al **Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón**, donde he tenido el placer de trabajar y llevar a cabo mis modelos animales, muchas gracias a todo los compañeros y el personal por ofrecerme ayuda siempre que la he necesitado.

Ahora es el turno de agradecer a todas esas personas que siempre te hacen la pregunta más aterradora cuando eres doctorando “¿Qué tal la Tesis?”, a esa familia que se elige, a los amigos que han estado día a día conmigo.

Empezar por mi más fiel apoyo **Andrea y Claudia** ¡las niñas de mis ojos! Muchas gracias por estar ahí siempre, por darme cama en Madrid siempre que lo he necesitado, por esos filetes “singlu” de los Chanos y por ayudarme a desconectar con esas partidas al Monopoly. Seguir por mis niños, **Carlos y Pablo**, ya no os puedo seguir poniendo la excusa de que estoy liado escribiendo. Muchas gracias a los dos, por tener la oportunidad de teneros como amigos y por estar siempre en los buenos y en los malos momentos.

Agradecimientos

A mis dos grandes amigas **Nuria y Marta**. Sin duda dos de las personas que más chapas me han aguantado durante estos años... lo siento, jeje. Muchas gracias por todo el apoyo y por ese viaje a Irlanda que nos unió para siempre. ¡Ahora sí que sí, esperadme que voy a veros!

Marina y Ana, siempre acompañándome desde que éramos muy muy pequeños. ¡Muchas gracias por estar siempre ahí! Ahora soy yo el que os da todo mi apoyo para que consigáis esa plaza y acabéis la Tesis ¡porque podéis con ello!

A mis grandes grupos de amigos con los que he podido distraerme y disfrutar durante todo este camino, mis **Chicos Listos**, los cuales no nos hemos separado desde la carrera y han sido un gran apoyo durante estos años, por esas casas rurales, por esas vacaciones y por todos los momentos que nos quedan por disfrutar juntos; a **mis Yolihs**, quienes me han alegrado tantos fines de semana por la calle los bares, en las fiestas del pueblo y el día a día con nuestros salseos reales o inventados; a **los Dekafes**, en especial a Santi y a Carlos; al **comando truja** y a mis cuatro fantásticas (**Eva, Soraya, Sonia y Laura**). ¡Muchas gracias a todos!

Y para el final a esa pesadilla de pelo rizado que se sentaba detrás de mí en 3C, la que luego no se despegaba en la uni y con la que he continuado el camino del doctorando paso a paso, a la **Dra. Sanz-Gómez**. Mi Marti, sin duda contigo he sido el más pesado... bueno y tú conmigo xD. Muchas gracias por ir de la mano conmigo en esta aventura, has sido el mejor apoyo que he podido tener. Hemos pasado muchas pero que muchas horas en la terraza, siempre ahí, en los momentos buenos y en los no tan buenos. GRACIAS.

Javi, ¡qué suerte el haberte conocido! Muchísimas gracias por estar a mi lado esta última etapa, sin duda has sido un gran apoyo y uno de los que más ha tenido que aguantar. Gracias por tu paciencia, por ser una vía de desahogo en los momentos más estresantes y por saber escucharme. Y gracias a mi peludo **Nelo**, por estar tantas mañanas lloriqueando y dándome con la cabeza mientras estaba escribiendo.

A toda mi familia que, aunque no sea muy extensa, es todo lo que necesito y doy gracias por tenerla.

A mis abuelos **Félix y Juanita**, las personas más trabajadoras que he conocido en toda mi vida, sin duda la persona que soy hoy en día es gracias a vosotros. A mi abuela **Josefa** que siempre seré su ojito derecho. Muchas gracias a los tres por quererme tanto y por esas partidas que son los momentos que más disfruto y que espero seguir disfrutando por mucho mucho tiempo. ¡Qué suerte de teneros!

A mi tía **Pini**, muchísimas gracias por siempre apoyarme en todo lo que he decidido, por estar siempre ahí y por preocuparte siempre tanto por tus sobrinos, como una segunda madre. Desde que tengo conciencia siempre has estado pendiente de nuestra carrera laboral, posibles salidas, cursos de inglés... siempre para apoyarnos y guiarnos. Muchas gracias.

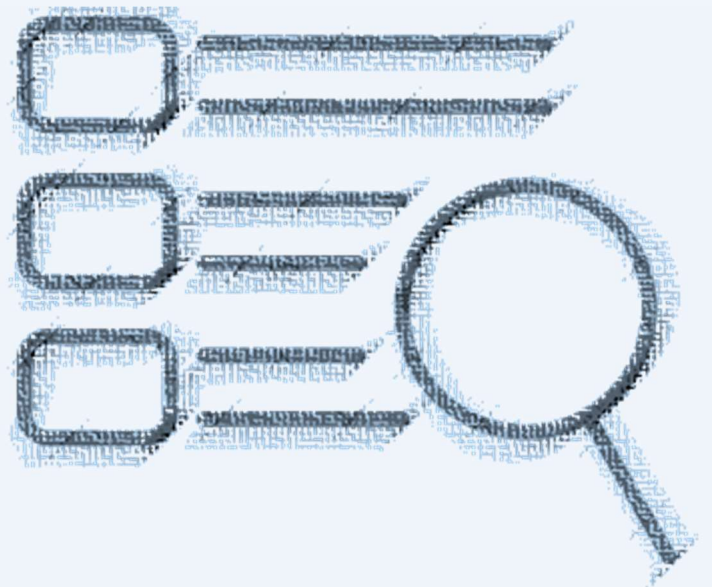
A **mis padres**, los cuales me han criado de la mejor manera posible. Muchas gracias a los dos por apoyarme en todo lo que he ido decidiendo a lo largo de mi vida. Papá, gracias por ser un ejemplo de dedicación y trabajo duro. Mamá, gracias por tu amor infinito, por hacerme sentir siempre tu niño y por ser mi refugio en los momentos difíciles. No podría haber llegado hasta aquí sin vosotros.

Y, por último, a la persona más importante que tengo: **mi hermana**. Mi niña gracias por ser la hermana mayor, mi guía, y el mejor ejemplo a seguir que podría haber tenido. Eres un pilar fundamental en mi vida, que me anima a dar lo mejor de mí, sin duda la que más me ha reñido por entretenerme con cualquier cosa. Y muchas gracias también a **Ignacio**, que tiene la suerte de tenerte a su lado... y el que tiene una gran paciencia para aguantarte;) Te quiero mucho Lore. ¡Qué suerte la mía de compartir esta vida contigo!

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Instituto Carlos III (ISCIII) – Fondo de Investigación en Salud (PI20/01577) cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) del Fondo de la Comisión Europea “*A way of making Europe*”; por el ISCIII RICORS programa RICORS2040 (Enfermedad Renal, RD21/005/0029) financiado por la Unión Europea – NextGenerationEU; por el Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia (MRR), por la Comunidad de Madrid (2022/BMD-7223 – CIFRA-COR-CM) y por los Grupos UCM - Santander (UCM-951579).

Diego San Felipe Riba ha sido financiado con un contrato predoctoral de personal investigador en formación de la Universidad Complutense de Madrid y el Banco Santander (CT63/19-CT64/19).

ÍNDICE



ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN / ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN	7
1. Procesamiento de la información visual	9
1.1. La retina	12
1.1.1. Poblaciones gliales de la retina	15
1.2. Núcleos de relevo de la vía visual	20
1.2.1. Colículo superior (CS)	23
1.2.2. Núcleo geniculado lateral (NGL)	26
1.2.3. Corteza visual primaria (V1)	29
1.2.4. Poblaciones gliales en los núcleos cerebrales	31
2. Sepsis	32
2.1. Fisiopatología de la sepsis	34
2.2. Afectación del SNC por la sepsis	36
2.3. Modelos animales de sepsis	38
2.4. Manejo y tratamiento de la sepsis	43
3. Malaria	45
3.1. Ciclo y transmisión de la malaria	45
3.2. Complicaciones clínicas y fisiopatología de la malaria	46
3.3. Afectación del SNC por la malaria	52
3.3.1. Malaria cerebral (MC)	52
3.3.2. Retinopatía malárica (RM)	52
3.4. Modelos animales de malaria	53
3.5. Diagnóstico y manejo de la malaria	58
4. Cilastatina	60
4.1. Protección de la cilastatina frente al FRA	61
4.2. Potencial acción protectora de la cilastatina en el SNC	63
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	69
1. Animales de experimentación	71
2. Tratamiento farmacológico	72
3. Diseño experimental	72
3.1. Modelo 1: Modelo animal de sepsis	72
3.2. Modelo 2: Modelo animal de malaria	73
3.2.1. Evaluación de la parasitemia	74
4. Valoraciones bioquímicas	75
5. Tomografía de coherencia óptica	76
6. Obtención y procesamiento de las muestras de tejido para los estudios inmunohistoquímicas	77
7. Análisis inmunohistoquímicos	80
8. Inmunofluorescencia	82

9. Análisis cuantitativo	83
9.1. Espesor de la retina: datos obtenidos en la TCO	83
9.2. Cuantificación de los marcadores celulares	85
9.2.1. Estudio inmunohistoquímico de la retina	85
9.2.2. Estudio inmunohistoquímico de los núcleos de relevo	87
10. Análisis estadísticos	92
V. RESULTADOS	93
1. Resultados: Modelo animal de sepsis	95
1.1. Peso corporal y valoraciones bioquímicas	95
1.2. Estudio <i>in vivo</i> de la retina: TCO	98
1.3. Estudio inmunohistoquímico de la retina	100
1.3.1. Análisis de las células ganglionares de la retina (células Brn3a ⁺)	100
1.3.2. Análisis de las poblaciones macrogliales de la retina (células GFAP ⁺) ...	102
1.3.3. Análisis de las células microgliales de la retina (células Iba1 ⁺)	106
1.4. Estudio de inmunofluorescencia de la retina	111
1.5. Estudio inmunohistoquímico de los núcleos de relevo de la vía visual	114
1.5.1. Análisis de las células neuronales (células NeuN ⁺)	114
1.5.2. Análisis de las células macrogliales (células GFAP ⁺)	116
1.5.3. Análisis de las células microgliales (células Iba1 ⁺)	118
2. Resultados: Modelo animal de malaria	122
2.1. Parasitemia y valoraciones bioquímicas	122
2.2. Estudio inmunohistoquímico de la retina	124
2.2.1. Análisis de las células ganglionares de la retina (células Brn3a ⁺)	124
2.2.2. Análisis de las poblaciones macrogliales de la retina (células GFAP ⁺)...	126
2.2.3. Análisis de las células microgliales de la retina (células Iba1 ⁺)	130
2.3. Estudio de inmunofluorescencia de la retina	135
2.4. Estudio inmunohistoquímico de la los núcleos de relevo de la vía visual	138
2.4.1. Análisis de las células neuronales (células NeuN ⁺)	138
2.4.2. Análisis de las células macrogliales (células GFAP ⁺)	140
2.4.3. Análisis de las células microgliales (células Iba1 ⁺)	142
VI. DISCUSIÓN	147
1. Discusión: Modelo animal de sepsis	149
2. Discusión: Modelo animal de malaria	160
3. Análisis del potencial efecto terapéutico de la cilastatina	168
4. Limitaciones y perspectivas futuras	173
VII. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	177
VIII. BIBLIOGRAFÍA	181
IX. ANEXO I	209

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Principales diferencias entre la retina de humano y la de roedores
- Tabla 2.** Escala para la evaluación del fallo orgánico relacionado con la sepsis
- Tabla 3.** Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la administración de LPS en el cerebro de los roedores.
- Tabla 4.** Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la administración de LPS en la retina de roedores.
- Tabla 5.** Prevalencia, características y complicaciones de las especies de *Plasmodium* que infectan a humanos
- Tabla 6.** Componentes y productos bioactivos del parásito
- Tabla 7.** Aplicaciones de los modelos animales de malaria
- Tabla 8.** Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la inoculación de *P. berghei* en el cerebro de ratones
- Tabla 9.** Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la inoculación de *P. berghei* en la retina de ratones
- Tabla 10.** Principales resultados de nuestro grupo en relación con los mecanismos de acción propuestos para cilastatina en el ámbito de la nefrotoxicidad
- Tabla 11.** Principales resultados de nuestro grupo en relación con los potenciales efectos terapéuticos de cilastatina en el SNC
- Tabla 12.** Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos
- Tabla 13.** Anticuerpos empleados en los análisis de inmunofluorescencia
- Tabla 14.** Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Brn3a⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis
- Tabla 15.** Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis
- Tabla 16.** Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en la retina interna, retina externa y en las diferentes capas retinianas en un modelo animal de sepsis
- Tabla 17.** Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis
- Tabla 18.** Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas capas de la retina y del porcentaje de la evaluación de los morfotipos en un modelo animal de sepsis.

Tabla 19. Resultados de la colocalización de los receptores NLRP3 y TLR4 con diferentes poblaciones celulares en las retinas de un modelo animal de sepsis

Tabla 20. Principales resultados estadísticos del análisis de los morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis

Tabla 21. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Brn3a⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

Tabla 22. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

Tabla 23. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en la retina interna, retina externa y en las diferentes capas retinianas

Tabla 24. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

Tabla 25. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas capas de la retina y del porcentaje de la evaluación de los morfotipos en un modelo animal de malaria

Tabla 26. Resultados de la colocalización de los receptores NLRP3 y TLR4 con diferentes poblaciones celulares en las retinas de un modelo animal de malaria

Tabla 27. Principales resultados estadísticos del análisis de los morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de la vía visual en un modelo animal de malaria

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomía del ojo humano
- Figura 2.** Estructura macroscópica de la retina
- Figura 3.** Áreas anatómicas de la retina
- Figura 4.** Esquema de la retina de mamíferos
- Figura 5.** Células macrogliales de la retina de rata
- Figura 6.** Células microgliales de la retina de ratón
- Figura 7.** Esquema del campo visual en roedores y primates
- Figura 8.** Esquema de la vía visual
- Figura 9.** Esquema de la vía visual en roedores
- Figura 10.** Esquema de la organización del colículo superior y organización topográfica de las aferencias que recibe
- Figura 11.** Proyecciones de las células ganglionares de la retina hacia los principales núcleos retinoreceptores en roedores
- Figura 12.** Microfotografías de los tipos celulares del colículo superior identificados mediante tinción con *Lucifer Yellow*
- Figura 13.** Estructura anatómica y funcional del núcleo geniculado lateral en roedores
- Figura 14.** Esquema de los tipos celulares del núcleo geniculado lateral dorsal
- Figura 15.** Aferencias y eferencias del núcleo geniculado lateral dorsal en roedores
- Figura 16.** Esquema del sistema visual de roedores
- Figura 17.** Esquema de las neuronas de la corteza visual primaria
- Figura 18.** Incidencia de la sepsis en 2017 estandarizada por edad para ambos sexos
- Figura 19.** Mecanismos moleculares en el desarrollo de la sepsis
- Figura 20:** Afectación multiorgánica
- Figura 21.** Rutas de afectación del sistema nervioso central en la sepsis
- Figura 22.** Ciclo vital del parásito *Plasmodium* en el mosquito y en el humano
- Figura 23.** Proporciones de las complicaciones en los pacientes con malaria grave por *P. falciparum*
- Figura 24.** Comparación de los signos encontrados en la retina y en el cerebro de niños con MC
- Figura 25.** Alteraciones producidas en la retina en un modelo de RM por *P. berghei ANKA* en ratones
- Figura 26.** Estructura química de la cilastatina

Figura 27. Mecanismo de entrada del imipenem a las células epiteliales del túbulo renal y acción de cilastatina

Figura 28. Diseño experimental del modelo de sepsis, Modelo 1

Figura 29. Diseño experimental del modelo de malaria, Modelo 2

Figura 30. Extracción de los tejidos utilizados en los análisis

Figura 31. Esquema del procesamiento de las muestras: corte en el criostato y selección de las áreas de estudio

Figura 32. Núcleos de relevo de interés de la vía visual

Figura 33. Áreas descritas en el análisis por TCO

Figura 34. Esquema de la retina en el análisis del espesor total de la retina por TCO

Figura 35. Esquema de la retina en el análisis del espesor de la capa de fibras por TCO

Figura 36. Análisis por conteo de las células Brn3a⁺ en la retina

Figura 37. Análisis por densitometrado del marcaje de la GFAP en la retina

Figura 38. Análisis por conteo de las células Iba1⁺ en la retina

Figura 39. Análisis por densitometrado del marcador NeuN en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 1

Figura 40. Análisis por densitometrado del marcador NeuN en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 2

Figura 41. Análisis por densitometrado del marcador GFAP en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 1

Figura 42. Análisis por densitometrado del marcador GFAP en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 2

Figura 43. Análisis por conteo de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual.

Figura 44. Análisis del peso corporal

Figura 45. Parámetros para la evaluación de la función renal

Figura 46. Análisis de la retina mediante TCO

Figura 47. Expresión de células Brn3a⁺ en la retina completa en un modelo animal de sepsis

Figura 48. Expresión de células Brn3a⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis

Figura 49. Expresión del marcador GFAP en la retina completa en un modelo animal de sepsis

Figura 50. Expresión del marcador GFAP en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis.

Figura 51. Expresión del marcador GFAP en las capas de la retina y en la retina interna y externa en un modelo animal de sepsis

- Figura 52.** Expresión de células Iba1⁺ en la retina completa en un modelo animal de sepsis.
- Figura 53.** Expresión de células Iba1⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis
- Figura 54.** Expresión de células Iba1⁺ en las capas de la retina y evaluación de su morfología en un modelo animal de sepsis
- Figura 55.** Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 en las células Brn3a⁺ en un modelo animal de sepsis
- Figura 56.** Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de TLR4 en las células GFAP⁺ en un modelo animal de sepsis
- Figura 57.** Expresión de células NeuN⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis.
- Figura 58.** Expresión de células NeuN⁺ en la V1 externa e interna en un modelo animal de sepsis
- Figura 59.** Expresión de células GFAP⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis
- Figura 60.** Expresión de células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis
- Figura 61.** Morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis
- Figura 62.** Parámetros fisiopatológicos
- Figura 63.** Expresión de células Brn3a⁺ en la retina completa en un modelo animal de malaria
- Figura 64.** Expresión de células Brn3a⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria
- Figura 65.** Expresión del marcador GFAP en la retina completa en un modelo animal de malaria
- Figura 66.** Expresión del marcador GFAP en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria
- Figura 67.** Expresión del marcador GFAP en las capas de la retina y en la retina interna y externa en un modelo animal de malaria
- Figura 68.** Expresión de células Iba1⁺ en la retina completa en un modelo animal de malaria
- Figura 69.** Expresión de células Iba1⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria
- Figura 70.** Expresión de células Iba1⁺ en las capas de la retina y evaluación de su morfología en un modelo animal de malaria

Figura 71. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 en las células Brn3a⁺ en un modelo animal de malaria

Figura 72. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de TLR4 en las células GFAP⁺ en un modelo animal de malaria

Figura 73. Expresión de células NeuN⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria

Figura 74. Expresión de células NeuN⁺ en la V1 en un modelo animal de malaria

Figura 75. Expresión de células GFAP⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria

Figura 76. Expresión de células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria

Figura 77. Morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria

Anexo I. Figura A1. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 y TLR4 en los grupos control de los modelos animales empleados

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Áreas de la retina

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

Capas de la retina

- **MLI:** membrana limitante interna
- **CFNO:** capa de fibras del nervio óptico
- **CCG:** capa de células ganglionares
- **CPI:** capa plexiforme interna
- **CNI:** capa nuclear interna
- **CPE:** capa plexiforme externa
- **CNE:** capa nuclear externa
- **MLE:** membrana limitante externa
- **SE:** segmento externo de los fotorreceptores
- **EPR:** epitelio pigmentario de la retina

Morfotipos microgliales de la retina

- **RD:** radial
- **HZ:** horizontal
- **VT:** vertical

A

- **AS:** anemia severa
- **AS1:** área sectorial 1
- **AS2:** área sectorial 2
- **ASC:** proteína tipo *speck* asociada a la apoptosis que contiene CARD

B

- **BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro
- **BHE:** barrera hematoencefálica
- **BHR:** barrera hematorretiniana
- **Brn3a:** homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3

C

- **C0:** área central
- **CD:** cluster de diferenciación (CD31, CD36; CD200)
- **CD200R:** receptor del CD200
- **CDs:** células dendríticas
- **CGRs:** células ganglionares de la retina
- **CIL:** cilastatina
- **CLP:** ligadura y punción cecal
- **Crea:** creatinina
- **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*
- **CV:** corteza visual
- **CX3CL1:** fractalquina
- **CX3CR1:** receptor de fractalquina

D

- **DAMPs:** patrones moleculares asociados a daño
- **D.E.:** desviación estándar
- **D.O.:** densidad óptica
- **DHP-I:** enzima dehidropeptidasa I / **DPEP1:** *dipeptidase 1*

E

- **ECG:** electroencefalograma
- **EE:** endofalmitis endógena
- **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- **EPCR:** receptor de proteína C endotelial
- **ERG:** electroretinograma
- **ERNs:** especies reactivas del nitrógeno
- **EROs:** especies reactivas del oxígeno

F

- **FasL:** ligando de Fas
- **FasR:** receptor de Fas
- **FRA:** fracaso renal agudo

G

- **G:** global
- **GDNF:** factor neurotrófico derivado de las células gliales
- **GFAP:** proteína ácida fibrilar glial
- **GPI:** glucosilfosfatidilinositol
- **GR:** glóbulos rojos
- **GRI:** glóbulos rojos infectados

H

- **Hb:** hemoglobina

I

- **Iba1:** molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado
- **ICAM1:** molécula de adhesión intracelular 1
- **IL:** interleuquina
- **IL-1 β :** interleuquina 1 beta
- **IF:** inmunofluorescencia
- **IFN:** interferón`
- **iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible
- **i.p.:** intraperitoneal
- **i.v.:** intravenoso
- **i.vt.** intravítreo

K

- **KIM-1:** molécula de lesión renal 1

L

- **LPS:** lipopolisacárido

M

- **MB:** membrana de Bruch
- **MAL:** malaria
- **MC:** malaria cerebral
- **MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1
- **MyD88:** molécula adaptadora con dominio de muerte de mieloide 88

N

- **NeuN:** proteína de unión a hexaribonucleótidos-3
- **NF- κ B:** factor nuclear kappa B
- **NGL:** núcleo geniculado lateral
 - **NGLd:** núcleo geniculado lateral dorsal
 - IGL: intergeniculado lateral
 - NGLv: núcleo geniculado lateral ventral
- **NLR:** receptor tipo NOD
- **NLRP3:** dominio pirina 3 de la familia NLR
- **NO:** nervio óptico
- **NOD:** dominio de oligomerización por unión de nucleótidos
- **ns:** no significativo
- **NUS:** nitrógeno ureico en sangre

O

- **OATs:** transportadores de aniones orgánicos
- **ODS:** objetivos de desarrollo sostenible

- **OMS:** Organización Mundial de la Salud

P

- **p:** p-valor
- **PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PFA:** paraformaldheído
- **PfEMP1:** proteína 1 de la membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*
- **PIO:** presión intraocular
- **PRR:** receptor de reconocimiento de patrones

R

- **RM:** retinopatía malárica o palúdica
- **ROIs:** regiones de interés

S

- **SAE:** encefalopatía asociada a la sepsis
- **SDRA:** síndrome de distrés respiratorio agudo
- **SNC:** sistema nervioso central
- **SNpc:** sustancia negra *pars compacta*
- **SOFA:** evaluación de fallo orgánico relacionado con la sepsis

T

- **TA:** temperatura ambiente
- **TCs:** neuronas talamocorticales
- **TCO:** tomografía de coherencia óptica
- **TFG:** tasa de filtración glomerular
- **TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta
- **TI:** tampón de inmunohistoquímica
- **TLR:** receptor tipo *Toll*
- **TLR4:** receptor tipo *Toll 4*
- **TNFα:** factor de necrosis tumoral alpha

U

- **UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos

V

- **V1:** corteza visual primaria
- **VCAM1:** molécula de adhesión vascular 1
- **VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular
- **VH:** vehículo

RESUMEN

ABSTRACT



ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN MODELOS DE FRACASO MUTIORGÁNICO. BÚSQUEDA DE NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.

En la presente Tesis Doctoral se han seleccionado dos patologías, sepsis y malaria, causadas por agentes infecciosos diferentes (bacterias mayoritariamente en la sepsis y parásitos del género *Plasmodium* en la malaria) que cursan con un fracaso multiorgánico que afecta, en sus manifestaciones más graves, al Sistema Nervioso Central (SNC), causando en algunos casos, déficits en la función visual. Son patologías con una elevada incidencia a nivel mundial, y para las que, en la actualidad no existen tratamientos eficaces para las alteraciones provocadas en el SNC. Nuestro grupo de investigación ha profundizado en los posibles mecanismos de nefroprotección de la cilastatina (CIL), y ha demostrado sus propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias en la retina en un modelo experimental de glaucoma. Por ello, en la presente Tesis Doctoral, nos planteamos la hipótesis de que, en patologías sistémicas como la sepsis o la malaria, existe un daño inflamatorio y neuronal en la vía visual, tanto en la retina como en los principales núcleos de relevo: colículo superior (CS), núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) y corteza visual primaria (V1). Además, en este estudio CIL podría ser un prometedor agente terapéutico en el tratamiento de las alteraciones descritas en el SNC. Con el fin de dar respuesta a esta hipótesis nos planteamos como primer objetivo caracterizar el daño inflamatorio y neuronal en la vía visual en dos modelos en roedores: un modelo de sepsis inducido por una única administración de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), y un modelo de malaria inducido por la inoculación del parásito *Plasmodium berghei* ANKA (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.). En ambos casos, como segundo objetivo, se planteó evaluar la eficacia de la CIL (150 mg/kg, i.p.) en la prevención y/o reversión del daño inducido: en el caso del modelo de sepsis, se realizó una administración concomitante única de CIL, mientras que, en el modelo de malaria, CIL se administró durante 6 días.

En el modelo animal de sepsis encontramos una marcada disminución del peso corporal junto con una alteración de la función renal a corto plazo (24 h). En este modelo, se realizó una evaluación preliminar *in vivo* de la retina mediante tomografía de coherencia óptica, y se observó un incremento del grosor de esta en las zonas más próximas al nervio óptico (NO), indicativo de un posible edema. Los análisis inmunohistoquímicos demostraron que el LPS redujo el marcaje de Brn3a de las células ganglionares de la retina (CGRs), principalmente en el área nasal inferior; aumentó los niveles de expresión de GFAP; e incrementó el número de células microgliales, promoviendo además su activación hacia

un morfotipo migratorio horizontal. En los núcleos de relevo de la vía visual, el LPS provocó una reducción en la expresión de NeuN; un aumento de los morfotipos microgliales reactivos en los tres núcleos; y un incremento de GFAP en el CSy la V1. En el modelo animal de malaria observamos un aumento gradual de la parasitemia (9%, el día 6 postinfección), una reducción en la concentración de hemoglobina en sangre, y un incremento en los niveles de creatinina sérica. En la retina, la inoculación del parásito disminuyó el marcador Brn3a, principalmente en el área central inferior; provocó un aumento en la expresión de GFAP en casi todas las áreas; e indujo un incremento del número de células microgliales, más marcado en la región central, junto con una mayor presencia del morfotipo migratorio vertical. En los principales núcleos de relevo de la vía visual hemos demostrado una disminución del marcador NeuN, un incremento de la expresión de GFAP, y un aumento del porcentaje de morfotipos microgliales reactivos en los tres núcleos de estudio.

La administración de CIL, *per se*, no mostró efectos muy marcados en los parámetros analizados. En el modelo animal de sepsis fue capaz de atenuar la pérdida de peso, pero en el modelo de malaria no logró corregir ni la parasitemia ni la reducción en los niveles de hemoglobina en sangre. En ambos modelos demostró sus propiedades nefroprotectoras, así como propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias. En el modelo de sepsis, aunque no fue capaz de atenuar el edema, sí logró mitigar los daños observados en la retina. Encontramos efectos similares en ambos modelos animales, en los que la administración de CIL logró revertir el daño neuronal en la retina, principalmente en las áreas más afectadas, impidió la activación macroglial; y atenuó el aumento en el número de células microgliales, en especial en las zonas próximas al NO. De forma complementaria, en la retina de ambos modelos, se describió la presencia del receptor TLR4 en las células GFAP⁺ (astrocitos y/o pies vítreos de las células de Müller), y la expresión de NLRP3 en las CGRs, como una propuesta preliminar de un posible mecanismo de acción tanto para el daño inducido como para la CIL. Confirmamos este papel protector de CIL en los diferentes núcleos de relevo de la vía visual, al evaluar la expresión de NeuN, y su capacidad para revertir la activación macroglial, aunque solo lograrse atenuar el grado de activación de las células microgliales en el modelo de sepsis.

Nuestros hallazgos muestran que la administración de CIL atenúa el daño neuronal y disminuye la activación glial, evidenciando su capacidad neuroprotectora y antiinflamatoria, al menos en dos modelos animales de patología de fallo multiorgánico. Aunque es necesario profundizar en los mecanismos moleculares por los que CIL ejerce estas acciones, CIL emerge como un novedoso abordaje terapéutico en el tratamiento de alteraciones del SNC de múltiple etiología.

INVESTIGATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFLAMMATORY RESPONSE IN ANIMAL MODELS OF MULTIORGAN FAILURE SEARCH FOR NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES

In this Doctoral Thesis we have selected two pathologies, sepsis and malaria, caused by different infectious agents (mainly bacteria in sepsis and parasites of the *Plasmodium* genus in malaria) that cause multiorgan failure affecting, in their most severe manifestations, the Central Nervous System (CNS) and sometimes showing deficits in visual function. These pathologies have a high worldwide incidence, and no effective treatment for the related CNS alterations are available at present. Our research group has extensively investigated the possible nephroprotective mechanisms of cilastatin (CIL), and we have more recently demonstrated its neuroprotective and anti-inflammatory properties in the retina, in an experimental model of glaucoma. Therefore, in the present Doctoral Thesis, we hypothesized inflammatory and neuronal damages in the whole visual pathway, from the retina and through main relay nuclei: superior colliculus (SC), dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and primary visual cortex (V1), in these two systemic pathologies (sepsis or malaria). Furthermore, CIL could emerge as a promising therapeutic agent in the treatment of these CNS alterations.

For that purpose, we established two general objectives: to characterize the inflammatory and neuronal damage in the visual pathway in two rodent models, one model of sepsis induced by a single administration of lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg, i.p.), and another model of malaria induced by the inoculation of the parasite *Plasmodium berghei* ANKA (10^6 infected red blood cells, iRBCs, i.p.); and to evaluate the efficacy of CIL (150 mg/kg, i.p.) in preventing and/or reversing the induced damage: a single concomitant dose of CIL was administered in the sepsis model, while CIL was administered for a total of 6 days in the malaria model.

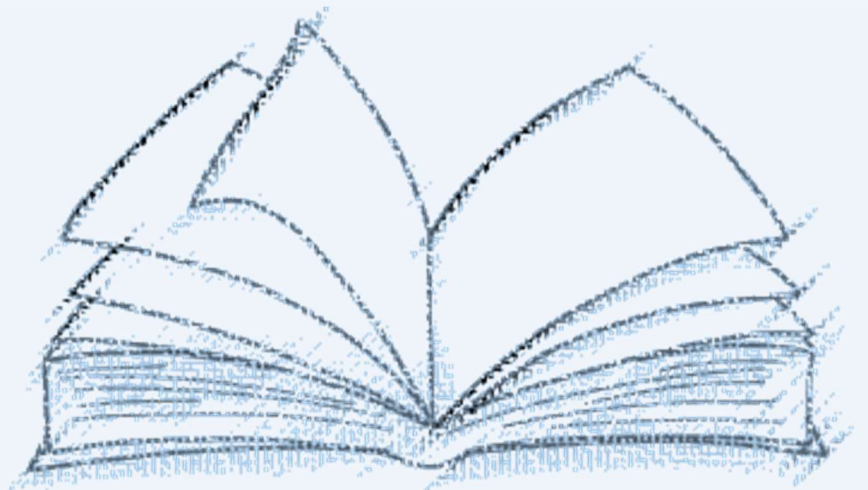
On the one hand, in the animal model of sepsis, we found a decrease in body weight together with a short-term (24 h) impairment of renal function. In a preliminary *in vivo* evaluation performed by optical coherence tomography (OCT), we found an increase in retinal thickness, in the areas closest to the optic nerve (ON), indicative of a possible oedema. Immunohistochemical analysis showed that LPS administration reduced Brn3a expression, that is, the presence of Retinal Ganglion Cells (RGCs), mainly in the inferior nasal area; increased GFAP expression levels; and increased the number of microglial cells, promoting their activation towards a horizontal migratory morphotype. In the main relay nuclei of the visual pathway, LPS caused a reduction in NeuN expression; an increase in

reactive microglial morphotypes in all three nuclei; and an increase in GFAP in the CS and V1. On the other hand, in the animal model of malaria, we observed a gradual increase in parasitaemia (9%, on day 6 post-infection), a reduction in blood haemoglobin levels, together with an increase in serum creatinine levels. In the retina, parasite inoculation decreased Brn3a expression, mainly in the central inferior area; caused an increase in GFAP expression in almost all areas; and augmented the number of microglial cells, more markedly in the central region, promoting the presence of the vertical migratory morphotype. In the main relay nuclei of the visual pathway, we demonstrated a decrease in the NeuN marker, an increase in GFAP expression, and an increase in the percentage of reactive microglial morphotypes in all three study nuclei.

The administration of CIL, *per se*, did not importantly modify the parameters analysed. In the sepsis animal model, CIL was able to attenuate weight loss, but, in the malaria model, it failed to correct either parasitaemia or the reduction in blood haemoglobin levels. In both models, it demonstrated nephroprotective properties, as well as neuroprotective and anti-inflammatory properties. In the sepsis model, although it was not able to attenuate the reported oedema, it was able to mitigate the damage observed in the retina. We found similar effects in both animal models, in which the administration of CIL was able to reverse neuronal damage in the retina, mainly in the most affected areas, prevent macroglial activation, and attenuate the increase in the number of microglial cells, especially in areas close to the NO. In addition, in the retina of both models, we described the presence of TLR4 receptor in GFAP⁺ cells (astrocytes and/or vitreous feet of Müller cells), and the expression of NLRP3 in RGCs, as a preliminary proposal of a potential mechanism of action for both the induced damage and CIL. We confirmed this protective role of CIL in the different relay nuclei of the visual pathway by assessing the expression of NeuN, and its ability to reverse macroglial activation, although it only attenuated the state of microglial cell activation in the sepsis model.

Our findings show that CIL administration attenuates neuronal damage and decreases glial activation, providing further evidence for its neuroprotective and anti-inflammatory properties, in, at least, these two animal models of multi-organ failure. Despite additional research is needed to dilucidate the molecular underlying mechanisms by which CIL exerts its actions, CIL emerges as a novel therapeutic approach in the treatment of CNS disorders of multiple aetiology.

INTRODUCCIÓN



1. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISUAL

El sistema visual desempeña un papel crucial en la percepción del entorno, nos permite determinar el tamaño, la forma, el color y la distancia a la que se encuentran los objetos, incluso si están o no en movimiento (Augustine *et al.*, 2023). La vía visual está constituida por una serie de estructuras que pertenecen al sistema nervioso central (SNC) y que son las encargadas de procesar e integrar la información visual recibida. Está formada por la retina, una serie de núcleos de relevo y por la corteza visual. La retina posee las células receptoras sensoriales, los fotorreceptores, que transducen la energía electromagnética en una señal electroquímica que se transmite, procesa e integra por los diferentes tipos de células retinianas hasta llegar a las células ganglionares de la retina (CGRs). Las CGRs, si la información que reciben es excitatoria, generarán potenciales de acción que transmitirán, vía sus axones y por el nervio óptico (NO), a las siguientes células de los núcleos de relevo de la vía visual, en los cuales se continuará el procesado de la información visual (Kandel *et al.*, 2013; Grossniklaus *et al.*, 2015; Augustine *et al.*, 2023).

El ojo está formado por varias estructuras macroscópicas (**Fig.1A**), muy similares en humanos y roedores, que están encargadas de asegurar la correcta llegada de la información lumínica del exterior a las células receptoras sensoriales de la retina. (Zeiss *et al.*, 2017; Augustine *et al.*, 2023). Las estructuras desde el exterior al interior son:

- **Párpados:** que protegen, limpian y lubrican la superficie ocular.
- **Córnea:** tejido epitelial avascular transparente que constituye la primera lente del ojo, a través de la cual entrará la luz en el mismo. Se continúa con la esclerótica.
- **Esclerótica:** capa de tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno que se inicia en los límites de la córnea y continua hasta la parte posterior del ojo. Protege al ojo de daños mecánicos y a ella se unen los músculos extraoculares.
- **Cámara anterior:** situada entre la córnea y el iris, está rellena del **humor acuoso** que proporciona nutrientes y oxigena las estructuras del globo ocular carentes de aporte sanguíneo, como la córnea y el cristalino. Es producido en el cuerpo ciliar, cuyas células epiteliales regulan su producción y composición, y secretado a través de los procesos ciliares. El humor acuoso se drena hacia la circulación sanguínea principalmente en la zona del ángulo iridocorneal, donde atraviesa la malla trabecular y el canal de Schlemm llegando al seno venoso (**Fig.1B**).
- **Iris:** ubicado entre el humor acuoso y el cristalino. Está compuesto por dos capas de músculo liso, una circular (músculo constrictor pupilar) y otra longitudinal (músculo dilatador pupilar) que rodean la **pupila**. La función del iris es regular la

entrada de luz a la retina mediante la modificación del tamaño pupilar, determinado por las capas musculares y controlado por el sistema nervioso autónomo.

- **Cuerpo ciliar:** situado entre el iris y la zona de la *ora serrata*. En su estroma se encuentra el músculo ciliar, al cual se anclan las fibras zonulares del ligamento suspensorio del cristalino, 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.
- **Cámara vítrea:** situada entre el cristalino y la retina, contiene el **humor vítreo**, líquido gelatinoso y transparente que ocupa el 80% del volumen del ojo. Ayuda a mantener la forma del ojo, la posición del cristalino y a que la retina neural permanezca en contacto con el epitelio pigmentario de la retina.
- **Retina:** epitelio neurosensorial situado a continuación de la *ora serrata*, entre el humor vitreo y la coroides. En la retina neural se encuentran las células responsables de la fototransducción, y es donde se inicial el procesamiento de la información visual. En la retina no neural se encuentra el epitelio pigmentario.
- **Coroides:** 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.

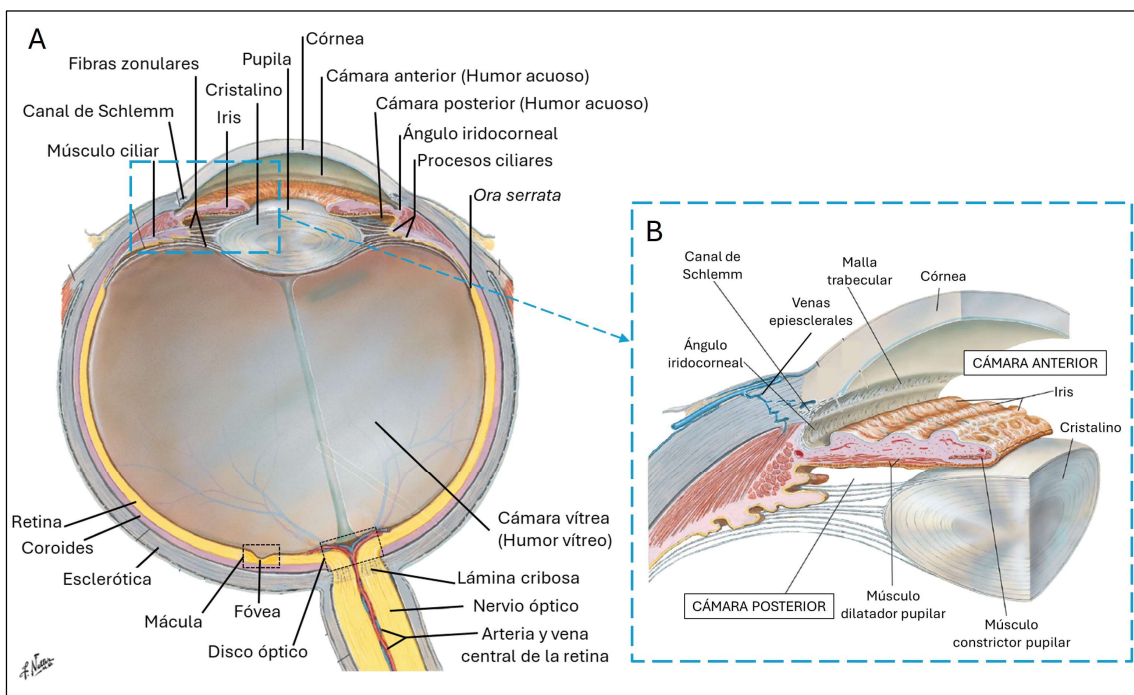


Figura 1. Anatomía del ojo humano. (A) Esquema de las estructuras macroscópicas en una sección de ojo humano. **(B)** Detalle del segmento anterior del ojo. Tomado de Zeiss *et al.*, 2017 y modificado.

La luz incide sobre la córnea, atraviesa la cámara anterior del ojo y por la pupila, llega al cristalino y a través de la cámara posterior del ojo, incide en la retina. La estructura macroscópica de la retina permite distinguir una serie de zonas (**Fig.2**). La **mácula** es una región circular situada en el centro de la retina. En humanos, la mácula presenta una zona denominada **fóvea** donde la densidad de conos es máxima y está implicada en la visión del color y en la agudeza visual. En roedores no existe ni mácula ni fóvea, sólo una zona de la retina no excavada, con mayor densidad de conos, que podría ser similar a la mácula humana. El **disco o papila óptica**, es la zona por la que los axones de las CGRs abandonan la retina para formar el NO, está región carece de fotorreceptores por lo que constituye el “punto ciego” de la retina. El disco óptico, además, es la zona de entrada y salida de la vascularización retiniana (Kandel *et al.*, 2013; Grossniklaus *et al.*, 2015; Zeiss *et al.*, 2017; Augustine *et al.*, 2023).

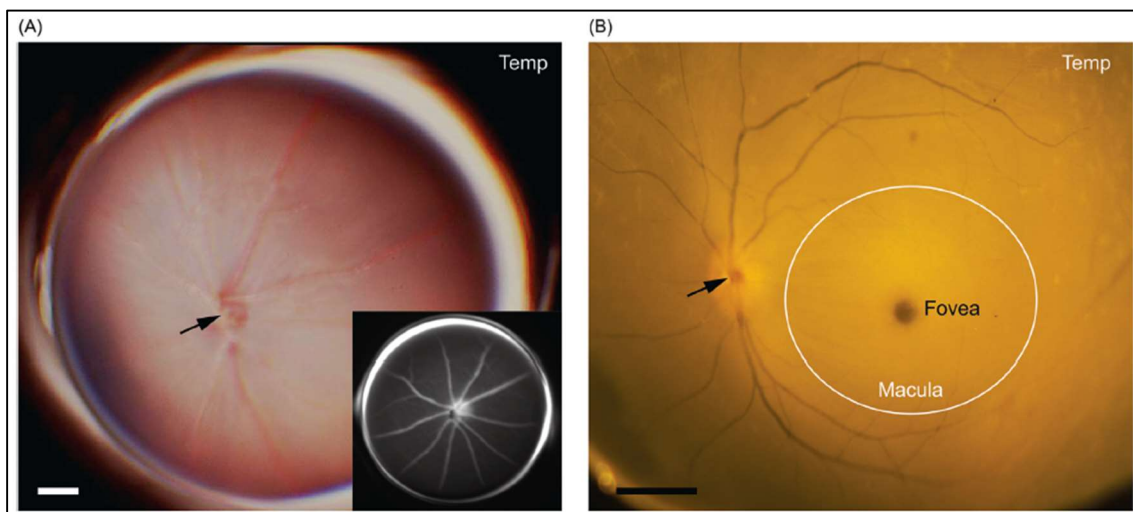


Figura 2. Estructura macroscópica de la retina. (A) Roedor (ratón). Los roedores nocturnos como el ratón y la rata carecen de mácula y además presentan una vasculatura radial entorno al nervio óptico (señalado con una flecha). Barra de aumentos 50 μm . Se muestra un detalle de la vascularización retiniana realizado por una angiografía con fluoresceína. (B) Primate (*Macaco Rhesus*). En el caso de los primates y los humanos, los vasos sanguíneos surgen del disco óptico localizado en la parte nasal de la retina (señalado con una flecha), y se extienden en forma de abanico hacia la zona temporal. En el centro podemos observar una zona avascular, la mácula (indicada con un círculo blanco), en cuyo centro aparece un punto negro que es la fóvea. Escala: 1 mm. Temp: Región Temporal. Tomado de Zeiss *et al.*, 2017.

La retina, desde el punto de vista anatómico, se subdivide en 9 áreas (ver **Fig.3**; Fernández-Albarral *et al.*, 2021b; Martínez-López *et al.*, 2024) determinadas por 3 regiones en el plano horizontal; nasal (N), central (C) y temporal (T); y 3 zonas en el plano vertical: superior (S), central (C) e inferior (I). Lo anterior determina un total de 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).

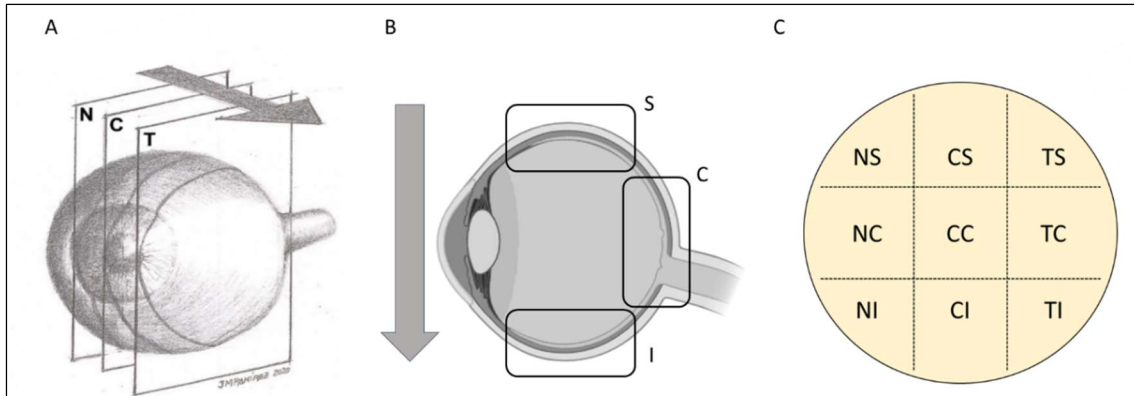


Figura 3. Áreas anatómicas de la retina. (A) División en el eje horizontal en tres regiones: nasal (N), central (C) y temporal (T). Tomado de Fernández-Albarral *et al.*, 2021b. (B) División en el eje vertical en tres zonas: superior (S), central (C) e inferior (I). Esquema tomado de Biorender.com. (C) Áreas anatómicas resultantes de la división de la retina en ambos ejes: 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).

1.1. LA RETINA

La retina presenta una compleja estructura microscópica organizada en capas interconectadas en las que se alternan capas celulares y capas de sinapsis denominadas plexiformes, y presenta dos membranas limitantes. La organización estructural de la retina y sus diferentes tipos celulares ya fue descrita en los primeros estudios del Dr. Santiago Ramón y Cajal (**Fig. 4A**). Es importante destacar que, aunque en la actualidad la nomenclatura se ha modificado en parte, la estructura en capas y los tipos celulares se han mantenido desde sus primeras descripciones.

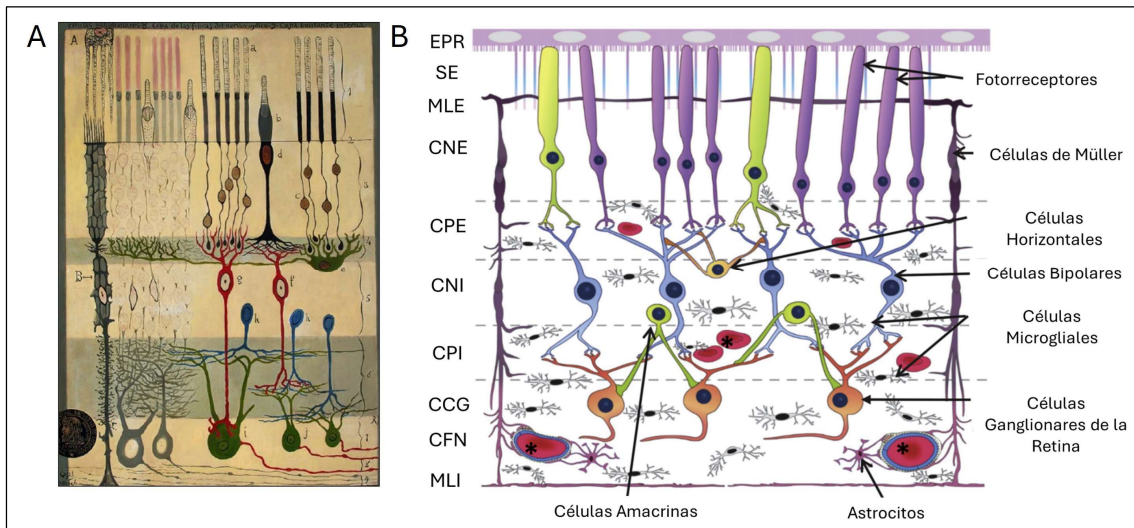


Figura 4. Esquema de la retina de mamíferos. (A) Esquema realizado por el Dr. Santiago Ramón y Cajal. Tomado de Ramón y Cajal, 1899. (B) Esquema de la estructura microscópica de la retina, se muestran las capas y tipos celulares. La retina se organiza en varias capas que, desde la más externa hacia la más interna son: epitelio pigmentario de la retina (EPR), segmento externo de los fotorreceptores (SE), membrana limitante externa (MLE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG), capa de fibras del nervio óptico (CFNO) y membrana limitante interna (MLI). Tomado de Rathnasamy *et al.*, 2019 y modificado.

Las capas (**Fig.4B**) ordenadas desde la retina externa (más próxima a la coroides) hacia la retina interna (más próxima al humor vítreo) (para más información consultar: Kandel et al., 2013; Augustine et al., 2023) son:

- **Epitelio pigmentario de la retina (EPR):** se encuentra entre la coroides y la capa de fotorreceptores. Está formado por las células pigmentarias que presentan una elevada concentración de melanina, y que están en contacto con el segmento externo de los fotorreceptores. Esta capa pertenece a la retina no neural y forma parte de la **barrera hematorretiniana (BHR)**, por lo que contribuye a la homeostasis retiniana; otras funciones a destacar son la de evitar la refracción de la luz, realizar el reciclado del ftopigmento de los fotorreceptores y nutrir a la retina neural.
- **Capa de fotorreceptores:** en esta capa se encuentran los segmentos externos de los fotorreceptores (**SE**), en los que se localizan los pigmentos fotosensibles que comienzan el proceso de la fototransducción.
- **Membrana limitante externa (MLE):** formada por las prolongaciones ventriculares o apicales de las células de Müller, células macrogliales de la retina; y las uniones celulares, *zonulae adherens*, entre los fotorreceptores y las células de Müller.
- **Capa nuclear externa (CNE):** formada por los somas de las células fotorreceptoras y la prolongación interna de las mismas. Son los encargados de la fototransducción y transmiten la información a las células bipolares y/o horizontales y/o interplexiformes. Hay dos tipos: los **conos** que poseen un segmento externo cónico, y los **bastones** que tienen un segmento externo de forma cilíndrica.
- **Capa plexiforme externa (CPE):** formada por las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y/o las células horizontales.
- **Capa nuclear interna (CNI):** formada por los somas de las células de Müller y por las **células horizontales**, las **células bipolares**, las **células interplexiformes**, las **células amacrinas** y las CGRs desplazadas. Las células bipolares reciben la información de los fotorreceptores y la transmiten a las CGRs. Las células horizontales, interplexiformes y amacrinas modulan las sinapsis entre fotorreceptores, bipolares y CGRs.
- **Capa plexiforme interna (CPI):** formada por las sinapsis entre las células bipolares y/o amacrinas con las CGRs.
- **Capa de células ganglionares (CCG):** formada por los somas de las CGRs, y de las amacrinas desplazadas. Las CGRs son las encargadas de integrar la información

visual y transmitirla a través de sus axones, los cuales se agrupan y abandonan la retina formando el **nervio óptico (NO)** hacia el resto de los núcleos de la vía visual.

- **Capa de fibras del nervio óptico (CFNO):** formada por los axones de las CGRs y es la capa con mayor vascularización.
- **Membrana limitante interna (MLI):** formada la terminación de la prolongación vítrea de las células de Müller y separa la retina del humor vítreo.

En la retina encontramos 5 tipos de células que, desde la retina externa hacia la retina interna son (**Fig. 4B**) (Augustine *et al.*, 2023):

- **Células fotorreceptoras:** hay dos poblaciones que se diferencian tanto por su morfología como por su función: bastones y conos. Los **bastones** son los mayoritarios y presentan una elevada sensibilidad a la luz, lo que les hace fundamentales para la visión nocturna. Los **conos** son menos numerosos, concentrándose principalmente en la zona de la fovea en humanos; tienen una menor sensibilidad a la luz, pero ofrecen una mayor capacidad de resolución espacial, siendo los responsables de la percepción del color y de la agudeza visual.
- **Células horizontales:** establecen conexiones con los fotorreceptores y las células bipolares, y están implicadas en procesos de inhibición lateral.
- **Células bipolares:** conectan los fotorreceptores con las CGRs y las amacrinas. Encontramos dos tipos diferentes: células bipolares “ON” o de centro encendido que se despolarizan ante estímulos luminosos y las “OFF” o de centro apagado que se hiperpolarizan en respuesta a la luz.
- **Células amacrinas:** grupo heterogéneo de células a nivel morfológico y funcional. Sinaptan con las células bipolares y con las CGRs, modulando la información entre estos tipos celulares, y están implicadas en mecanismos de inhibición lateral.
- **Células ganglionares de la retina (CGRs):** constituyen una población celular muy diversa en los mamíferos, se han descrito según las especies entre 20 y 46 tipos diferentes en base a su morfología, su función y a los marcadores moleculares que expresen; aunque se pueden clasificar en cuatro grandes grupos. Las CGR M o magnocelulares que están especializadas en la detección del movimiento, entre otras funciones; las CGR P o parvocelulares que intervienen en la discriminación del color y la percepción de la profundidad, entre otras funciones; y las CGR no M-no P que participan en el procesamiento de información del color. Existe otro pequeño porcentaje de CGRs, las denominadas intrínsecamente fotosensibles,

que contienen altas concentraciones del pigmento melanopsina, y están implicadas en la regulación de los ritmos circadianos y del reflejo pupilar. En humanos, los núcleos pueden estar en más de una capa, mientras que en los roedores los somas celulares se disponen en una monocapa conformando la CCG.

Las diferentes poblaciones celulares retinianas presentan marcadores específicos que permiten identificarlas. En la presente Tesis Doctoral para analizar la población de CGRs, se ha empleado uno de los marcadores más utilizados para su estudio, el factor de transcripción Brn3a (homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3, del inglés: *Brain specific homeobox 3a*). Los niveles de expresión del marcador están ligados con el estado de viabilidad y funcionalidad de las CGRs; se ha demostrado que una disminución de su expresión puede indicar que la célula presente una reducción de su capacidad funcional e incluso que esté comenzando un proceso de daño celular que podría llegar a producir la apoptosis celular (Xiang *et al.*, 1995; Nadal-Nicolás *et al.*, 2009).

1.1.1. Poblaciones gliales de la retina

En la retina también encontramos células gliales que desempeñan un papel crucial, entre otros, en el correcto mantenimiento de la homeostasis, en la inmunidad retiniana, en la transmisión de las señales nerviosas, y en la neuroprotección (Vecino *et al.*, 2016; Muthuswamy *et al.*, 2021). Existen dos grandes poblaciones: las células macrogliales y las células microgliales.

Las **células de macroglía** de la retina son los astrocitos y las células de Müller (**Fig.5**). Están implicados en funciones como: el mantenimiento de la citoarquitectura de la retina; la regulación de la homeostasis, el reciclaje de neurotransmisores; la formación y el mantenimiento de la integridad de la BHR; el aporte metabólico; y la inmunidad retiniana, entre otras. La macroglía produce importantes factores tróficos esenciales para la supervivencia de las células de la retina como el factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), el factor neurotrófico derivado de las células gliales (*Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*, GDNF) o el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (de Hoz *et al.*, 2016; Vecino *et al.*, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2020).

Los **astrocitos** (**Fig.5B**) están únicamente en retinas vascularizadas. En situación fisiológica, en mamíferos se localizan en las capas más internas de la retina en la CFNO y CCG. Al formar parte de la BHR sirven de intermediarios entre las células retinianas y el resto de los compartimentos del ojo; permiten la entrada de nutrientes y la salida de los

productos de deshecho generados; la homeostasis de líquidos, de iones, del pH y de los neurotransmisores; además intervienen en la regulación del metabolismo celular. También están implicados en la señalización celular y en las sinapsis; así como en el mantenimiento inmunitario de la retina. En la retina humana se han observado dos morfologías diferentes, un morfotipo estrellado y otro elongado, mientras que en roedores con retinas vascularizadas solo se ha descrito el morfotipo en forma de estrella (Ramírez *et al.*, 1994; Ramírez *et al.*, 2010; de Hoz *et al.*, 2016; Muthuswamy *et al.*, 2021). Las **células de Müller (Fig.5A)** representan el 90% de las células gliales de la retina. Es una clase de glía radial, sus somas celulares se encuentran en la CNI, mientras que extienden sus prolongaciones a lo largo de todas las capas de la retina, desde el borde más interno (en contacto con el vítreo, formando la MLI) hasta el final de la CNE (formando la MLE), en su recorrido contactan con las células adyacentes, con los vasos sanguíneos y con el humor vítreo. Gracias a su forma y a las uniones estrechas que crean, las células de Müller son esenciales para el mantenimiento estructural de las capas de la retina y de la BHR (Ramírez *et al.*, 1994; de Hoz *et al.*, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2020; Muthuswamy *et al.*, 2021). Además, ayudan al mantenimiento de la homeostasis, al metabolismo celular, modulan la actividad neuronal e intervienen en el reciclaje y síntesis de determinados neurotransmisores (Reichenbach & Bringmann, 2010).

Existen diferentes marcadores para el análisis de las poblaciones macrogliales y entre los más empleados se encuentra la proteína ácida fibrilar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP), componente mayoritario de los filamentos intermedios (Bignami *et al.*, 1972; Eng, 1985; Vecino *et al.*, 2016; Muthuswamy *et al.*, 2021). Este marcador se expresa en situación fisiológica en los astrocitos, mientras que las células de Müller pueden expresar algo de marcaje en la CPE (Fernández-Sánchez *et al.*, 2015; Reichenbach & Bringmann, 2020). Las células de Müller expresan otros marcadores como la vimentina o la glutamina sintasa (Fernández-Albarral *et al.*, 2022).

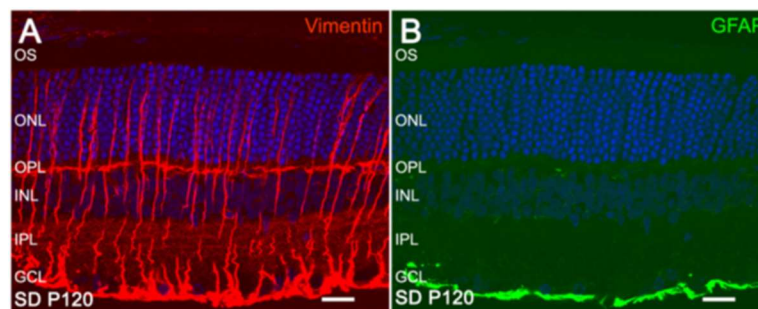


Figura 5. Células macrogliales de la retina de rata. (A) Células de Müller y astrocitos marcados con vimentina (rojo), se puede observar cómo las células de Müller atraviesan todas las capas de la retina. (B) Astrocitos marcados con GFAP (verde), localizados en la capa de células ganglionares (CCG). El marcaje de los núcleos celulares se realizó con el marcador TO-PRO3 (azul). Barra de aumentos: 20 μm . OS: segmento externo de los fotorreceptores; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. Vimentina: vimentina; GFAP: proteína ácida fibrilar glial. Tomada de Fernández-Sánchez *et al.*, 2015.

Las **células microgliales (Fig.6)** forman parte del sistema de inmunidad innata del SNC. En condiciones fisiológicas en la retina están en las capas CPI, CPE, CCG y CFNO y son una población heterogénea de células que realizan una función de inmunovigilancia protectora, pues pueden desplazarse, presentar antígenos y fagocitar productos metabólicos y restos celulares (Kettenmann *et al.*, 2013). Además, junto con las células macrogliales, intervienen en el mantenimiento de la homeostasis y de las sinapsis, y en la liberación de factores neurotróficos que contribuyen a la plasticidad y a la supervivencia neuronal, por lo que ayudan a la reparación, la remodelación sináptica y la neurogénesis (Kettenmann *et al.*, 2013; Vecino *et al.*, 2016; Muthuswamy *et al.* 2021; Murenu *et al.*, 2022). Uno de los marcadores más utilizados para el análisis de las células microgliales es la proteína citoplasmática Iba1 (molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; del inglés, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) (Ito *et al.*, 1998; Vecino *et al.*, 2016; Muthuswamy *et al.*, 2021).

Las células microgliales en condiciones fisiológicas presentan un morfotipo radial (RD), es una microglía ramificada con un soma pequeño y con las prolongaciones en todas las direcciones principalmente (Murenu *et al.*, 2022; Martínez-López *et al.*, 2024), que está en constante movimiento controlando con sus prolongaciones el microambiente que les rodea (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Reichenbach & Bringmann, 2020; Murenu *et al.*, 2022). Las células nerviosas, en situación fisiológica, expresan la glicoproteína transmembrana CD200 (del inglés, *Cluster of Differentiation 200 ligand*) la cual al unirse al receptor CD200R (del inglés, *Cluster of Differentiation 200 receptor*) presente en la superficie de las células de microglía, lo cual evita su activación y hace que se mantenga el morfotipo RD (Langmann, 2007; Rathnasamy *et al.*, 2019; Reichenbach & Bringmann, 2020).

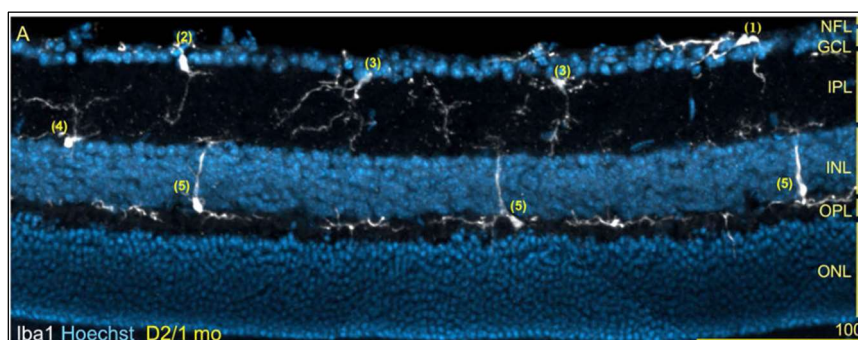


Figura 6. Células microgliales de la retina de ratón. Los somas de las células microgliales se disponen en las capas más internas de la retina (CFNO, CCG) y en las capas plexiformes (CPI, CPE). Las células microgliales se marcaron con Iba1 (blanco), y los núcleos celulares con Hoechst (azul). Barra de aumentos: 100 μ m. ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras del nervio óptico. Tomada de Bosco *et al.*, 2011.

Los astrocitos y las células microgliales activadas pueden presentar, según el tipo de daño y el tiempo de duración del mismo, dos fenotipos: un fenotipo proinflamatorio

(neurotóxico) o bien un fenotipo antiinflamatorio, inmunoregulador (neuroprotector) (Tang & Le, 2016; Liddelow *et al.*, 2017). El fenotipo que adquieren los astrocitos y las células microgliales, también depende de las señales que reciben de otras células y de la comunicación entre ambas poblaciones (consultar: Yang & Zhou, 2019; Kwon & Koh, 2020). Los fenotipos proinflamatorios liberan al medio, entre otros: citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, especies reactivas del oxígeno (EROs), óxido nítrico, proteasas y prostaglandinas. Estos mediadores incrementan la neuroinflamación y la neurotoxicidad, al atraer y activar otras células gliales y del sistema inmune, lo que inicia un circuito de retroalimentación positiva proinflamatoria, denominado **gliosis reactiva**. En sus etapas iniciales, tiene un papel neuroprotector dirigido a reducir el daño; sin embargo, si se cronifica en el tiempo puede ser perjudicial aumentando la patogénesis de la enfermedad como se ha observado en muchas patologías retinianas como el glaucoma, la retinitis pigmentosa, la retinopatía diabética o la degeneración macular (de Hoz *et al.*, 2016; Silverman & Wong, 2018). Por el contrario, los fenotipos antiinflamatorios secretan al medio, entre otros, interleuquinas (IL) antiinflamatorias como la IL-4 o la IL-10, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (del inglés, *Transforming growth factor beta*, TGFβ); que van a promover la liberación de más mediadores antiinflamatorios y neuroprotectores, contribuyendo a finalizar la neuroinflamación e iniciar la reparación del tejido (para revisión consultar Yang & Zhou, 2019; Kwon & Koh, 2020).

La activación de los astrocitos, astrogliosis, implica que se desplacen al lugar del daño, aumenten su número (proliferación) y el tamaño de sus prolongaciones (hipertrofia); e incrementen la expresión de proteínas como GFAP (Shinozaki & Koizumi, 2021). En las etapas iniciales del daño, la astrogliosis es beneficiosa pues los astrocitos tienen una mayor tasa metabólica, producen mayores niveles de factores neuroprotectores y ayudan a restaurar los niveles de neurotransmisores; además, son esenciales para la reparación de la BHR y la remodelación del tejido dañado mediante la eliminación de células muertas y restos celulares. Sin embargo, si se cronifica en el tiempo su activación, contribuyen a la neuroinflamación ya que aumentan el estrés oxidativo, secretan citoquinas proinflamatorias, y gran cantidad de quimioquinas, que aumentan la atracción de células inmunes al sitio dañado, y pueden producir daño vascular y muerte neuronal (de Hoz *et al.*, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2020; Muthuswamy *et al.*, 2021). En el caso de las células de Müller al activarse se observa hipertrofia junto con una desregulación de marcadores como la vimentina, la glutamina sintasa y GFAP, aumentando su expresión (Wang & Wong, 2014; de Hoz *et al.*, 2016; Vecino *et al.*, 2016).

La activación de las células microgliales, microgliosis, se produce en respuesta a gran variedad de estímulos debido a que poseen una amplia variedad de receptores. Por ejemplo, las neuronas, en situación patológica, producen la quimioquina fractalquina (CX3CL1, del inglés, *C-X3-C motif ligand 1*) la cual se une al receptor microglial de la fractalquina CX3CR1 (del inglés, *C-X3-C motif receptor 1*) y contribuye a su activación, regulando las ramificaciones microgliales y su capacidad de migración. La microgliosis conlleva un cambio morfológico (ver apartado *Material y Métodos* para consultar la morfología de los diferentes morfotipos), pues las células pasan del morfotipo RD a uno migratorio horizontal (HZ) con las prolongaciones paralelas a las capas; y/o a uno migratorio vertical (VT), con las prolongaciones perpendiculares a las capas de la retina (Silverman & Wong, 2018; Martínez-López *et al.*, 2024). En algunos casos, es posible que la microglía activada pueda llegar a adoptar un morfotipo ameboide, que suele encontrarse en la CFNO (Kettenmann *et al.*, 2013). Además, las células de microglía reactivas aumentan su capacidad migratoria, proliferativa, fagocítica y de liberación de moléculas proinflamatorias y EROs (Langmann, 2007) que, a su vez, pueden inducir astrogliosis, muerte de CGR y vasoconstricción (Kettenmann *et al.*, 2013). Algunas de las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células microgliales activadas son la IL-1 β , la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor necrosis factor alpha*, TNF α) que estimulan a las células de Müller; y estas, una vez aumentan la producción de sustancias quimioatrayentes y de adhesión que facilitan la migración de la microglía por la superficie de las células de Müller (Wang *et al.*, 2011).

En la presente Tesis Doctoral se han empleado dos especies animales distintas, rata (*Rattus norvegicus*) en el modelo animal de sepsis, y ratón (*Mus musculus*) en un modelo animal de malaria; por ello es importante matizar algunas de las diferencias anatómicas, macroscópicas y microscópicas entre la retina humana y la de los roedores que ayudarán a la mejor comprensión de los siguientes apartados (ver **Tabla 1**). Destacar que en roedores el disco óptico no se encuentra en la zona nasal, si no que se encuentra más desplazado hacia la retina central; no se existe ni mácula ni fovea; al ser animales nocturnos, la mayoría de sus fotorreceptores son bastones y solamente poseen dos tipos de conos (visión dicromática). A pesar de estas diferencias, la retina de ambas especies es estructuralmente muy similar a la retina periférica humana, por lo que constituyen un modelo animal útil para el estudio de los efectos producidos por determinadas patologías sistémicas y/o del SNC relacionadas con la retina; además de para la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos (Zeiss *et al.*, 2017; Galindo-Romero *et al.*, 2022).

Tabla 1. Principales diferencias entre la retina de humano y la de roedores.

	Humanos	Roedores	Referencias	
Tamaño	23,5-25 mm	Ratón: 4 mm Rata: 6 mm	Zeiss <i>et al.</i> , 2017	
Macroestructura	Glándula Harderiana	Ausencia	Presencia	
	Ángulo iridocorneal	Ausencia	Presencia	
	Mácula	Presencia	Ausencia	
	Fóvea	Presencia	Ausencia	
	Disposición del NO	Localizado en la parte nasal del globo óptico	Centralizado	Zeiss <i>et al.</i> , 2017
Vascularización	En arcadas desde el NO	Radial desde NO		
Microestructura	Densidad y distribución de los fotorreceptores	Distribución homogénea, mayor concentración de conos en la mácula	Mayor densidad de fotorreceptores en las zonas nasal y temporal	
	Tipos de fotorreceptores	Menor proporción de bastones	Predominan los bastones (95%)	Zeiss <i>et al.</i> , 2017
	Densidad de CGRs	3 tipos (S, M y L)	2 tipos (S y M/L)	
	Disposición de CGRs	Visión tricromática	Visión dicromática	Dragër & Olsen, 1981
	Morfología de los astrocitos	Menor	Mayor	Zeiss <i>et al.</i> , 2017
Aferencias	Estrellado y elongado	Estrellado	de Hoz <i>et al.</i> , 2016	
Aferencias	60% de los axones decusan en el NO	95% de los axones decusan en el NO	Dhande & Huberman, 2014	
Campo visual	Mayor campo visual frontal (ojos dispuestos frontalmente)	Mayor campo visual (ojos dispuestos lateralmente)	Priebe & McGee, 2014	

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

1.2. NÚCLEOS DE RELEVO DE LA VÍA VISUAL

El procesamiento de la información visual comienza en la retina y, mediante los axones de las CGRs que forman el NO, se transmite a las diferentes áreas de procesamiento visual del SNC (Monavarfeshani *et al.*, 2017). El SNC de los mamíferos integra la información visual de los 2 ojos para conseguir la visión binocular y completa del campo visual (**Fig. 7**, Priebe & McGee, 2014; Read, 2021). El campo visual procesado por la retina de cada ojo, información monocular, se transmite por los axones de las CGRs hacia el **quiasma óptico**, en el cual parte de los axones decusan y enviarán información, mediante el **tracto óptico**, a áreas de la vía visual del hemisferio contralateral al ojo en el cual se encuentran; y otra parte no decusa y enviarán información al mismo hemisferio cerebral de la retina de la proceden. La posición de los ojos determina el porcentaje de axones que van a decusar en el quiasma óptico (Priebe & McGee, 2014; Kerschensteiner & Feller, 2024). En las especies animales con los ojos localizados frontalmente, como los primates, el número de proyecciones contra e ipsilaterales va a ser aproximadamente el mismo, en general: los axones de las CGRs de área nasal de la retina decusan en el quiasma transmitiendo la información de manera **contralateral**, mientras que los del área temporal van a proyectarse hacia los núcleos localizados en el mismo lado, de forma **ipsilateral** (Perry *et al.*, 1984; Priebe & McGee, 2014; Augustine *et al.*, 2023; Kerschensteiner & Feller, 2024), por lo que en estas especies hay un gran campo visual binocular (Priebe & McGee, 2014).

En otras especies como los roedores, debido a la lateralización de los ojos el campo de visión binocular es mucho menor y más del 95% de los axones del NO decusan en el quiasma óptico; y, en general, los axones que decusan pertenecen en su mayoría a CGRs situadas en las áreas nasal y central de la retina, mientras que las CGRs cuyos axones no decusan se encuentran en su mayoría en la zona de la creyente temporal de la retina (Kerschensteiner & Feller, 2024). Es importante destacar que, en la vía visual, existe una organización retinotópica, que permite mantener la información espacial del campo visual (Johnson & Triplett, 2021). Esta organización se inicia ya en el NO, determinada por la región de la retina en la cual se encuentra la CGR (Fitzgibbon & Reese, 1996) y se mantiene en el resto de las estructuras implicadas en el procesamiento de la información visual (Kerschensteiner & Feller, 2024).

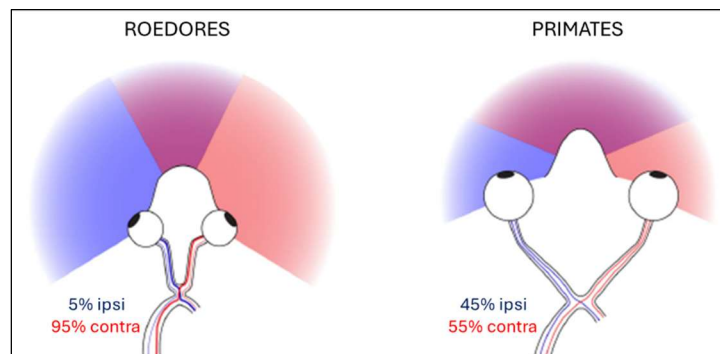


Figura 7. Esquema del campo visual en roedores y primates. Los roedores (izquierda) tienen los ojos lateralizados por lo que obtienen un mayor campo visual, aunque la mayoría es monocular (azul y rosa) y poseen un bajo campo de visión binocular (morado). La mayoría de las células ganglionares de la retina (CGRs), un 95%, decusan en el quiasma óptico y envían sus axones contralateralmente (contra) y solo un 4% lo hace de forma ipsilateral (ipsi). Los primates (derecha) poseen un menor campo visual, pero mayor rango de visión binocular (morado), lo cual se debe a la posición más frontal de los ojos. La mitad de las CGRs envían sus axones contralateralmente y la otra mitad ipsilateralmente. Tomado de Priebe & McGee, 2014 y modificado.

Las conexiones entre la retina y las áreas de la vía visual de procesamiento de la información han sido ampliamente estudiadas desde los trabajos del Dr. Santiago Ramón y Cajal (**Fig.8**). La estructura y los tipos celulares que describió inicialmente se han mantenido en gran parte, aunque la nomenclatura y subdivisiones anatómicas han cambiado parcialmente con el tiempo.

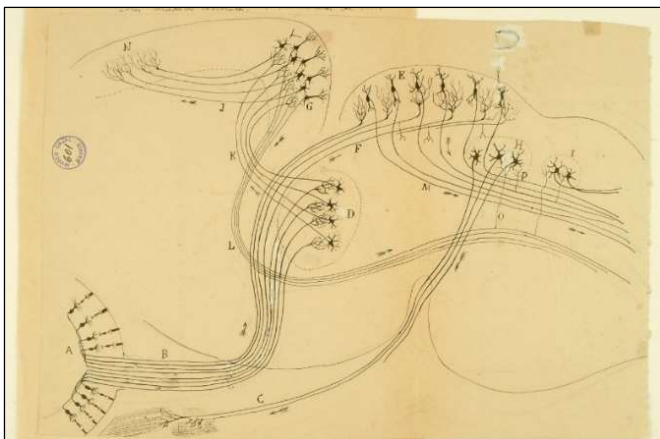


Figura 8. Esquema de la vía visual. Representación general de las relaciones de los centros ópticos y de la marcha de las corrientes. Tomado de Ramón y Cajal, 1899.

Los axones de las CGR tras el quiasma óptico forman el tracto óptico y se proyectan a diferentes áreas del SNC que constituyen el resto de la vía visual, en primates se han descrito más de 15 tipos de CGRs las cuales se proyectan a más de 20 regiones cerebrales (Kerschensteiner & Feller, 2024); mientras que en roedores la diversidad es mucho mayor, se han identificado más de 40 tipos de CGRs que inervan a más de 50 regiones cerebrales (**Fig.9A**; Lawrence & Studholme, 2014; Martersteck *et al.*, 2017; Monavarfeshani *et al.*, 2017). No obstante, la mayoría de los axones de las CGR en roedores (**Fig.9B**) se proyectan al **colículo superior (CS)** y al **núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd)** (Lawrence & Studholme, 2014; Ellis *et al.*, 2016; Martersteck *et al.*, 2017; Kerschensteiner & Feller, 2024); y muchos de los axones que llegan al NGLd son ramas colaterales de aquellos que también proyectan al CS (Kondo *et al.*, 1993). Las neuronas de segundo y tercer orden de los distintos núcleos de relevo de la vía visual envían información a la **corteza visual primaria (V1)** y desde ella a cortezas de nivel jerárquico superior (Erskine & Herreral, 2015).

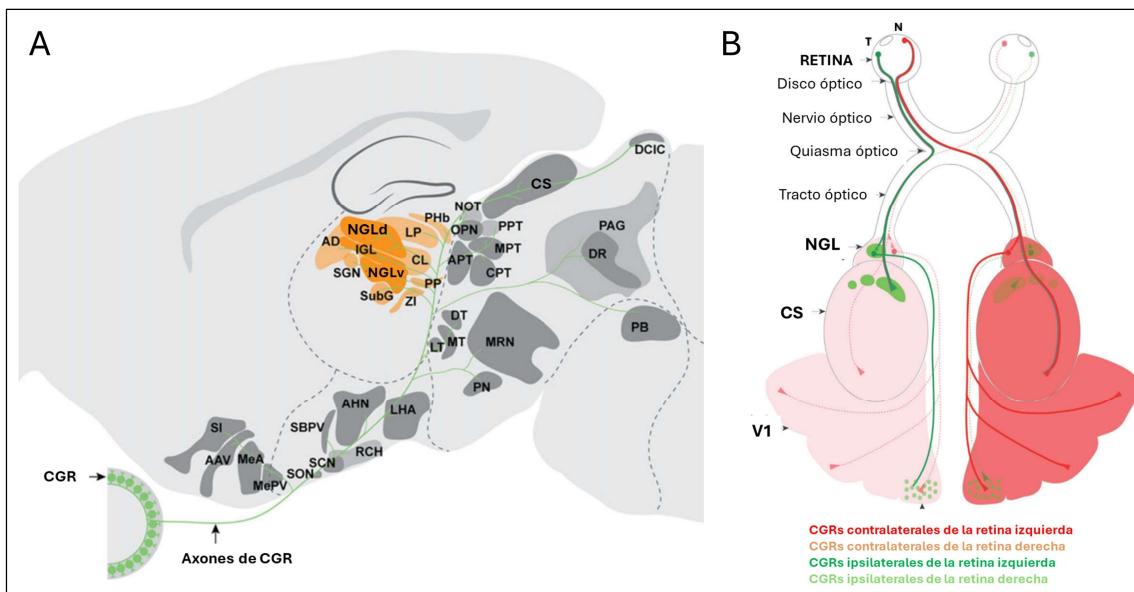


Figura 9. Esquema de la vía visual en roedores. (A) El esquema ilustra la amplia variedad y la distribución de los núcleos cerebrales inervados por las células ganglionares de la retina (CGR). Los núcleos retinorreceptores talámicos están coloreados en naranja; otras regiones retinorreceptoras están coloreadas en gris. NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; IGL, folículo intergeniculado; NGLv, núcleo geniculado lateral ventral, división externa; AD, núcleo talámico anterodorsal; LP, núcleo talámico lateral posterior; PHb, zona para-habenular; ZI, zona incierta; SubG, núcleo subgeniculado; SGN, núcleo supragenículado; 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 Monavarfeshani *et al.*, 2017 y modificado. (B) Los axones de las CGRs salen de esta a través del disco óptico, formando los nervios ópticos. En el quiasma óptico, los axones de las CGR de la retina temporal siguen una trayectoria ipsilateral, mientras que la mayoría de los axones de las CGR de la retina nasal y central decusan y continúan contralateralmente. Después del quiasma, a través de los tractos ópticos, los axones se dirigen a los principales núcleos de relevo de la vía visual en roedores: el colículo superior (CS) y el núcleo geniculado lateral (NGL). Las proyecciones ipsilaterales y contralaterales establecen patrones de conexión distintos en estos núcleos. Los axones ipsilaterales forman zonas de sinapsis localizadas en las porciones rostrales del NGL y CS (verde oscuro y claro), mientras que los axones contralaterales sinaptan en el resto del tejido (rojo y rosa). Las neuronas de segundo orden que surgen del CS y NGL transmiten la información hacia la corteza visual primaria (V1). T, temporal; N, nasal. Tomado de Erskine & Herreral, 2015 y modificado.

Los roedores nocturnos como la rata y el ratón son de gran utilidad para investigar todas las estructuras del SNC que participan en la visión, ya que, a pesar, de la lateralización ocular, y de la menor complejidad de sus estructuras; se observa una buena conservación de los circuitos involucrados en la transmisión de la información visual (Priebe & McGee, 2014; Sefton *et al.*, 2015). La presente Tesis Doctoral estudia los efectos de un modelo animal de sepsis y de un modelo animal de malaria en la retina, el CS y el NGLd, núcleos de relevo de la mayoría de las aferencias retinianas; así como en la V1, dónde envían información las neuronas de segundo y tercer 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.

1.2.1. Colículo superior (CS)

El **colículo superior (CS)** se encuentra localizado en la parte posterior del mesencéfalo. El CS en mamíferos posee una estructura laminada (**Fig.10**), que es muy similar en primates y roedores, en la que se distinguen tres capas o láminas principales, subdivididas, a su vez, en varias subcapas o subláminas, diferenciadas por patrones de distribución neuronal, conectividad sináptica y propiedades funcionales (Ito & Feldheim, 2018). Las capas principales son: capa superficial o superior (sCS), capa intermedia (iCS) y capa profunda o más interna (dCS) (Liu *et al.*, 2022). La sCS, denominada “capa visual” por algunos autores, incluye varias subláminas: (a) el *upper stratum griseum superficiale* (uSGS), que recibe información principalmente de las CGRs del ojo contralateral; (b) el *lower stratum griseum superficiale* (lSGS), que recibe información de ambos ojos, además de recibir señales de la corteza visual primaria y extraestriada (Lund, 1969); y (c) el *stratum opticum* (SO), que recibe información predominantemente de la corteza visual. Las capas iCS y dCS reciben información visual, somatosensorial y auditiva, así como aferencias de otras partes del SNC, como los ganglios basales y el cerebelo (Lee *et al.*, 2020). Las aferencias recibidas determinan que el CS sea una estructura sensoriomotora, que desempeña un papel crucial en la integración de respuestas visuales, auditivas y somatosensoriales y, si es necesario, inicie patrones motores. En roedores el CS está implicado, además en promover movimientos de defensa innatos y en respuestas de huida (Liang *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2015).

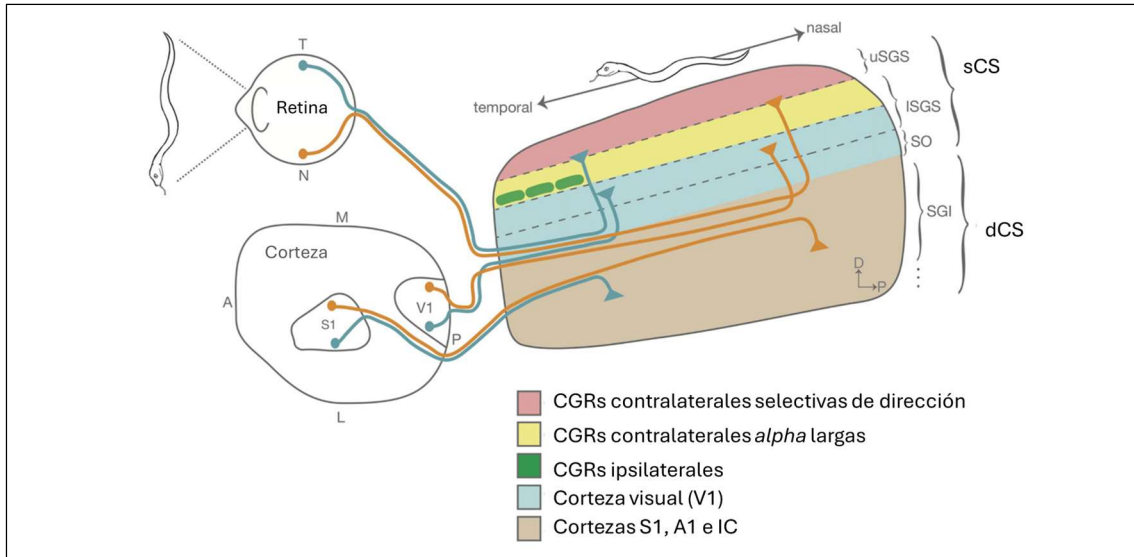


Figura 10. Esquema de la organización del colículo superior y organización topográfica de las aferencias que recibe. La imagen de una serpiente que estuviera en el campo visual a lo largo del eje nasal-temporal de la retina se representa topográficamente a lo largo del eje anteroposterior del colículo superior (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 profundo (dCS) también recibe entradas del tronco encefálico y de áreas corticales: se muestran las aferencias de la V1 (azul) y S1 (marrón). A, anterior; P, posterior; T, temporal; N, nasal; D, dorsal; M, medial; L, lateral; 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 superficiale* 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.

El número de axones de las CGRs que se proyectan al CS es una diferencia importante entre los roedores y los primates (Ito & Feldheim, 2018): en roedores la gran mayoría, entre un 85-90% de los axones llegan al CS (Salinas-Navarro *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2016), mientras que en primates tan solo un 10% se proyecta hacia este núcleo (Perry & Cowey, 1984). Las aferencias que recibe el CS de la retina presentan una organización ojo-específica (**Fig.11A**): en el CS se observa una gran inervación procedente de la retina contralateral en todas las capas; mientras que las ipsilaterales inerva regiones periféricas, y más profundas (Lawrence & Studholme, 2014; Martersteck *et al.*, 2017). Además, los axones de las CGRs mantienen una organización retinotópica en el CS (**Fig.11B**): los axones de las CGRs del eje naso-temporal de la retina se proyectan de forma caudo-rostral, en el CS; y los axones de las CGRs del eje dorso(superior)-ventral(inferior) de la retina se proyectan de forma latero-medial en el CS (Simon y O’Leary, 1991; Assali *et al.*, 2014; Ito & Feldheim, 2018, Kerschensteiner & Feller, 2024). La distribución topográfica de las proyecciones de las CGRs en el CS se ha demostrado que está relacionada con su función (**Fig.10**); por ejemplo, las CGR selectivas de selección envían información a las capas más superficiales del CS, mientras que las intrínsecamente fotosensibles y otros tipos de ganglionares no encargados en la detección del movimiento, la envían a las capas más profundas (Dhande & Huberman, 2014).

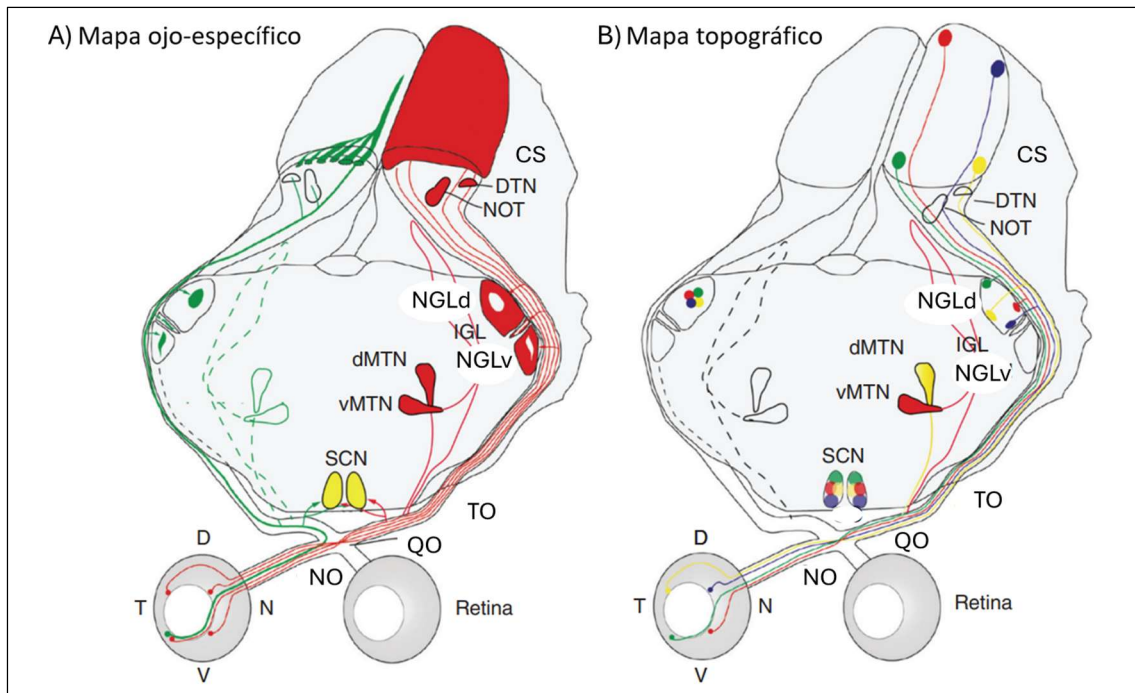


Figura 11. Proyecciones de las células ganglionares de la retina hacia los principales núcleos retinoreceptores en roedores. (A) Distribución de las proyecciones procedentes de la retina, ipsilateral (verde) y contralateral (rojo), hacia el núcleo geniculado lateral (NGL) y el colículo superior (CS). (B) Distribución topográfica de los axones contralaterales de la retina nasal (azul), temporal (verde), superior/dorsal (amarillo) e inferior/ventral (rojo); hacia el NGLd y el CS. NO, nervio óptico; QO, quiasma óptico; TO, tracto óptico; SCN, núcleo supraquiasmático; NGLv, núcleo geniculado lateral ventral; NGLd, 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 a nivel funcional encontramos dos grandes poblaciones neuronales: GABAérgicas inhibitorias, y glutamatérgicas excitatorias (para más información consultar Liu *et al.*, 2022). A nivel morfológico se han encontrado distintas poblaciones (**Fig.12**): horizontales, verticales (de campo ancho y de campo estrecho), marginales, piriformes y estrelladas (Edwards *et al.*, 2002; Sefton *et al.*, 2015).

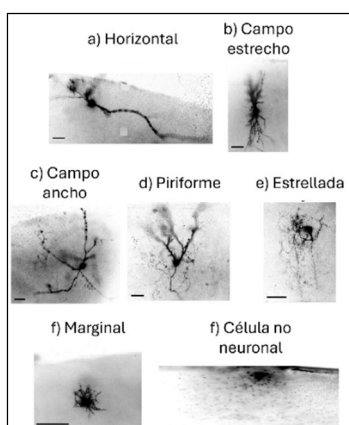


Figura 12. Microfotografías de los tipos celulares del colículo superior identificados mediante tinción con Lucifer Yellow. (A-F) Imágenes de los seis tipos celulares neuronales identificados en el colículo superior (CS): célula horizontal (a), célula vertical de campo estrecho (b), célula vertical de 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 μ m (G); 30 μ m (A-F). Tomado de Edwards *et al.*, 2002 y modificado.

En roedores, el CS inerva gran cantidad de núcleos cerebrales como: el núcleo reticular talámico, el núcleo subtalámico, la formación reticular del tronco encefálico y el pretectum. En el caso del NGL, se observa una conexión recíproca entre ambos núcleos (para más información consultar: Liu *et al.*, 2022).

1.2.2. Núcleo geniculado lateral (NGL)

El **núcleo geniculado lateral (NGL)** se localiza en el tálamo, recibe, procesa y transmite la información visual hacia las siguientes zonas de relevo (Monavarfeshani *et al.*, 2017). En roedores nocturnos gran parte de los axones del tracto óptico proyectan al NGL (**Fig.10 y Fig.11**). En el NGL de los primates se distinguen tanto morfológica como funcionalmente 6 capas y se mantiene la organización retinotópica: los axones de las CGRs de la retina nasal y central contralateral terminan en las capas 1, 4 y 6; y los de las CGRs de la retina temporal ipsilateral acaban en las capas 2, 3 y 5. La información visual a nivel del NGL es monocular, debido a la clara separación de las aferencias ipsi y contralaterales en las diferentes capas. Por otro lado, 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 (Augustine *et al.*, 2023).

El **NGL** de los roedores carece de una organización laminar y presenta 3 zonas (**Fig.13A**): **NGL dorsal (NGLd)**, intergeniculado lateral o intermedio (IGL) y NGL ventral (NGLv). El IGL y el NGLv tienen menor importancia en la transmisión de la información visual, aunque sí reciben aferencias de las CGRs y parecen estar implicados en funciones motoras asociadas a la información visual, en los ritmos circadianos, en funciones asociadas con los sistemas vestibular y ocular y, a pesar de que no envían información a la V1, sí que inervan otras áreas de la vía visual como el NGLd o el CS (para revisión consultar: Monavarfeshani *et al.*, 2017). El NGLd está muy implicado en el procesamiento de la información visual y es un núcleo de relevo entre la retina y la V1 (Erskine & Herreral, 2015; Monavarfeshani *et al.*, 2017).

En los roedores nocturnos se observa una organización espacial y funcional del NGLd que está determinada por: si las aferencias que recibe proceden de axones de las CGRs del ojo ipsilateral o de las del ojo contralateral (**Fig.13B**); del área de la retina (N, C o T; **Fig.13C**) en la que se encuentra la CGR de la cual recibe aferencias; así como por el tipo funcional de CGR de la cual reciben información (**Fig. 13D**) (Reese, 1988; Erskine & Herreral, 2015; Duménieu *et al.*, 2021). El NGLd recibe tan solo un 5-10% de proyecciones de CGRs ipsilaterales, que van a inervar en su mayoría una pequeña zona localizada en la parte dorsomedial del NGLd; mientras que las aferencias que proceden de CGR contralaterales inervan el resto del NGLd (**Fig.13B**) (Martersteck *et al.*, 2017; Monavarfeshani *et al.*, 2017; Duménieu *et al.*, 2021). Además, en el NGLd de roedores se pueden distinguir dos zonas diferentes (**Fig.13B**): *shell*, localizado en la parte dorsolateral;

y *core* localizado en la parte ventromedial, ocupando la mayor parte del NGLd (Reese, 1988; Martersteck *et al.*, 2017; Monavarfeshani *et al.*, 2017; Okigawa *et al.*, 2021). El *shell* recibe proyecciones de axones de CGRs contralaterales, mientras que al *core* llegan aferencias contra e ipsilaterales (Reese, 1988; Monavarfeshani *et al.*, 2017). En este núcleo, también existe una organización retinotópica determinada por el área de la retina (N, C, T) en la cual se encuentran las CGRs: los axones de las CGR de la retina T terminan principalmente en el NGLd en la parte superior; las de las CGR de C terminan en la zona medial del NGLd, y las que proceden de la retina N terminan en la porción inferior del NGLd (**Fig.13C**) (Monavarfeshani *et al.*, 2017). En cuanto a las proyecciones de las CGR de las zonas superiores se dirigen hacia la parte ventral del NGLd; mientras que proyecciones de las CGR de las zonas inferiores se proyectan hacia la superior/dorsal del NGLd (**Fig.11**) (Lund *et al.*, 1974; Assali *et al.*, 2014). Por último, las proyecciones que recibe el NGL también están organizadas espacialmente según el tipo funcional de CGRs de la cual la reciben (ver **Fig.13D**) (para revisión consultar: Monavarfeshani *et al.*, 2017 y Kerschensteiner & Guido, 2017).

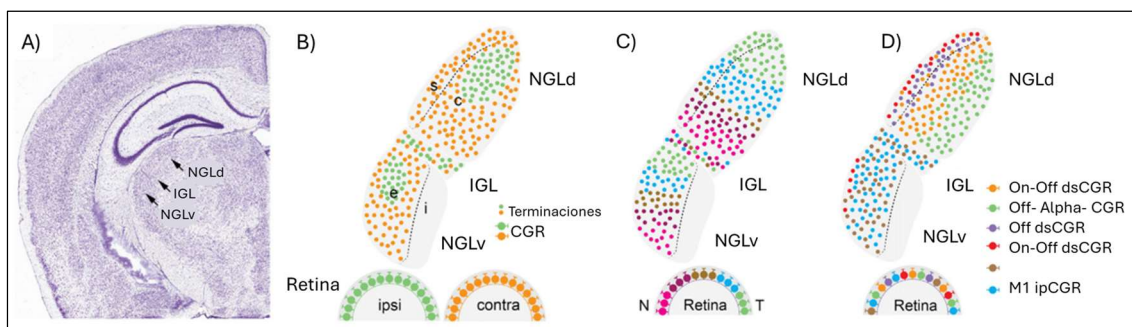


Figura 13. Estructura anatómica y funcional del núcleo geniculado lateral en roedores. (A) Sección coronal de un cerebro de ratón teñido con Nissl. El núcleo geniculado lateral (NGL) es uno de los núcleos talámicos, formado por tres zonas (indicadas por flechas): NGL dorsal (NGLd), intergeniculado lateral (IGL) y NGL ventral (NGLv). La imagen está tomada del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). (B) Representación esquemática de una sección coronal del NGL, que muestra la separación de las proyecciones procedentes de las CGR del ojo ipsilateral y del ojo contralateral, en el NGLd, IGL y NGLv. Las proyecciones de la retina contralateral (puntos naranjas) van a inervar prácticamente todo el NGLd, a excepción de una pequeña zona localizada en la parte dorsomedial que va a estar inervada por las proyecciones ipsilaterales (puntos verdes). La línea discontinua en el NGLd representa el límite aproximado que separa *shell* dorsolateral (s) del *core* ventromedial (c). La línea discontinua en NGLv representa el límite que separa la capa externa (e) de la capa interna (i). (C) Esquema de las terminaciones de los axones en el NGLd, NGLv e IGL, en función de la localización de las CGRs en la retina nasal (N) o temporal (T). Las CGRs nasales (puntos rosas y morados) inervan la zona ventral del NGLd mientras que las CGRs temporales (azules y verdes) inervan la zona dorsal del NGL. (D) Representación topográfica de las terminaciones de las CGRs, en función del tipo celular, en el NGLd, NGLv e IGL. Los puntos de colores de mayor tamaño representan algunos tipos de CGRs; mientras que los puntos pequeños coloreados en NGLd, IGL y NGLv 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 Monavarfeshani *et al.*, 2017 y modificado.

El NGLd contiene dos tipos principales de células: las neuronas talamocorticales (TCs) y las interneuronas (Kerschensteiner & Guido, 2017; Monavarfeshani *et al.*, 2017). Las células TCs se caracterizan por su morfología, presentando un axón grueso y no ramificado, un soma grande y redondo, y un complejo árbol dendrítico multipolar. En

roedores, existen tres tipos de células TCs (**Fig.14**; Krahe *et al.*, 2011): las bicónicas o tipo X, ubicadas en la región ventral que recibe axones del ojo contralateral; las simétricas o tipo Y, en la región central, en el *core*, que recibe aferencias de ambos ojos; y las hemisféricas o tipo W, localizadas en la región dorsal o *shell*, recibiendo proyecciones del ojo contralateral (Krahe *et al.*, 2011; Bickford *et al.*, 2015). Por otro lado, las interneuronas, con soma fusiforme y procesos sinuosos, están dispersas por todo el NGLd y forman conexiones inhibitorias únicamente con las células TCs (Kerschensteiner & Guido, 2017). Aunque ambas poblaciones reciben proyecciones retinianas, solo las TCs envían axones fuera del NGLd (Pinault, 2004).

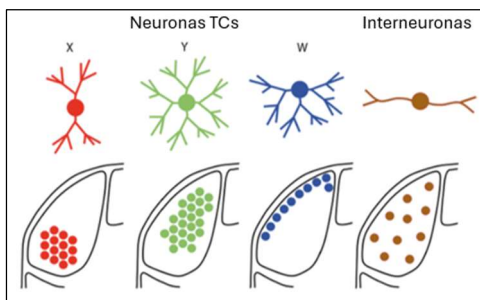


Figura 14. Esquema de los tipos celulares del núcleo geniculado lateral dorsal. Se distinguen dos grandes grupos celulares las talamocorticales (TCs) y las interneuronas (marrón) que muestran arquitecturas dendríticas distintas y se localizan en zonas específicas de esta estructura. Las TCs a su vez se subdividen en bicónicas (X, rojo), simétricas (Y, verde), y hemisféricas (W, azul). Tomado de Kerschensteiner & Guido, 2017 y modificado.

El NGLd recibe referencias tanto retinianas como no retinianas, lo que le permite procesar y modular la información visual antes de enviarla a otras áreas corticales; recibe una gran cantidad de proyecciones de áreas como la V1, el CS y el núcleo reticular talámico, entre otras (**Fig.15A**) (Monavarfeshani *et al.*, 2017; Duménieu *et al.*, 2021; Okigawa *et al.*, 2021). Las proyecciones eferentes (**Fig.15B**) de las células TCs del NGLd se dirigen a la V1 y al núcleo reticular talámico, con una organización topográfica: así en el ratón, la región *core* del NGLd proyecta principalmente a la capa IV, relacionada con la formación de imágenes; mientras que la región *shell* proyecta a las capas superficiales (I-II), transmitiendo información sobre el movimiento (Monavarfeshani *et al.*, 2017).

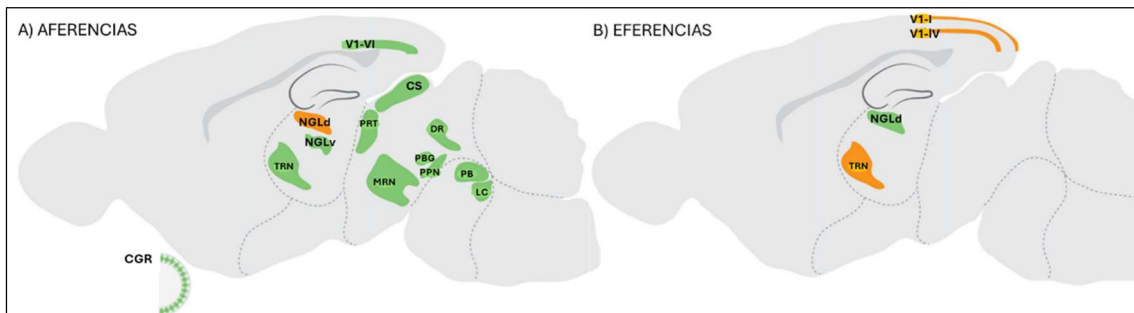


Figura 15. Aferencias y eferencias del núcleo geniculado lateral dorsal en roedores. (A) Aferencias. El núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd, naranja) recibe aferencias tanto de las células ganglionares de la retina (CGRs) como de otros núcleos cerebrales (verde). (B) Eferencias. Las regiones invadidas por el NGLd aparecen coloreadas en naranja. NGLv, 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*; V1-I, corteza visual primaria, capa I; V1-IV, corteza visual primaria, capa IV; V1-VI, corteza visual primaria, capa VI. Tomado de Monavarfeshani *et al.*, 2017 y modificado.

1.2.3. Corteza visual primaria (V1)

En roedores, la corteza visual (CV) comprende la **corteza visual primaria (V1)**, conocida como área 17, y dos áreas extraestriadas: la 18 (lateral) y la 19 (medial) (Caviness, 1975; Sefton *et al.*, 2015). La V1, localizada en el lóbulo occipital, está implicada en recibir, procesar y analizar la información visual. Sin embargo, en roedores nocturnos, no ha sido tan investigada como en especies diurnas, ya que estos animales dependen menos de la visión y más de otras modalidades sensoriales, como el tacto y el olfato (Hübener, 2003). La citoarquitectura y las conexiones de la V1 son bastante similares entre los mamíferos; los roedores también poseen 6 capas corticales siendo la I la más superficial, y la VI, la más profunda. (Narayanan *et al.*, 2017; Himmelhan *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2023). Las capas del área 17 son: la capa I es superficial, delgada y con pocas células; las capas II y III en conjunto ocupan el 45% del grosor de la V1, y sus límites son difíciles de distinguir; la capa IV tiene neuronas pequeñas y constituye el 55% del grosor total; la capa V tiene cuerpos celulares de diferentes tamaños; y la capa VI es la más profunda, se puede dividir en subcapas dependiendo de la disposición celular (Peters *et al.*, 1985; Ortiz, 2006).

Se ha demostrado que, en la V1 de ratón, cada hemisferio tiene una representación completa del campo visual contralateral (Dräger, 1975). Sin embargo, debido a la lateralización de los ojos, el campo visual binocular es reducido y solo un tercio de V1 de cada hemisferio, en su parte lateral, recibe información de ambos ojos (**Fig.16**; Dräger & Olsen, 1981; Hübener, 2003).

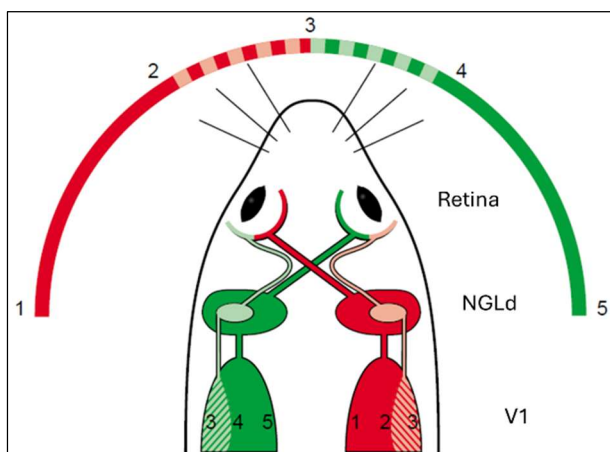


Figura 16. Esquema del sistema visual de roedores.

El hemisferio visual izquierdo se representa en rojo y el derecho en verde. El campo visual comprendido entre los números 1-2 (rojo continuo) es procesado por la retina nasa (N) y central (C, roja) del ojo ipsilateral, y los axones de las CGR decusan en el quiasma, por lo que envían información al NGLd contralateral (rojo) y desde éste a V1 contraletaral (rojo), terminando en las zonas 1, 2 y 3 de V1. Esta información procede por tanto solo de uno de los ojos, es monocular. Lo mismo ocurre en el caso del campo visual comprendido entre 4-5 (verde continuo). Sin embargo, el campo visual comprendido entre 2 y 3 (rojo-rosa) es detectado por la retina N y C del ojo ipsilateral (rojo) pero también por la temporal (T) del contralateral (rosa); como los axones de las CGR de la retina T no decusan en el quiasma, continuarán hacia el NGLd del mismo lado y de ahí se dirige la

información a la zona 3 (rojo-rosa) de V1, confluye así con la información procedente de la retina N y C del ojo contralateral, siendo esta la zona de recepción de información binocular. Lo mismo ocurre con el campo visual comprendido entre 3-4. CGR, células ganglionares de la retina; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. Tomado de Hübener, 2003 y modificado.

Las células corticales pueden clasificarse según distintos criterios: morfológicos, de conectividad o electrofisiológicos, entre otros. Sin embargo, no ha sido posible crear una clasificación única que abarque todos estos aspectos. La introducción de la transcriptómica ha facilitado una clasificación, que integra aspectos anatómicos, fisiológicos y de conectividad. A partir de estos avances, se han identificado tres grandes grupos celulares en la corteza de los mamíferos: neuronas glutamatérgicas, neuronas GABAérgicas y células no neuronales (para revisión consultar: Zeng & Sanes, 2017; Cheng *et al.*, 2022):

- **Neuronas glutamatérgicas (Fig.17A):** células excitadoras que se subdividen en 5 clases según sus características morfofuncionales. Entre estas están las 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. Las células glutamatérgicas, tienen diversas funciones según su capa de origen.
- **Neuronas GABAérgicas (Fig.17B):** células inhibitoras que se clasifican en subtipos según los marcadores celulares que expresen: las células en cesta expresan parvalbumina (PVALB⁺), las células de Martinotti expresan somatoestatina (SST⁺), las células bipolares expresan péptido intersticial vasoactivo (VIP⁺) y receptor 3A de la 5-hidroxitriptamina sin VIP (HTR3A⁺VIP⁻), con más subdivisiones según su morfología.
- **Células no neuronales:** como oligodendrocitos, astrocitos y células microglía.

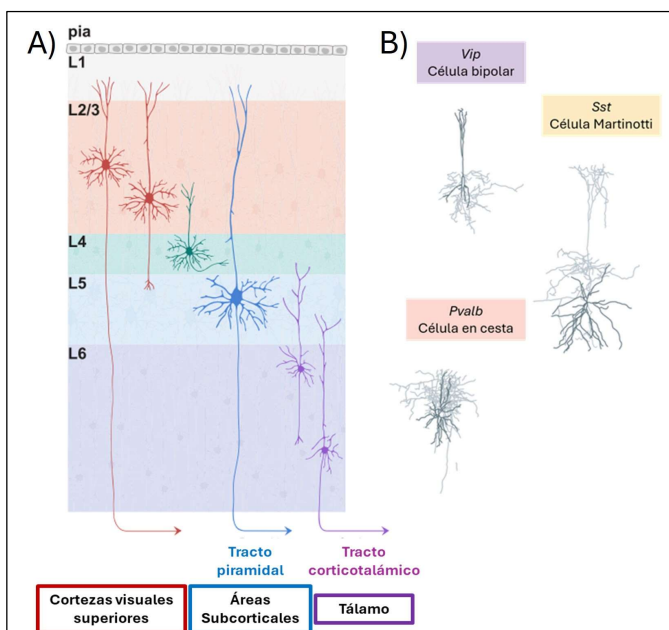


Figura 17. Esquema de las neuronas de la corteza visual primaria. (A) Disposición de las neuronas glutamatérgicas en las diferentes capas (L1-L6) de la V1. Tomado de Cheng *et al.*, 2022 y modificado. **(B)** Representación de los 3 tipos de neuronas GABAérgicas de la V1. La célula bipolar (morado) expresa el péptido intestinal vasoactivo (Vip), la célula de Martinotti (amarillo), expresa somatoestatina (Sst) y la célula de cesta (rosa), que expresa parvalbúmina (Pvalb). Tomado de Zeng & Sanes, 2017 y modificado.

La V1 presenta un complejo entramado de interconexiones, donde las células de la capa IV, tras recibir aferencias del NGLd, proyectan la información hacia capas superiores e inferiores; mientras que las de las capas II/III, V y VI van a tener un mayor número de conexiones intracorticales (para más información consultar: Sefton *et al.*, 2015; Narayanan *et al.*, 2017). La V1 recibe múltiples aferencias con información visual, y envía eferencias a más de 18 áreas del SNC diferentes (para revisión consultar: Froudarakis *et al.*, 2019), entre las que destaca el envío de eferencias desde la capa VI hacia el NGLd y desde la capa V hacia el CS (Ji *et al.*, 2015; Sefton *et al.*, 2015; Resulaj *et al.*, 2021). Esto establece una comunicación bidireccional entre la V1 y el NGLd, mientras que la conexión entre la V1 y el CS es exclusivamente desde la V1 hacia el CS (Simmons *et al.*, 1982).

1.2.4. Poblaciones gliales en los núcleos cerebrales

En la presente Tesis Doctoral hemos analizado en dos modelos animales, uno de sepsis y otro de malaria, dos de las poblaciones de células gliales del SNC: los astrocitos y las células de microglía.

Los **astrocitos** son un grupo celular muy heterogéneo que realizan múltiples funciones, como ya se indicó en el apartado anterior en los astrocitos de la retina, añadiendo en el resto del SNC su implicación en el mantenimiento la integridad de la **barrera hematoencefálica (BHE)** (Miller, 2018).

Las **células microgliales**, realizan las mismas funciones indicadas en la microglía retiniana, pero cuando se produce la activación microglial cursa con cambios morfológicos diferentes a los descritos en la retina (ver apartado *Material y Métodos* para consultar los diferentes morfotipos); su forma cambia del morfotipo basal (morfotipos I y II) con un soma pequeño y largas prolongaciones, hacia morfotipos reactivos (morfotipos III-V) con somas de gran tamaño y prolongaciones anchas y cortas, e incluso llegando a adquirir en última instancia un morfotipo ameboide (Diz-Chaves *et al.*, 2012; Kierdorf & Prinz, 2013; Gomes *et al.*, 2015; Garrido *et al.*, 2021).

2. SEPSIS

La sepsis es una disfunción orgánica causada por una respuesta descontrolada del huésped ante una infección. Se trata de una respuesta inmunitaria exacerbada que daña los tejidos, provocando su disfunción, y desencadenando, en algunos casos, un fracaso multiorgánico que puede llegar a ser mortal. En esta última definición de la patología, alcanzada por consenso en 2016 (Singer *et al.*, 2016) se incluye el concepto de disfunción orgánica cuya severidad puede además ser evaluada mediante la escala específica para la evaluación de fallo orgánico relacionado con la sepsis (SOFA, *Sepsis-related Organ Failure Assessment*, **Tabla 2**).

Tabla 2. Escala para la evaluación de fallo orgánico relacionado con la sepsis

Sistema	Puntuación				
	0	1	2	3	4
Respiración					
Pao ₂ /Fio ₂ , mmHg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40,0)	<200 (26,3) con soporte respiratorio	<100 (13,3) con soporte respiratorio
Coagulación					
Plaquetas, *10 ³ μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hígado					
Bilirrubina, mg/dL	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
Cardiovascular	PAM ≥70 mm Hg	PAM <70 mm Hg	Dopamina <5 o dobutamina (a cualquier dosis) ^b	Dopamina 5,1-15 o adrenalina ≤0,1 o noradrenalina ≤0,1 ^b	Dopamina >15 o adrenalina >0,1 o noradrenalina >0,1 ^b
SNC					
Escala de coma de Glasgow ^b	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina en suero, mg/dL	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5
Producción de orina, mL/día				<500	<200

Pao₂: presión parcial del oxígeno; Fio₂: fracción de oxígeno inspirada; PAM: presión arterial media; SNC: sistema nervioso central. ^a. Las dosis de catecolaminas se expresan en μg/kg/min por al menos 1 hora. ^b. Escala de coma de Glasgow: una puntuación más alta indica una mejor función neurológica (rango 3-15). Tabla adaptada de Singer *et al.*, 2016.

La sepsis es un grave problema de salud mundial, con una elevada incidencia y mortalidad. En un estudio llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se analizaron resultados procedentes de 51 estudios, en su mayoría de países de ingresos elevados, alcanzando en este estudio una incidencia de sepsis de 189 casos por cada 100.000 personas/año, en adultos en tratamiento hospitalario, con una mortalidad asociada del 26,7% (Fleischmann-Struzek *et al.*, 2020). Cabe destacar otro estudio reciente en el que se encontraron tasas de incidencia aún mayores: 48,9 millones de casos de sepsis a nivel mundial, con 11 millones de muertes relacionadas con la sepsis, es decir, casi el 20% de todas las muertes a nivel mundial; observándose peores resultados en los

países con economías menos desarrolladas (**Fig. 18**; Rudd *et al.*, 2020). Ante la magnitud de los datos y la severidad de la patología, y con el fin de hacer frente a esta amenaza sanitaria mundial, en 2017, la Asamblea Mundial de la Salud adoptó una resolución destinada a mejorar «*la prevención, el diagnóstico y el tratamiento clínico de la sepsis*» (WHA, 2017; Reinhart *et al.*, 2017), incluyéndose además la lucha contra la sepsis como una parte integral del desarrollo de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

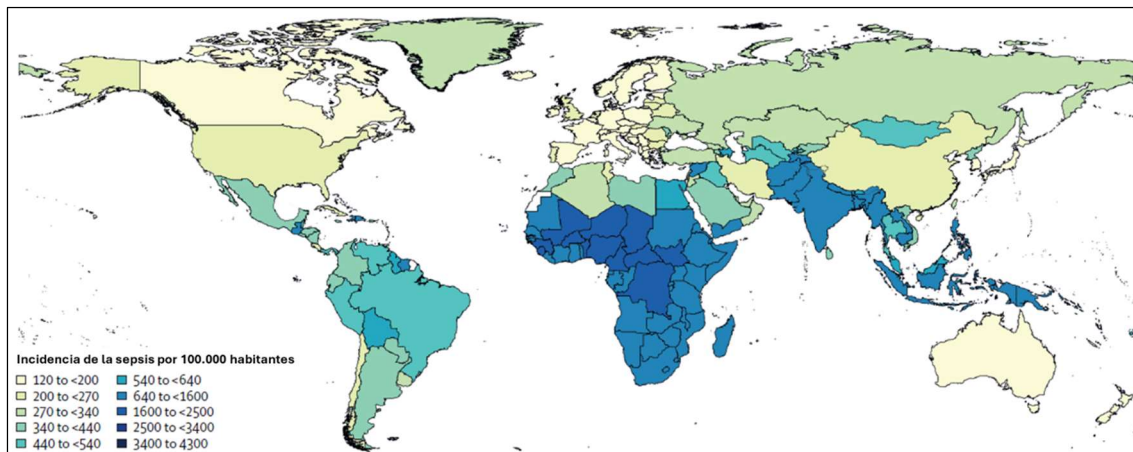


Figura 18. Incidencia de la sepsis en 2017 estandarizada por edad para ambos sexos. Tomado de Rudd *et al.*, 2020.

Aunque la sepsis pueda afectar a cualquier persona, existen grupos de riesgo, con una mayor vulnerabilidad a padecer la patología, como son los niños y los recién nacidos, las personas de edad avanzada, o los pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de diversas enfermedades crónicas como el SIDA, la cirrosis, las enfermedades autoinmunes, la enfermedad renal crónica, la diabetes y el cáncer (Gotts & Matthay, 2016, Reinhart *et al.*, 2017; Rudd *et al.*, 2020). El diagnóstico de la sepsis resulta complejo ya que los signos y síntomas de la patología son muy inespecíficos, siendo los más comunes la disnea, la debilidad muscular, alteraciones en el estado mental, dolor, tos, edemas, náuseas, hipertensión y fiebre (Singer *et al.*, 2016). Aunque la sepsis no siempre resulte mortal, en los supervivientes, induce importantes secuelas entre las que destacan el daño neurológico: fundamentalmente se han descrito problemas de memoria y concentración, y en algunos casos se han observado síntomas de trastorno de estrés postraumático, depresión y/o ansiedad, así como situaciones de fatiga y debilidad muscular (Gotts & Matthay, 2016; Cecconi *et al.*, 2018; Catarina *et al.*, 2021). Además, se ha observado en los pacientes que logran superar la sepsis una alteración del sistema inmune, una inmunosupresión, lo que aumenta de manera significativa la susceptibilidad a infecciones secundarias (Hotchkiss *et al.*, 2009; Nedeva *et al.*, 2019).

2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

Las causas más comunes de la sepsis son las infecciones por bacterias, tanto grampositivas (*Staphylococcus aureus*) como gramnegativas (varias especies del género *Pseudomonas* y *Escherichia coli*), siendo los focos de infección principales las infecciones pulmonares (64% de los casos), abdominales (20%), del torrente circulatorio (15%), y de los tractos renal y genitourinario (14%) (Vincent, 2009; Cecconi *et al.*, 2018). La primera línea de defensa frente a estos patógenos son las células del sistema inmune innata (monocitos, macrófagos, neutrófilos...). Estas células son capaces de detectar la presencia de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs), como, por ejemplo, algunos componentes bacterianos tales como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, o flagelina, a través de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), entre los que destacan los receptores tipo Toll (*Toll Like Receptors*, TLRs) y los receptores tipo NOD (del inglés, *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (NOD) – Like Receptors*, NLRs). Esta unión desencadena una serie de eventos (**Fig.19**) que culminan en la liberación de mediadores proinflamatorios, como citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) (Kumar, 2020). A nivel celular, la sepsis genera estrés oxidativo y daño mitocondrial, lo que agrava la disfunción energética y contribuye a la apoptosis celular y a la inflamación (Galley, 2011; Singer 2014). La inflamación, la disfunción mitocondrial y la apoptosis son tres factores importantes que median la disfunción orgánica producida por la sepsis (Cecconi *et al.*, 2018).

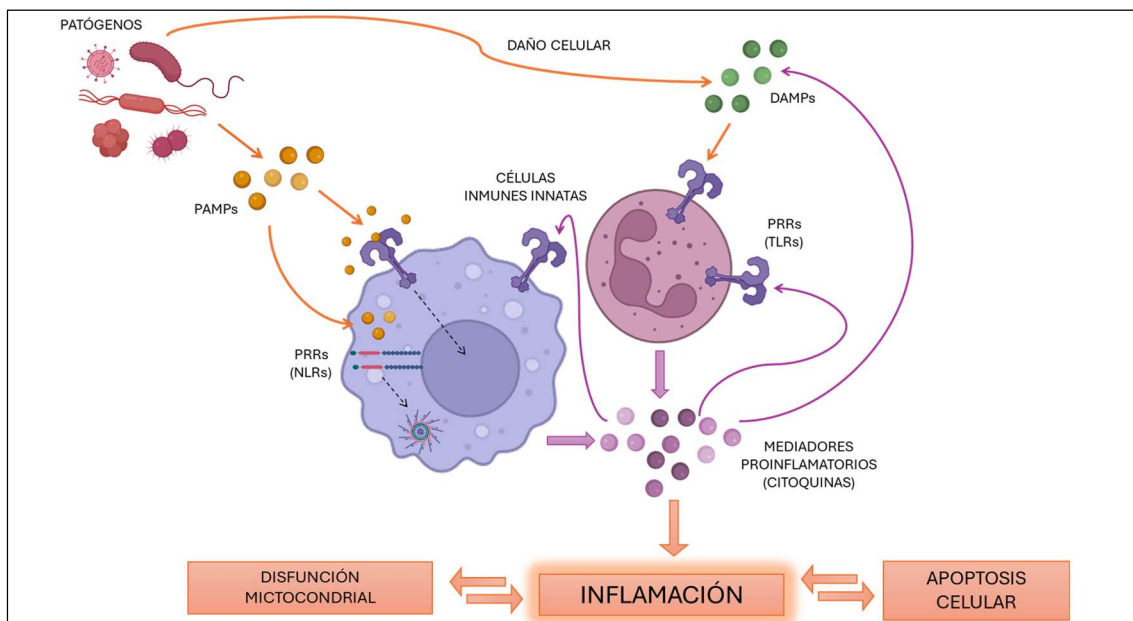


Figura 19. Mecanismos moleculares en el desarrollo de la sepsis. PRRs: receptores de reconocimiento de patrones; PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; TLRs: receptores tipo Toll. NLR: receptores tipo NOD. Imagen creada con Biorender.com

Esta activación del sistema inmune innato acaba produciendo una respuesta persistente y excesiva que se caracteriza por la liberación de citoquinas inflamatorias, fenómeno conocido como “tormenta de citoquinas” (Rittirsch *et al.*, 2008; Kumar, 2020). De hecho, datos procedentes de diversas cohortes de pacientes con sepsis muestran, en análisis de *microarrays* de sangre periférica, una sobreexpresión de los genes de los receptores PRRs, particularmente de los TLRs, acompañada de un aumento de la expresión de genes involucrados en la vía de transducción de señales del sistema inmune innato, como el NF- κ B (Factor Nuclear-kappa B, del inglés, *Nuclear Factor kappa B*). Sin embargo, en lo que respecta a la expresión de los marcadores inflamatorios, los estudios presentaron resultados contradictorios, sin evidencia concluyente de una transición definida entre las fases proinflamatoria y antiinflamatoria. A pesar de esto, en todos los estudios existía una desregulación en la expresión de múltiples marcadores inflamatorios (Tang *et al.*, 2010). En pacientes con sepsis, 24 h después de su admisión en la UCI (Unidad de Cuidados Intensivos), se observó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de múltiples moduladores inflamatorios como: IL-1 α , IL-1 β , IL-18, MCP-1 (Proteína Quimiotáctica para Monocitos 1, del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) y TNF α , en comparación con los controles ingresados en la misma UCI (Andonegui *et al.*, 2018). En pacientes con sepsis, también se han detectado altas concentraciones de LPS en plasma (Opal *et al.*, 1999), y, además, la administración de este en pacientes sanos provoca un incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10 y TNF α) así como otras modificaciones como fatiga, dolor de cabeza, disminución de la presión arterial y aumento de la frecuencia cardiaca (Sandiego *et al.*, 2015).

Aunque en condiciones fisiológicas la activación del sistema inmune innato y la consiguiente inflamación sean procesos necesarios y relevantes para la defensa del organismo frente a agentes infecciosos, en situaciones de sepsis esta activación se produce de forma excesiva y/o descontrolada provocando daños a nivel de otros tejidos y sistemas (**Fig.20**), alcanzando, en muchos casos, las dimensiones de un fracaso multiorgánico (Rittirsch *et al.*, 2008; Nedeva *et al.*, 2019). La respuesta inflamatoria sistémica en la sepsis provoca alteraciones circulatorias al dañar la barrera endotelial, lo que lleva a trombosis microvascular y disfunción multiorgánica. La sobreactivación del sistema del complemento, junto con la disfunción endotelial, contribuye a la formación de edemas en órganos clave como el hígado, los pulmones y el cerebro, resultando en hipoperfusión y daño a múltiples órganos (consultar: Sweis *et al.*, 2016; Arora *et al.*, 2023).

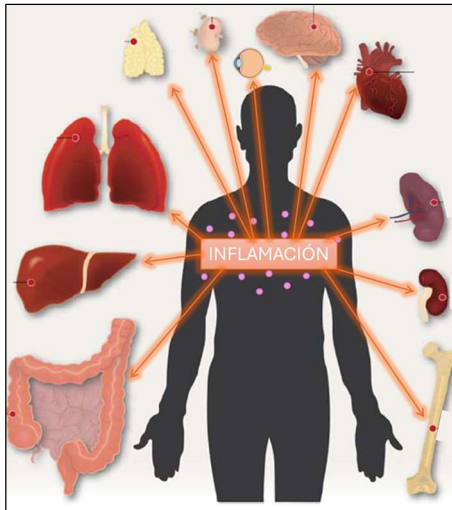


Figura 20. Afectación multiorgánica. Tomado de Nedeva *et al.*, 2019 y modificado.

2.2. AFECTACIÓN DEL SNC POR LA SEPSIS

Una complicación común es la encefalopatía asociada a la sepsis (*sepsis-associated encephalopathy*, SAE), que afecta al 70% de los pacientes críticos con esta patología, causando trastornos mentales desde confusión o delirio hasta coma (ver Gofton & Brian Young, 2012; Gao & Hernandez, 2021; Pan *et al.*, 2022). Estos trastornos se deben a procesos inflamatorios y oxidativos que causan neuroinflamación (activación glial) y neurotoxicidad en algunas áreas del cerebro, como la corteza frontal, el hipocampo y la amígdala (Heming *et al.*, 2017; Catarina *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

Esto ocurre, ya que una de las estructuras afectadas por la tormenta de citoquinas es la BHE, alterando su funcionamiento normal y causando neuroinflamación (Gu *et al.* 2021; Pan *et al.*, 2022). La fisiopatología de la sepsis en el SNC es compleja, con tres rutas principales de afectación (**Fig.21**): la ruta humoral, la ruta celular y la ruta neural. En la primera, se produce una entrada de las citoquinas periféricas al cerebro a través de la BHE debilitada o mediante transportadores específicos, difundiendo por las diferentes áreas del cerebro y uniéndose a sus receptores expresados en neuronas, células gliales y células endoteliales. En la ruta celular, la activación de las células inmunes del SNC (macrogliales y microgliales) incrementa la liberación de mediadores inflamatorios. Tanto las citoquinas periféricas como las producidas localmente, van a aumentar la permeabilidad de la BHE e inducir la atracción e infiltración de células inmunes periféricas. En el caso de la ruta neural intervienen las fibras nerviosas autónomas; dónde las terminaciones nerviosas detectan estímulos infecciosos lo que induce una activación de los receptores de citoquinas en las fibras nerviosas aferentes, transmitiendo de esta forma la señal inflamatoria hacia el cerebro (consultar: Xin *et al.*, 2023).

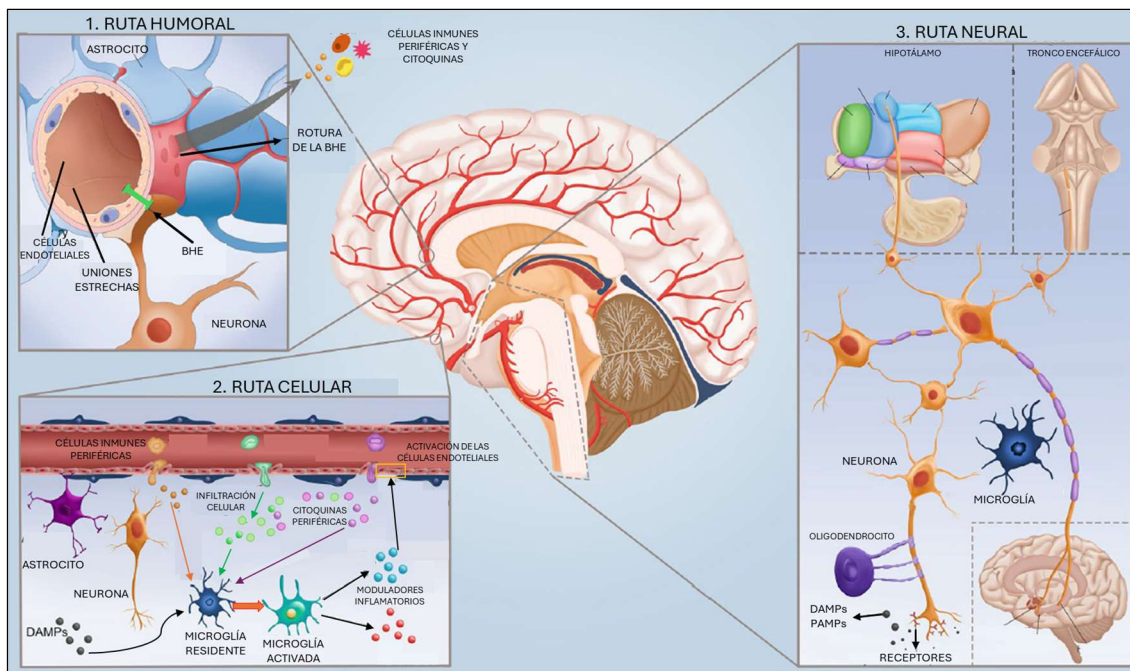


Figura 21. Rutas de afectación del sistema nervioso central en la sepsis. Ruta humoral. Las citoquinas periféricas entran en el parénquima cerebral a través de la barrera hematoencefálica (BHE) previamente debilitada o a través de transportadores específicos; aumentando la permeabilidad de la BHE y la infiltración de células periféricas. **Ruta celular.** La activación de las células inmunes del sistema nervioso central (microglía y astrocitos) produce la liberación de mediadores inflamatorios, lo que facilita la infiltración de células inmunes periféricas en el cerebro y la activación de las células endoteliales contribuyendo a la pérdida de integridad de la BHE. **Ruta neural.** Las terminaciones nerviosas autónomas detectan estímulos infecciosos, activando receptores de citoquinas en las fibras nerviosas aferentes, y transmitiendo la señal inflamatoria hacia el cerebro. PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño. Tomado de Xin *et al.*, 2023 y modificado.

El edema cerebral y la apoptosis neuronal junto con este ambiente proinflamatorio, es lo que provoca cambios en el comportamiento o disfunción cognitiva de manera transitoria o de manera permanente en aquellos pacientes que superan la sepsis (Catarina *et al.* 2021; Li *et al.*, 2022). Estos efectos se han observado en pacientes recuperados de sepsis que presentaban deterioro cognitivo, especialmente en la memoria visuoespacial (Andonegui *et al.*, 2018). La afectación de la función visual podría deberse tanto a la neuroinflamación cerebral observada como a la afectación directa del ojo. La diseminación hematogena del patógeno puede propagarse hasta el ojo causando una infección ocular conocida como endofalmitis endógena (EE) (Khan *et al.*, 2002). Se ha observado que la EE puede producirse por infecciones procedentes de diversos focos, causando una pérdida de la agudeza visual (Yoshida *et al.*, 2020). Esta afección ocular también se ha observado en un caso de sepsis, donde el paciente presentó como síntoma inicial un deterioro de la visión en ambos ojos (Łątkowska *et al.*, 2024). Además, en pacientes de edad avanzada que han superado sepsis severa, se han documentado secuelas como la pérdida de visión (Iwashyna *et al.*, 2012). Así mismo, en pacientes sépticos, se han observado lesiones retinianas como manchas algodonosas, angiopatías microvasculares, hemorragias retinianas o presión intraocular (PIO) elevada (Celik *et al.*, 2006; Erikson *et al.*, 2017; Simkiene *et al.*, 2020). La BHE, al igual

que la BHE, tiene una función protectora sobre las neuronas controlando la composición plasmática, debido a la similitud de ambas barreras, el estudio de la retina puede proporcionarnos información sobre lo que está ocurriendo con la circulación cerebral en pacientes críticos (Courtie *et al.*, 2020). Dado el impacto de la sepsis en la visión, sería fundamental realizar exámenes oftalmológicos regulares en estos pacientes, no solo para evitar la pérdida de visión, sino también para comprender mejor los procesos fisiopatológicos sistémicos que afectan tanto al cerebro como a la retina.

Es necesario profundizar en los mecanismos del daño visual causado por la sepsis, lo cual se ve limitado en humanos por la complejidad de la patología, la variabilidad de la población afectada y la falta de biomarcadores claros. En este contexto, los modelos animales siguen siendo indispensables, ya que permiten replicar signos, síntomas y el fallo multiorgánico a la sepsis en corto periodo de tiempo.

2.3. MODELOS ANIMALES DE SEPSIS

Son diversos los modelos animales empleados en el estudio de la sepsis los cuales se llevan a cabo de forma diferente: (1) mediante la administración de patógenos vivos; (2) la administración de componentes microbianos como LPS; o (3) mediante la ruptura de la barrera intestinal como es el caso de la ligadura de punción cecal (*cecal ligation puncture*, CLP) que va a generar la salida de microorganismos intestinales creando la infección (Buras *et al.*, 2005; Nandi *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2023). En el estudio actual, hemos utilizado un modelo basado en la administración de una dosis única de LPS. El LPS, componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, puede provocar una respuesta inmune innata, principalmente debido a su acción como agonista de los receptores tipo *Toll*, entre los que se encuentra el TLR4 (receptor tipo *Toll* 4). La activación de TLR4, activa el factor de transcripción NF- κ B, lo que induce la producción de citoquinas inflamatorias tanto en células microgliales como en astrocitos. Se ha observado en la sepsis que la activación de TLR4 puede conducir a la activación del inflamasoma NLRP3 (dominio pirina 3 de la familia NLR, del inglés, *Nod-like receptor protein 3*), que activa la caspasa-1 produciendo formas maduras de IL-1 β e IL-18, así como la muerte programada por piroptosis (Danielski *et al.*, 2019; Kumar, 2020; Pan *et al.*, 2022).

De forma similar a lo ocurrido en humanos, la administración sistémica de LPS, induce en roedores una gran inflamación periférica, aumentando los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes (IL-1 β , IL-6, TNF α) (Jang *et al.*, 2007; Skelly *et al.*, 2013; Norden *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2019; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024), además de producir los

síntomas característicos de la patología: piloerección, pérdida de peso, hipotermia, aumento de la frecuencia respiratoria y letargia o disminución de la actividad locomotora (Semmler *et al.*, 2007, 2008; Skelly *et al.*, 2013; Norden *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2019).

La reproducción de la sepsis mediante el uso de la endotoxina ha demostrado provocar déficits cognitivos y alteraciones en la función motora, como los observados en pacientes, mediante el uso de diferentes pruebas comportamentales (Semmler *et al.*, 2007; Bargi *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022); por ello la administración sistémica de LPS ha sido ampliamente utilizada en modelos animales en ratón y rata para el estudio de los efectos de la sepsis sobre el SNC (Tonelli & Postolache, 2005; Hoogland *et al.*, 2015). En el SNC, existe controversia sobre la acción del LPS en la BHE, algunos estudios han observado cambios no disruptivos, como la activación del endotelio cerebral por la unión de citoquinas periféricas (IL-1 β o TNF α) a sus receptores, lo que va a producir la secreción de más moduladores inflamatorios; la sobreexpresión de receptores y transportadores en las células endoteliales; la modulación de la actividad de los astrocitos; o la trans migración de células leucocitarias como linfocitos, neutrófilos o monocitos. Sin embargo, otros estudios han observado una pérdida de la integridad de la BHE, es decir, cambios disruptivos, como la alteración de las uniones estrechas o el daño sobre las células endoteliales; la ruptura de la glía limitante; o la degradación de la glicocálix (para más detalle consultar: Varatharaj & Galea, 2017). En diversos modelos en roedores han demostrado que la administración de LPS produce disrupción de la BHR (Li *et al.*, 2014; Kokona *et al.*, 2018) y de la BHE (Banks *et al.*, 2015; Towner *et al.*, 2018); y una desregulación de la expresión génica y en la liberación de citoquinas tanto en la retina (Li *et al.*, 2014; Kokona *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024) como en el parénquima cerebral (Qin *et al.*, 2007; Semmler *et al.*, 2008; Skelly *et al.*, 2013; Cazareth *et al.*, 2014; Banks *et al.*, 2015; Bargi *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2022).

Muchos modelos han analizado los efectos del LPS sobre las poblaciones neuronales y gliales de diferentes regiones cerebrales (ver **Tabla 3**). Una de las poblaciones que más rápido va a detectar y actuar frente a la endotoxina son las células microgliales. En múltiples estudios de administración de LPS se ha demostrado que la activación microglial se produce en las primeras 6 horas tras la administración (consultar Hoogland *et al.*, 2015). Sin embargo, hay una gran variabilidad en el patrón de afectación entre las diferentes regiones cerebrales observándose mayor susceptibilidad en unas regiones que en otras (Brandi *et al.*, 2022; Jung *et al.*, 2022). La administración de LPS, además de aumentar la expresión de marcadores celulares como Iba1 y el número de células microgliales,

también induce un cambio de morfotipo, hacia un morfotipo ameboide (consultar **Tabla 3**), que tiene una mayor capacidad inflamatoria, aumentando la expresión génica y la liberación de citoquinas como la IL-1 β , IL-6, TNF α o IL-10; y de quimioquinas como MCP-1 (Cazareth *et al.*, 2014; Norden *et al.*, 2016). Estas moléculas van a propagar la señal inflamatoria activando otras células además de aumentar el reclutamiento de monocitos periféricos (Cazareth *et al.*, 2014).

Tabla 3. Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la administración de LPS en el cerebro de roedores.

Animal (cepa, sexo)	Dosis de LPS (vía)	Tiempo de evaluación	Efecto observado	Referencia									
Ratas Wistar (σ)	10 mg/kg (i.p.)	24 h	<ul style="list-style-type: none"> ↑Células TUNEL⁺ y Bax⁺ ↓Células Bcl2⁺ ↑Células GFAP⁺ ↑Células microgliales ED1⁺ (activadas) 	<ul style="list-style-type: none"> Neurodegeneración (apoptosis) Activación microglial Activación macroglial Disfunción neuronal 	Semmler <i>et al.</i> , 2005								
			Ratas Wistar (σ)	10 mg/kg (i.p.)		24 h	<ul style="list-style-type: none"> Alteración del registro del EEG ↑Expresión génica de marcadores proinflamatorios (iNOS, IL-1β, TNFα y MCP-1) y antiinflamatorios (TGFβ) ↓Células NeuN⁺ ↑Células microgliales ED1⁺ (activadas) =Células GFAP⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> Neuroinflamación Neurodegeneración Activación microglial Ruptura de la BHE 	Semmler <i>et al.</i> , 2008				
							Ratones CD1 (σ)	3 mg/kg (i.p.)		24 h	<ul style="list-style-type: none"> ↑Niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-1α), antiinflamatorias (IL-4, IL-10) y quimioquinas (MCP-1) ↑ Expresión GFAP ↑ Expresión Iba1 y F4/80 	<ul style="list-style-type: none"> Neuroinflamación Activación microglial Activación macroglial 	Banks <i>et al.</i> , 2015
											Ratones BALB/c	0,33 mg/kg (i.p.)	
Ratones Sprague-Dawley (σ)	10 mg/kg (i.p.)	24 h	<ul style="list-style-type: none"> ↑Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα) y antiinflamatorios (TGFβ) ↑Expresión Iba1⁺, del número de células y del morfotipo ameboide Sin cambios en GFAP ↑Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα) en células microgliales 	<ul style="list-style-type: none"> Neuroinflamación Activación microglial 	Townner <i>et al.</i> , 2018								
			Ratones Sprague-Dawley (σ)	5 mg/kg (i.v.)		14d	<ul style="list-style-type: none"> ↑Permeabilidad ↓Expresión génica y proteica de ZO-1, claudina-1, claudina-5 y ocludina ↑Expresión proteica de iNOS y eNOS 	<ul style="list-style-type: none"> Ruptura de la BHE Estrés oxidativo 	Huang <i>et al.</i> , 2020				
Ratones C57BL/6 (σ)	5 mg/kg (i.p.)	24 h			<ul style="list-style-type: none"> ↓Neuronas dopaminérgicas (TH⁺) ↑Iba1, morfotipo ameboide ↑GFAP 		<ul style="list-style-type: none"> Neurodegeneración Activación microglial Activación macroglial 	Brandi <i>et al.</i> , 2022					
			Ratones C57BL/6	0,05 mg/kg 1 o 2 dosis (i.p.)	24 h	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα) y antiinflamatorias (TGFβ) ↑Células Iba1⁺ ↑CD68 (microglía fagocítica activa) 	<ul style="list-style-type: none"> Neuroinflamación Activación microglial 		Jung <i>et al.</i> , 2022				

Datos obtenidos de diferentes regiones cerebrales, fundamentalmente corteza e hipocampo. LPS: lipopolisacárido; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso; d: día; BHE: barrera hematoencefálica; IL: interleuquina; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; NeuN: proteína de unión a hexaribonucleótidos-3; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; EEG: electroencefalograma; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ZO-1: *zonula occludens-1*; TNF α : factor de necrosis tumoral alpha; TGF β : factor transformante del crecimiento beta; TH: tirosina hidroxilasa; CD68: cluster de diferenciación 68.

Al igual que las células microgliales, otra población afectada por la administración de LPS son los astrocitos, evidenciándose una activación por el incremento de expresión de GFAP en diferentes regiones (ver **Tabla 3**). La activación de los astrocitos también va a incrementar la expresión de mediadores inflamatorios como la IL-1 β , la IL-6, TNF α , MCP-1 y factores de crecimiento como el TGF β (Norden *et al.*, 2016). Los astrocitos activados desempeñan un papel crucial en la neuroprotección y en la limitación de la inflamación al liberar factores que favorecen la supervivencia neuronal y la homeostasis del sistema nervioso. Sin embargo, su activación también puede tener efectos perjudiciales. Por ejemplo, pueden dañar las uniones estrechas de BHE, reduciendo su integridad y permitiendo que sustancias o células accedan al sistema nervioso central. Además, los astrocitos activados liberan citoquinas y quimioquinas que aumentan la infiltración de células inmunitarias en el tejido cerebral, lo que puede exacerbar la inflamación y contribuir al daño neuronal (Shulyatnikova & Verkhatsky, 2020).

En la retina, los efectos del LPS han sido ampliamente estudiados en modelos animales revelando tanto cambios morfológicos como funcionales significativos (consultar **Tabla 4**). La endotoxina produce un aumento en el grosor retinal (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024) y una dilatación de las venas retinianas (Tsioti *et al.*, 2023); parámetros evaluados mediante la técnica de imagen TCO (tomografía de coherencia óptica en dominio espectral, del inglés, *optical coherence tomography*). Esta técnica no invasiva permite visualizar las estructuras de la retina con alta resolución, proporcionando medidas precisas del grosor de las capas retinales (Zeppieri *et al.*, 2023). Junto con el aumento del grosor retinal, también se observa una alteración en las ondas del electroretinograma (ERG), una técnica electrofisiológica que evalúa la respuesta de la retina a estímulos luminosos, lo que indica una disfunción visual relacionada con la inflamación inducida por LPS (Tsioti *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024). Además de estos cambios morfológicos y funcionales, la administración periférica de LPS produce una notable reducción en el número de CGRs-Brn3a⁺, lo que sugiere un daño neuronal asociado a la inflamación y la activación glial en la retina (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024).

En cuanto a las poblaciones gliales, se observó un aumento del número de células microgliales en la retina junto con una activación de las estas (ver **Tabla 4**). Además de la activación microglial, también se ha demostrado en modelos animales una alteración de las poblaciones macrogliales, una activación de los astrocitos y de las células de Müller que comienzan a expresar mayores niveles de GFAP (ver **Tabla 4**).

Tabla 4. Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la administración de LPS en la retina de roedores

	Animal (cepa, sexo)	Dosis de LPS (vía)	Tiempo de evaluación	Metodología	Efecto Observado	Referencia	
EVALUACIÓN IN VIVO	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	5 mg/kg (i.p.)	24 h	TCO	↑Grosor de la retina: Edema	Rodríguez-Ramírez et al., 2024	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h		↑Grosor de la retina: Edema	Wu et al., 2023	
	Ratones BALB/c	1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d		↑Permeabilidad: Disrupción de BHR ↑Grosor de la retina: Edema Dilatación de los vasos retinianos	Kokona et al., 2018	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d		Dilatación de las venas de la retina	Tsioti et al., 2023	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	6 mg/kg (i.p.)	24 h			Kuribara et al., 2006	
	Ratas Sprague-Dawley (♀)	1 mg/kg (pata)	24 h			Lin et al., 2018	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h	ERG	Disminución de la amplitud	Wu et al., 2023	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d			Tsioti et al., 2023	
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	5 mg/kg (i.p.)	3d-7d			Rodríguez-Ramírez et al., 2024	
	EVALUACIÓN EX VIVO	Ratones BALB/c	1 mg/kg (i.v.)	24h	MODULADORES INFLAMATORIOS Y APOPTÓTICOS	↑Expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNFα), antiinflamatorias (IL-4, IL-10), quimioquinas (MCP-1) y factores de crecimiento (VEGF): Neuroinflamación	Kokona et al., 2018
Ratones BALB/c		1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d	Citometría de flujo		↑Macrófagos, neutrófilos y/o células dendríticas. Activación de los macrófagos: Neuroinflamación	
Ratas Sprague-Dawley (♂)		1 mg/kg (pata)	48 h	PCR		↑Expresión génica de IL-1β, IL-6, TNFα y MMP9: Neuroinflamación	Ren et al., 2018
Ratas Sprague-Dawley (♀ y ♂)		125 ng/µl en 2µl (i.vt.)	24 h	PCR WB		↑Expresión génica de caspasa-3, Bax y ↓Bcl2: Apoptosis ↑Expresión génica (IL-6, TNFα) y proteica (TLR4, IL-1β, IL-6, TNFα): Neuroinflamación	Han et al., 2020
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)		1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d	Citometría de flujo		↑Células microgliales y macrófagos: Neuroinflamación	Tsioti et al., 2023
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)		200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h	PCR WB		↑Expresión génica de caspasa-3, Bax y ↓Bcl2: Apoptosis ↑Expresión génica y proteica de iNOS, IL-6 y TNFα: Neuroinflamación	Wu et al., 2023
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)		5 mg/kg (i.p.)	24 h-72 h	ELISA Citometría de flujo		↑IL-1β y TNFα: Neuroinflamación ↑Células inmunes: Neuroinflamación	Rodríguez-Ramírez et al., 2024
Ratas Sprague-Dawley (♀ y ♂)		125 ng/µl en 2µl (i.vt.)	24 h	IHQ - TUNEL		↑Células TUNEL ⁺ : Apoptosis	Han et al., 2020
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)		200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h	IHQ - TUNEL		↑Células TUNEL ⁺ (CCG): Apoptosis	Wu et al., 2023
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)		5 mg/kg (i.p.)	3d-45d	IHQ - Brn3a		↓Células Brn3a ⁺ : Neurodegeneración	Rodríguez-Ramírez et al., 2024
Ratones BALB/c	150 ng en 2µL (i.vt.)	21d	IHQ - Brn3a	↓Células Brn3a ⁺ : Neurodegeneración	Livne-Bar et al., 2024		
EVALUACIÓN EX VIVO	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	6 mg/kg (i.p.)	24 h	ACTIVACIÓN GLIAL	IHQ - GFAP	↑GFAP en las CM: Activación microglial	Kuribara et al., 2006
	Ratones BALB/c	1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d		IHQ - Iba1	↑Células Iba1 ⁺ , morfotipo ameboides y migración hacia la CNE: Activación microglial	Kokona et al., 2018
	Ratas Sprague-Dawley (♂)	1 mg/kg (pata)	24 h		IHQ - GFAP/Iba1	↑GFAP, desde CFNO hasta CNI: Activación microglial ↑Iba1 ⁺ y migración de células a la CNI: Activación microglial	Lin et al., 2018
	Ratas Sprague-Dawley (♂)	1 mg/kg (pata)	48 h		IHQ - GFAP/OX-42	↑GFAP en las CM: Activación microglial ↑Células OX-42 ⁺ en la CCG: Activación microglial	Ren et al., 2018
	Ratas Sprague-Dawley (♂)	1 mg/kg (pata)	48 h		IHQ - GFAP/Iba1	↑GFAP en las CM: Activación microglial ↑Células Iba1 ⁺ en CCG y CNI: Activación microglial	Ren et al., 2018
	Ratas Sprague-Dawley (♀ y ♂)	125 ng/µl en 2µl (i.vt.)	24 h		IHQ - Iba1	↑Células Iba1 ⁺ , morfología ameboides: Activación microglial	Han et al., 2020
	Ratas Sprague-Dawley (♀ y ♂)	125 ng/µl en 2µl (i.vt.)	24 h		IHQ - Iba1	↑Células Iba1 ⁺ en CCG y activación: Activación microglial	Han et al., 2020
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	1 mg/kg/día x 4d (i.v.)	4d		IHQ - Iba1	↑Células Iba1 ⁺ en CCG y CNI, morfotipo ameboides: Activación microglial	Tsioti et al., 2023
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h		IHQ - Iba1/Ki67	↑Células Iba1 ⁺ : Activación y proliferación microglial	Wu et al., 2023
	Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	200 µg/ml en 1 µl (i.vt.)	24 h		IHQ - Iba1	Migración de células microgliales a la CCG	Wu et al., 2023
Ratones C57BL/6J (♀ y ♂)	5 mg/kg (i.p.)	3d-45d	IHQ - Iba1	↑Células Iba1 ⁺ , morfología ameboides: Activación microglial	Rodríguez-Ramírez et al., 2024		

LPS: lipopolisacárido; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso; i.vt.: intravítreo; d: día; TCO: tomografía de coherencia óptica; ERG: electroretinograma; ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; WB: Western Blot; Brn3a: homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; BHR: barrera hematorretiniana; IL: interleuquina; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; MMP9: metaloproteína 9; TLR4: receptor tipo Toll 4; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; CM: células de Müller; CFNO: capa de fibras del nervio óptico; NO: nervio óptico; CCG: capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa.

La administración de LPS provoca hipertrofia en los astrocitos y altera su disposición, mientras que, en las células de Müller induce una alta expresión de GFAP y desorganización en sus prolongaciones terminales (Ren *et al.*, 2018). Estas alteraciones en la macroglía indican una posible disrupción de la BHR, comprometiendo su integridad y función (Vecino *et al.*, 2016). La activación de las células microgliales y macrogliales parece estar estrechamente interconectada, ya que la activación de una población puede inducir la activación de la otra, amplificando así el ambiente inflamatorio en la retina (Wang *et al.*, 2011).

Teniendo en consideración todas las evidencias mencionadas anteriormente, podemos concluir, la administración sistémica de LPS en modelos en roedores es una buena forma para reproducir los efectos observados en la sepsis para el estudio tanto de regiones cerebrales como de la retina; así como para la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos.

2.4. MANEJO Y TRATAMIENTO DE LA SEPSIS

La mortalidad por sepsis y choque séptico es bastante alta en países de ingresos bajos y medios, superando el 40% y el 50%, respectivamente, y se mantiene elevada en países de ingresos altos (sepsis: 15-25%; choque séptico: 30-40%), a pesar de las mejoras implementadas en atención médica y detección temprana. Además, entre los supervivientes se detecta una elevada morbilidad y una disminución en la calidad de vida, fundamentalmente relacionada con un deterioro cognitivo y una discapacidad funcional sustancial. Aunque los tratamientos tempranos han contribuido a la reducción de esta mortalidad, es necesaria la búsqueda de nuevas terapias que mejoren los resultados a largo plazo (consultar: Cecconi *et al.*, 2018; La Via *et al.*, 2024).

El manejo de la sepsis es muy complejo y ha de realizarse con urgencia, siendo la prioridad eliminar el foco de infección. Al inicio se utilizan antimicrobianos de amplio espectro, que han de ajustarse posteriormente según los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio. En el tratamiento de urgencia se incluyen diversas intervenciones relacionadas con la restauración de la perfusión tisular, la administración de fluidos en la primera hora tras el ingreso, y, en algunos casos, la eliminación de tejido infectado, o el drenaje de abscesos. Otras acciones a realizar son la administración de vasopresores para garantizar una correcta perfusión de los tejidos, el control de la glucemia, y la monitorización continuada del estado de los pacientes y la resolución de la disfunción orgánica. Es también frecuente el uso de corticosteroides, la oxigenoterapia, la

modulación de la coagulación o la inmunoterapia. Sin embargo, la práctica clínica cada vez más se dirige a una medicina de precisión ya que la sepsis es un síndrome heterogéneo, y los tratamientos deben adaptarse a las características específicas de cada paciente. Aunque los pacientes logren superar la sepsis son muy frecuentes las secuelas a corto y/o largo plazo, detectándose disfunción cognitiva, psicológica y física. Estos pacientes, además, tienen riesgo de readmisión al hospital, incrementándose las tasas de mortalidad y la necesidad de cuidados paliativos (Evans *et al.*, 2021; Jarczak *et al.*, 2021).

Se han descrito numerosas alteraciones neurológicas asociadas con la sepsis, siendo las más graves la aparición de delirio y coma; a largo plazo se puede observar deterioro cognitivo, déficit de atención, disminución de la fluidez verbal y de la función ejecutiva, ansiedad, depresión y estrés postraumático. Sin embargo, no existe un tratamiento específico para paliar las consecuencias neurológicas de la sepsis (Heming *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2022).

Entre las estrategias más prometedoras se encuentra la regulación de la neuroinflamación, una diana clave que ha sido destacada por diversos estudios; como por ejemplo el uso de minociclina, antibiótico que ha demostrado propiedades inmunomoduladoras al reducir la neuroinflamación y el deterioro cognitivo en modelos animales; y se ha comenzado a testar en pacientes con delirio en la UCI (revisar: Ferlini & Gaspard, 2023). Recientemente, se está analizando la estimulación del nervio vago, que parece atenuar la inflamación periférica, la activación microglial y la expresión de citoquinas proinflamatorias en el cerebro; se están probando también terapias con antioxidantes, para reducir el estrés oxidativo; o en la administración de glucocorticoides, para regular la secreción de hormonas y mediadores antiinflamatorios (para más información consultar: Gu *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2022). En algunos centros se está comenzado a utilizar terapia cognitiva, en combinación con la terapia física, que parece inducir una mejoría en los pacientes supervivientes de la sepsis o el shock séptico (Evans *et al.*, 2021). Sin embargo, es necesario continuar investigando nuevos abordajes terapéuticos que resulten efectivos y que permitan mitigar la disfunción cerebral y, en última instancia, mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

3. MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por varias especies de protozoos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos *Anopheles* hembra. Existen más de 120 especies, pero solamente 5 infectan al ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi* (Varo *et al.*, 2020; White, 2022; Fikadu & Ashenafi, 2023). Entre ellas, *P. falciparum* es la que tiene una mayor virulencia y tasa de replicación, presentando un peor pronóstico (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019; Varo *et al.*, 2020). Esta especie se distribuye ampliamente a lo largo del continente africano, ocasionando un gran problema de salud en los países subsaharianos donde se registran el 90% de los casos y el 91% de las muertes a nivel mundial, principalmente en niños. Por otro lado, *P. vivax* aparece en el resto de las áreas endémicas ocasionando cuadros clínicos menos graves. Las demás especies de parecen tener una menor prevalencia (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019).

Según el último informe de la OMS, en 2022 se estimaron 249 millones de casos de malaria, y 608.000 muertes en todo el mundo (WHO, 2023). Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados para controlar y eliminar la enfermedad, ésta sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, particularmente en regiones endémicas, como África subsahariana y el sudeste asiático, y, en menor medida, América Latina (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019; Varo *et al.*, 2020). Aunque en la mayoría de los casos la transmisión se produce por la interacción mosquito-humano, ocasionalmente puede producirse por transfusiones de sangre, trasplante de órganos o de manera congénita (Varo *et al.*, 2020).

3.1. CICLO Y TRANSMISIÓN DE LA MALARIA

En general todas las especies de *Plasmodium* tienen un ciclo vital similar, en los que interviene un artrópodo como vector y un animal vertebrado (mamíferos, aves, reptiles) como huésped (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019; Fikadu & Ashenafi, 2023). La reproducción sexual del parásito tiene lugar en el vector mientras que en el huésped se produce la fase de replicación asexual (Giribaldi *et al.*, 2015; Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019). En el ser humano el ciclo comienza con la picadura de un mosquito hembra infectado, que transmite el parásito en forma de esporozoitos, los cuales viajan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado (**Fig.22**). Cada esporozoito va a invadir un hepatocito donde se va a replicar dando lugar a varios merozoitos, proceso que requiere de 2-14 días, dependiendo de la especie; a esta fase se le conoce como etapa preeritrocítica o

exoeritrocítica y cursa sin síntomas. Cada merozoito hepático va a invadir un glóbulo rojo dentro de los cuales van a continuar su replicación asexual, multiplicándose hasta llegar a la forma de esquizonte. Posteriormente se rompe la célula y se liberan los merozoitos para invadir a más eritrocitos y continuar el ciclo. Esta fase se conoce como fase eritrocítica o intraeritrocítica; en la cual se empiezan a manifestar los primeros síntomas de la enfermedad. Durante la fase eritrocítica, parte de los merozoitos pueden transformarse en gametocitos macho y hembra (gametogénesis), los cuales pueden ser absorbidos por un segundo mosquito donde se va a llevar a cabo la reproducción sexual, concretamente en el estómago, transformándose en zigotos. Tras un periodo de 1-3 semanas los nuevos esporozoitos formados se trasladan a las glándulas salivares, los cuales pueden volver a infectar a un nuevo huésped cuando el mosquito hembra vuelva a alimentarse de otro individuo (consultar Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019; Varo *et al.*, 2020).

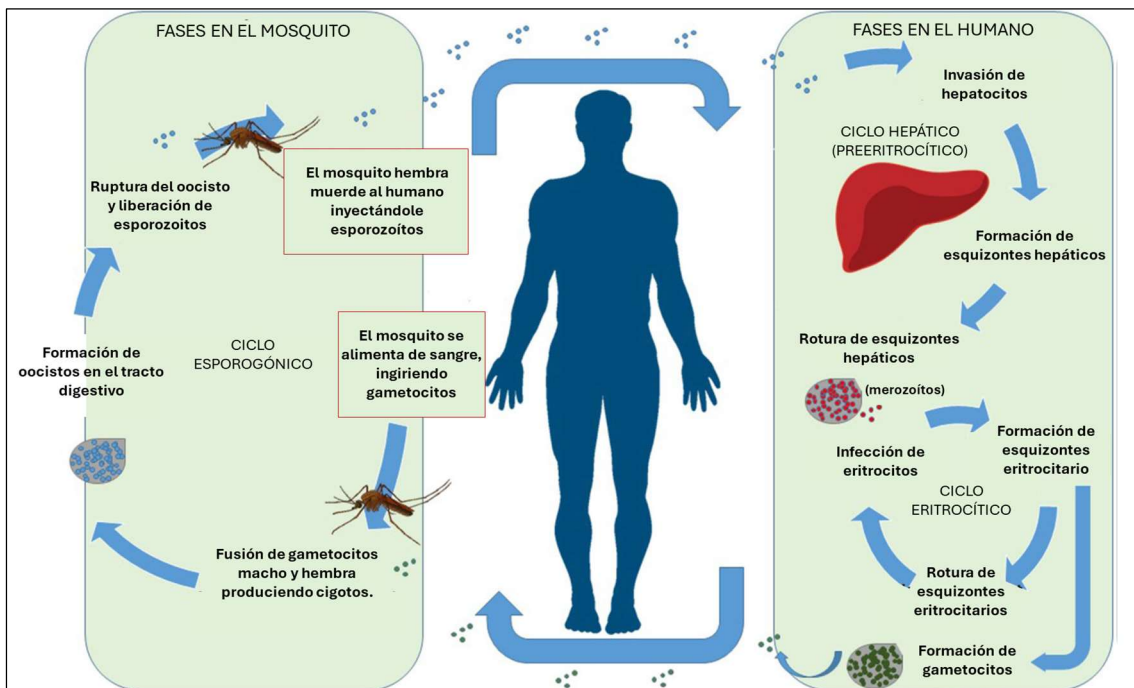


Figura 22. Ciclo vital del parásito *Plasmodium* en el mosquito y en el humano. Tomado de Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019 y modificado.

3.2. COMPLICACIONES CLÍNICAS Y FISIOPATOLOGÍA DE LA MALARIA

La malaria se caracteriza por picos de fiebre que se producen tras la ruptura de los eritrocitos, con una periodicidad variable en función de la especie de *Plasmodium* (consultar **Tabla 5**). Esta fiebre se acompaña de otros síntomas menos específicos como fatiga, dolor de cabeza, náuseas y vómitos, entre otros (Varo *et al.*, 2020).

Tabla 5. Prevalencia, características y complicaciones de las especies de *Plasmodium* que infectan a humanos.

Especie	Prevalencia	Duración de la fase eritrocítica	Citoaderencia y órganos afectados	Frecuencia de causar enfermedades graves y mortalidad	Complicaciones mayores
<i>P. falciparum</i>	Mundial, con alta prevalencia en África	48 h	Fuerte, en la mayoría de los órganos	A menudo causa enfermedades graves, altamente mortal	MC, AS, SDRA, acidosis, aumento de la permeabilidad intestinal, reducción del flujo hepático y fallo multiorgánico.
<i>P. vivax</i>	Asia, América Latina y algunas regiones de África	48 h	Débil, principalmente en pulmones	Sin complicaciones, ocasionalmente mortal	AS, SDRA, fracaso renal, rotura esplénica, disfunción hepática y síntomas gastrointestinales.
<i>P. ovale</i>	África y islas del Pacífico occidental	48 h	Ausente	Sin complicaciones, rara vez mortal	SDRA, fracaso renal y rotura esplénica
<i>P. malariae</i>	Mundial	72 h	Ausente	Sin complicaciones, rara vez mortal	Síndrome nefrótico
<i>P. knowlesi</i>	Sudeste asiático	24 h	Débil, en pulmones y probablemente en cerebro	Desde enfermedades sin complicaciones a graves	Aumento rápido de la parasitemia, SDRA, dolor abdominal, diarrea, vómitos, trombocitopenia grave, fallo multiorgánico, hipotensión, acidosis y hemorragia renal

MC, malaria cerebral; AS, anemia severa; SDRA, síndrome de distrés respiratorio agudo. Adaptado de Coban *et al.*, 2018 y de Gowda & Wu, 2018.

Las manifestaciones clínicas y la evolución de la patología varían en función de la especie del parásito, de la inmunidad del huésped y del tratamiento escogido, por lo que se establecen tres categorías principales: asintomática, leve o grave (Milner, 2018). Los pacientes asintomáticos son aquellos con parasitemia, pero sin sintomatología; los pacientes leves presentan parasitemia, que cursa con síntomas menores como fiebre y escalofríos, pero no hay evidencia clínica que indique gravedad o disfunción orgánica (Milner, 2018; Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019). En la mayor parte de los casos, la patología cursa como una infección asintomática o leve, destacando la efectividad de la respuesta inmune adaptativa; en estos casos, durante una infección inicial, la fagocitación de merozoitos por los macrófagos o la ruptura de los esquizontes produce la liberación de TNF α , que, junto con otras moléculas, son las responsables de los picos de fiebre durante la infección. Ante infecciones posteriores, la respuesta inmune adquirida mejora la eficiencia de los macrófagos en la producción de anticuerpos, y, de esta manera, los pacientes con malaria leve son capaces de eliminar más fácilmente el parásito, siempre que se trate adecuadamente con antimaláricos específicos (Milner, 2018; Fikadu & Ashenafi, 2023). Si la patología progresa da lugar a una malaria más severa, o grave, que cursa con anemia severa y fracaso multiorgánico, que afecta principalmente a los pulmones, los riñones y el cerebro, incrementando además el riesgo de muerte en los pacientes. En estos pacientes con malaria severa el diagnóstico se realiza, principalmente, en base a la presencia de una alta parasitemia (>10%), la aparición de coma persistente, anemia severa, ictericia y alteración del medio sanguíneo (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2019; Varo *et al.*, 2020; White, 2022). El cuadro clínico de la malaria severa (**Fig.23**): fiebre, anemia, acidosis, y coma, es el resultado del ciclo biológico del parásito junto con la respuesta fisiopatológica del huésped (Milner, 2018, White, 2022).

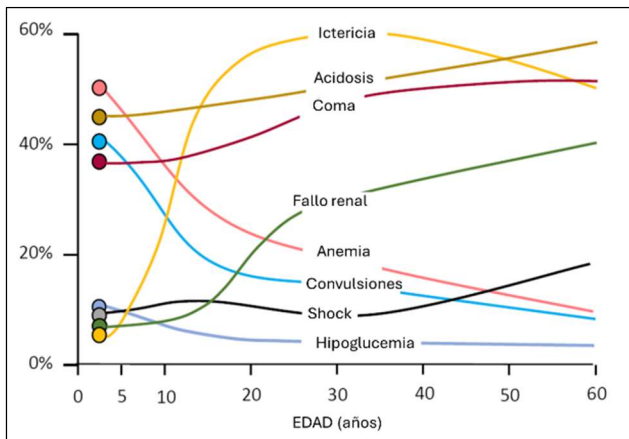


Figura 23. Proporciones de las complicaciones en los pacientes con malaria grave por *P. falciparum*. Tomado de White, 2022 y modificado.

La anemia se produce por la citoadhesión, la activación de la respuesta inmune, y los continuos ciclos de invasión y lisis de los eritrocitos durante la fase eritrocítica; se estima que por cada eritrocito infectado se eliminen 10 sanos, lo que contribuye al desarrollo de una anemia grave. Otros parámetros que contribuyen a la anemia son el secuestro de glóbulos rojos en el bazo y la producción anormal de los mismos en la médula ósea. En las zonas de elevada propagación la anemia es el principal síntoma de la malaria, y, se evalúa su gravedad en base a los niveles de hemoglobina en sangre (Perkins *et al.*, 2011; Coban *et al.*, 2018; White, 2022). La acidosis metabólica puede ser producida tanto por el incremento en la producción de lactato como por la disminución de su eliminación, y suele ir acompañada de hipoglucemia. El aumento en la producción de lactato puede deberse al metabolismo de los parásitos, al aumento de la glucólisis por las células inmunes activas, o al aumento de la glucólisis por las células y tejidos hipóxicos como consecuencia de la anemia; mientras que la disminución de su eliminación podría deberse a la disfunción hepática y al daño renal. Esta acidosis conlleva una disminución en el pH de la sangre, y, por tanto, a un aumento de la frecuencia respiratoria, a una hiperventilación y a dificultades respiratorias (para más información consultar Possemiers *et al.*, 2021).

La malaria es una enfermedad muy heterogénea que va a afectar a diferentes órganos vitales dependiendo de donde se acumulen los eritrocitos infectados (Scholfield & Grau, 2005; White, 2022; Fikadu & Ashenafi, 2023). La adhesión de estos glóbulos rojos infectados (GRI) al endotelio vascular (citoadhesión, ver **Tabla 5**) es el principal factor en la patogénesis de la malaria grave. En el caso de *P. falciparum* existen varias proteínas involucradas en la citoadhesión, destacando la proteína 1 de membrana de eritrocitos (*erythrocyte membrane protein 1 of Plasmodium falciparum*, PfEMP1), que se expresa en la membrana de los GRI y lleva a cabo la unión de estos a diferentes receptores

endoteliales (ver **Tabla 6**; consultar: Schofield & Grau, 2005; Fikadu & Ashenafi, 2023). La unión de los eritrocitos al endotelio evita que estos lleguen, a través de la circulación, al bazo para su posterior eliminación (Schofield & Grau, 2005; Gowda & Wu, 2018), y, además, los GRI pueden unirse también a eritrocitos no infectados formando rosetas que promueven la obstrucción microvascular, y, en ocasiones, podrían causar hipoxia (Coban *et al.*, 2018; Fikadu & Ashenafi, 2023).

Aunque los síntomas clínicos de la malaria se observen sólo en la etapa eritrocítica (y no en la preeritrocítica o hepática), en ambas fases se produce una respuesta inmunitaria innatas con el fin de conseguir una inmunidad adaptativa. Los parásitos producen diferentes moléculas, denominadas toxinas o productos bioactivos del parásito (**Tabla 6**), que se liberan de manera sincrónica tras la ruptura de los eritrocitos, lo que induce la activación del sistema inmune innato. Esta activación, que está implicada en la patogénesis de la malaria grave, ocurre mediante la interacción de dichas moléculas con los receptores celulares (TLRs, NLRs...) lo que conduce a la sobreproducción de citoquinas y quimioquinas (para más información revisar: Schofield & Grau, 2005; Gowda & Wu 2018). Tanto la anemia como la acidosis son resultado y causa de la desregulación de la respuesta inmune (Perkins *et al.*, 2011; Possemiers *et al.*, 2021).

El glucosilfosfatidilinositol (GPI) es un glucolípido esencial para la supervivencia del parásito, y un elemento clave en la patogenicidad de la malaria, al menos en el caso de *P. falciparum*. Su administración provoca, en modelos animales, los síntomas característicos de la malaria. GPI es necesario para el anclaje de los merozoitos a la membrana de los glóbulos rojos, y su detección, a través del heterodímero TLR1- TLR2 y, en menor medida de TLR4, aumenta la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas inicialmente tienen un papel protector en la defensa antimicrobiana, aunque su la sobreproducción puede causar fiebre, una mayor actividad de la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible, del inglés: *inducible nitric oxide synthase*) y un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, moléculas reconocidas por PfEMP1 que de esta manera reactiva la citoadhesión (Schofield & Grau, 2005; Gowda & Wu 2018; Fikadu & Ashenafi, 2023). El ADN y el ARN del parásito puede producir la activación de receptores endocíticos (TLR7, TLR9) induciendo la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. El reconocimiento de estos PAMPs también puede activar otras vías inflamatorias, al ser reconocido por receptores citosólicos (NLRP3), induciendo la activación de la caspasa 1 quien va a producir las formas maduras de la IL-1 β y la IL-18 (consultar: Gowda & Wu, 2018). Otro producto parasitario es la hemozoína, residuo derivado de la digestión de la hemoglobina por el parásito. Esta molécula ha demostrado

ser generalmente inmunosupresora ya que inhibe la proliferación de los leucocitos, causa disfunción de monocitos y macrófagos e induce la producción de IL-10 antiinflamatoria; sin embargo, también se ha observado que puede promover la inflamación al aumentar la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-12 (Schofield & Grau, 2005). La fagocitación de grandes cantidades de parásitos enteros y hemozoína causa acidificación del fagolisosoma y la muerte apoptótica de los macrófagos. La hemozoína también puede desestabilizar la membrana del fagolisosoma lo que causa la liberación de ácido nucleico y hemozoína al citosol donde son reconocidos por varios receptores entre ellos el NLRP3 lo que conlleva a la activación de la caspasa 1 y a la consecuente maduración de la IL-1 β , que induce fiebre. Los parásitos también producen ácido úrico, el cual se acumula en los eritrocitos y se libera al torrente sanguíneo cuando estos estallan, además, durante la malaria, la muerte de macrófagos y otras células inmunes también causa la liberación de este compuesto. Estos elevados niveles de ácido úrico van a contribuir a la activación del inflammasoma mediado por NLRP3 durante la malaria (para más información consultar: Gowda & Wu, 2018).

Tabla 6. Componentes y productos bioactivos del parásito.

	Receptor	Efectos patológicos y celulares
PfEMP1	ICAM1, VCAM1, CD31, CD36, E-selectina, TSP, CSA, EPCR y ácido hialurónico.	La unión dirige al parásito hacia el cerebro, la placenta y posiblemente otros órganos diana; se propone que la activación de CD36 suprime la activación de CD3 y macrófagos. Involucrado en la citoadhesión.
GPI	TLR1/2, TLR4 y lectinas tipo C.	Induce la expresión generalizada de genes que codifican proteínas proinflamatorias (incluidos TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, iNOS, ICAM1, VCAM1); activa células <i>natural killer</i> ; e induce la producción de citoquinas. Aumento de expresión de moléculas de adhesión.
ARN/ADN	TLR7, TLR9 y NLRP3	Activación de vías inflamatorias mediadas por caspasas (caspasa-1) y aumenta la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias (IFN-1, IL-1 β , IL-18)
Hemozoína	TLR9 y NLRP3	Inmunosupresión: inhibe proliferación de células inmunes y promueve la producción de IL-10. Inflamación: aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF α e IL-12. Activación de la caspasa-1 y liberación de citoquinas proinflamatorias.
Ácido úrico	NLRP3	Activación del inflammasoma: liberación de citoquinas proinflamatorias

PfEMP1, proteína 1 de membrana de eritrocitos de *P. falciparum*; GPI, glucosilfosfatidilinositol; ICAM1, molécula de adhesión intracelular 1; VCAM1, molécula de adhesión celular vascular 1; CD31, cluster de diferenciación 31; CD36, cluster de diferenciación 36; TSP, trombospondina; CSA, sulfato de condroitina A; EPCR: receptor de la proteína C endotelial; CD3, células dendríticas; TLR, receptor tipo *toll*; TNF α , factor de necrosis tumoral alpha; IL, interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; NLRP3: dominio pirina 3 de la familia NLR, IFN: interferón. Adaptado de Schofield & Grau, 2005 y Gowda & Wu, 2018.

Además del reconocimiento de los PAMPs (GPI, ADN y ARN) y de los DAMPs (hemozoína y ácido úrico), la fagocitación de los parásitos y la citoadhesión van a activar la respuesta inmune. Una de las vías es a través del receptor CD36 (expresado por macrófagos, células dendríticas, plaquetas y células endoteliales), que además de mediar la fagocitación del parásito, va a detectar a PfEMP1 induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas, TNF α . Otro receptor involucrado es el receptor de proteína C endotelial

(*endothelial protein C receptor*, EPCR), glicoproteína transmembrana localizada en los vasos sanguíneos. La unión de PfEMP1 a EPCR puede reducir el papel antiinflamatorio de este receptor además de incrementar la coagulación sanguínea, la respuesta inflamatoria y la apoptosis de las células endoteliales, disminuyendo la integridad de la barrera. La molécula de adhesión intracelular 1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM1), expresada en las células endoteliales, media la captación del parásito a través de PfEMP1 en el cerebro, lo que va a inducir una respuesta inflamatoria, infiltración celular y daño de la barrera celular. El papel de ICAM1 en el desarrollo de la malaria cerebral es incierto, ya que se ha observado en ratones deficientes en ICAM1 tienen una mayor supervivencia sin embargo en otro estudio demostró que era imprescindible para el desarrollo de la patología (consultar Gowda & Wu, 2018). La acumulación de eritrocitos parasitados va a producir una amplificación de la señal inflamatoria produciendo daño endotelial, infiltración de células inmunes y finalmente disfunción y fallo orgánico (Gowda & Wu, 2018; Coban *et al.*, 2018).

Algunas de las complicaciones que ocurren a consecuencia de los procesos previamente mencionados son el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), el fracaso renal agudo (FRA) o la malaria cerebral (Possemiers *et al.*, 2021; White, 2022). El SDRA se ha observado en varias especies del parásito y afecta a un gran número de pacientes adultos. Es una complicación grave que se asocia con un peor pronóstico, donde se ha demostrado inflamación alveolar y aumento de la permeabilidad de la capilaridad alveolar lo que resulta en edema pulmonar e hipoxemia severa (Van den Steen *et al.*, 2013). La alteración de la función renal puede aparecer tanto en niños como en adultos y se asocia con el fallo multiorgánico y un peor pronóstico (Katsoulis *et al.*, 2021; White, 2022). La hipovolemia y la disminución de flujo sanguíneo a nivel renal van a inducir hipoxia y disfunción endotelial que junto al estrés oxidativo y a la liberación de hemoglobina y moléculas proinflamatorias inducidas por la hemólisis contribuyen a una fuerte respuesta inflamatoria y la muerte celular a nivel renal. La necrosis tubular, nefritis intersticial y glomerulonefritis son características en el FRA inducido por malaria (consultar: Katsoulis *et al.*, 2021). Sin embargo, dos de las complicaciones más comunes durante la malaria grave son la malaria cerebral (MC) y la retinopatía malárica o palúdica (RM).

3.3. AFECTACIÓN DEL SNC POR LA MALARIA

3.3.1. Malaria cerebral (MC)

La infección por *P. falciparum* es la principal causa de MC, caracterizada por la aparición de fiebre alta, cefalea, delirio, confusión, convulsiones y coma (White, 2022). La MC es la encefalopatía no traumática más común en todo el mundo con una alta tasa de mortalidad (WHO, 2023).

La adhesión de los glóbulos rojos al endotelio puede causar una alteración en el correcto funcionamiento de la circulación sanguínea, ya que se ha descrito el secuestro de glóbulos rojos en la circulación cerebral en pacientes que fallecieron por MC (Silamut *et al.*, 1999; Lewallen *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2004). En un modelo murino de malaria se ha observado el secuestro de glóbulos rojos, y una disminución del flujo cerebral en estadios previos a la observación de una activación macroglial y microglial, y al aumento de marcadores inflamatorios y apoptóticos, lo que sugeriría que la neuroinflamación fuera un evento tardío causado por la acumulación de GRI (Oelschlegel *et al.*, 2024). Por el contrario, dado que en otras patologías como la encefalopatía séptica, que cursa sin secuestro de glóbulos rojos, pero con inflamación sistémica, y que presenta un cuadro clínico similar al de la MC, se ha propuesto una posible alternativa en la que son las elevadas concentraciones de citoquinas, óxido nítrico y ácido láctico las que median el coma y la muerte en los pacientes con MC (revisar: Clark *et al.*, 2006).

3.3.2. Retinopatía Malárica (RM)

La retinopatía malárica (RM) presenta una mayor prevalencia en niños, y está principalmente asociada a las infecciones por *P. falciparum*. En adultos se ha observado que un 63% de los pacientes con malaria grave presentaban RM, y entre los pacientes con MC el porcentaje aumentaba al 70% (Maude *et al.*, 2009). En estos pacientes se observan anomalías en los vasos, blanqueamiento de la retina, hemorragias, papiledema y manchas algodinosas (Beare *et al.*, 2006; Maude *et al.*, 2009). Se han descrito también casos en los que la RM aparece sin observarse afectación cerebral (Lakhotia *et al.*, 2015; Verma & Krishna 2015), o en casos menos graves de malaria (Maude *et al.*, 2009).

Dadas las similitudes entre la retina y el cerebro es muy probable que ambos tejidos compartan procesos patológicos, siendo más vulnerables al secuestro de eritrocitos infectados (MacCormick *et al.*, 2014). En este sentido se han descrito hemorragias, anomalías en la BHR y en la BHE, así como daño axonal en ambas patologías (**Fig.24**, Greiner *et al.*, 2015).

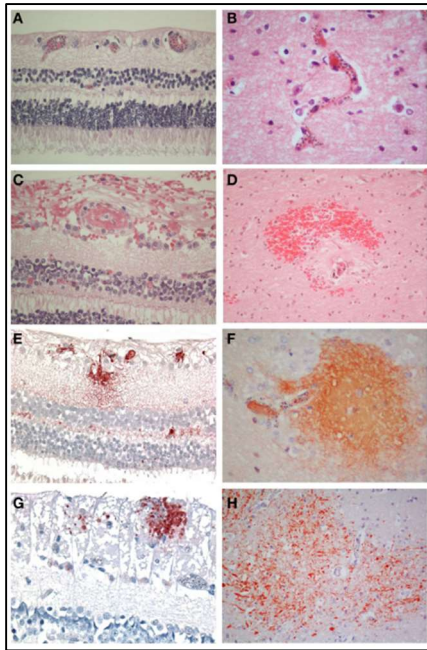


Figura 24. Comparación de los signos encontrados en la retina (panel izquierdo) y en el cerebro (panel derecho) de niños con MC. (A) Parásitos secuestrados en los vasos de la capa de células ganglionares y en la capa nuclear interna. (B) Parásitos secuestrados en la corteza cerebral. (C) Un vaso de la retina con trombo y rodeado de hemorragia. (D) Hemorragia en la sustancia blanca con un microvaso con trombo y gránulos de hemozoína. (E) Extravasación de fibrinógeno en la retina (F) en el cerebro debido a una gran acumulación de glóbulos rojos infectados. (G) Daño axonal en la capa de células ganglionares y (H) daño axonal difuso en la sustancia blanca. (A-D) Tinción de hematoxilina-eosina. (E, F) Tinción del fibrinógeno. (G, H) Tinción con β -APP (proteína precursora del beta-amiloide). (A-C, E, F, H) 400 aumentos. (D, H) 200 aumentos. Tomado de Greiner et al., 2015.

Son numerosos los casos de pacientes con malaria, o recuperados de la misma, que presentan pérdida de visión o alteraciones en la agudeza visual, uni o bilateral, siendo en muchos casos estas secuelas no reversibles. Además, en las evaluaciones oftalmológicas se han descrito manchas algodonosas, hemorragias, zonas de blanqueamiento junto con alteraciones en las capas, en el flujo sanguíneo y en los vasos en valoraciones por TCO (Maude *et al.*, 2014; Lakhotia *et al.*, 2015; Verma & Krishna 2015; Nanfack *et al.*, 2017; Bezzina *et al.*, 2024). El diagnóstico precoz del daño en la retina asociado a la malaria es esencial para prevenir el desarrollo de una posible ceguera (Verma & Krishna, 2015), además, en regiones endémicas permite realizar un diagnóstico diferencial frente a otras enfermedades tropicales o que cursen con coma (Brodeur *et al.*, 2023). El seguimiento de la malaria mediante técnicas de imagen no invasiva puede ser de gran interés para valorar la progresión y severidad del daño (Barrera *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2023). Ya que se ha descrito que la aparición de RM en los pacientes diagnosticados con MC podría ser un índice predictivo de la duración del coma y del riesgo de muerte (Lewallen *et al.*, 1996; Beare *et al.*, 2004, 2006).

3.4. MODELOS ANIMALES DE MALARIA

Los modelos animales en roedores y en primates no humanos (ver **Tabla 7**) han sido y son fundamentales para avanzar en el conocimiento de la malaria, tanto de los mecanismos patogénicos y de la respuesta inmune asociada, como en el desarrollo de nuevas terapias y vacunas. Estos modelos animales son ampliamente utilizados debido a

las similitudes que comparten con la enfermedad en humanos en cuanto a la sintomatología clínica y a la respuesta inmune (Langhorne *et al.*, 2011; Simwela & Waters, 2022). Estos han sido cruciales a la hora de estudiar la farmacocinética y la eficacia de nuevas terapias y tratamientos *in vivo*; y en la predicción de fracasos en el desarrollo de vacunas (Langhorne *et al.*, 2011). Sin embargo, las diferencias entre huéspedes (roedor, primate y humano) y la divergencia entre las diferentes especies del parásito *Plasmodium*, complican la extrapolación de los datos y su traslación a la clínica (Simwela & Waters, 2022). Una vez más se hace esencial la comunicación y la transferencia de información entre investigadores básicos y clínicos para perfeccionar los modelos y mejorar la traslación de las terapias (Langhorne *et al.*, 2011; Craig *et al.*, 2012). La investigación *in vitro* también ha resultado esencial para el conocimiento sobre la biología del parásito y el desarrollo de antimaláricos, aunque el organismo vivo, en esta patología, resulta crucial para entender el ciclo de vida del parásito incluyendo el secuestro de eritrocitos, la alteración del flujo sanguíneo y el ambiente inmune (Langhorne *et al.*, 2011; Simwela & Waters, 2022). En los modelos en roedor, ratón y rata, los más frecuentes, se han inoculado 4 especies del parásito diferentes (*P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*, y *P. vinckei*, ver **Tabla 7**), y, más recientemente, mediante al desarrollo de ratones humanizados, se ha conseguido infectar a ratones con *P. falciparum*, generando un modelo con un valor traslacional mucho mayor (Simwela & Waters, 2022).

Tabla 7. Aplicaciones de los modelos animales de malaria.

Modelo	Especie de <i>Plasmodium</i>	Forma de la enfermedad	Aplicaciones comunes
Roedores (ratones y ratas)	<i>P. berghei</i>	Provoca una enfermedad grave (anemia, MC). La patología de la enfermedad varía entre las cepas de <i>P. berghei</i> y las líneas de ratones.	Modelo de MC experimental, evaluación de la eficacia de fármacos <i>in vivo</i> , modelo para otras formas graves de malaria (anemia, malaria placentaria).
	<i>P. yoelii</i>	Puede provocar una enfermedad grave (anemia, MC). Hay diferencias significativas en la patología y severidad de la enfermedad según las cepas.	Modelo primario para el estudio de la interacción entre receptor-parásito, mecanismos inmunes en la malaria en fase sanguínea y desarrollo de vacunas, patogénesis y MC experimental.
	<i>P. chabaudi</i>	Generalmente no es fatal y resulta en una infección crónica.	Mecanismos inmunes, modelo de resistencia a fármacos y eficacia, variaciones antigénicas, patogénesis general de la enfermedad.
	<i>P. vinckei</i>	Aparentemente fatal, aunque la mayoría de los estados patológicos no han sido estudiados extensivamente.	Mecanismos inmunes, modelo de resistencia a fármacos y eficacia, patogénesis general de la enfermedad.
Ratones humanizados	<i>P. falciparum</i>	Patología estándar de la malaria (no severa).	Biología preeritrocítica de los parásitos de la malaria, desarrollo de vacunas para la infección en fase sanguínea.
Primates no humanos	<i>P. falciparum</i> (cepas GB4, FVO, FUP)	Patología estándar de la malaria, anemia grave.	Evaluaciones de la eficacia de vacunas contra la malaria, modelo de anemia humana inducida por malaria, evaluaciones de la eficacia de fármacos.
	<i>P. knowlesi</i>	Patología estándar de la malaria, extremadamente fatal si no se trata.	Estudios de virulencia, inmunidad a la malaria, variación antigénica, biología de la invasión del merozoito y otras patologías de la malaria.
	<i>P. coatneyi</i>	Patología de la malaria similar a <i>P. falciparum</i>	Modelo importante para estudiar la fisiopatología de la malaria grave.
	<i>P. cynomolgi</i>	Malaria leve que se asemeja a la infección en humanos por <i>P. vivax</i> .	Modelo más confiable para estudiar la malaria humana causada por <i>P. vivax</i> .

MC, malaria cerebral. Adaptada de Simwela & Waters, 2022

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado como modelo animal la infección con *Plasmodium berghei* ANKA en ratones C57BL/6, ya que es el modelo más utilizado para el estudio de la MC (Ghazanfari *et al.*, 2019). A pesar de que el nivel de secuestro de glóbulos rojos en el cerebro es bajo, al contrario de lo que ocurre en la enfermedad en humanos, este parásito causa una acumulación de células inflamatorias, y funciona relativamente bien modelizando los síntomas neurológicos más característicos de esta patología (Langhorne *et al.*, 2011; Strangward *et al.*, 2017; Simwela & Waters, 2022). La infección con *P. berghei* en ratones produce disrupción de la BHE, hemorragias, inflamación y daño en la mielina de forma similar a lo observado en humanos; siendo, por tanto, un buen modelo para estudiar los eventos producidos tras la acumulación de GRI (Strangward *et al.*, 2017, 2018). En los modelos experimentales de MC se ha observado, tras la acumulación de GRI, un aumento del número de células microgliales y una activación tanto de las células microgliales como macrogliales, lo cual se asocia con el aumento posterior de moduladores inflamatorios, tales como citoquinas y quimioquinas y la estimulación de procesos apoptóticos; eventos que preceden al desarrollo de los síntomas característicos de la MC (consultar **Tabla 8**).

En estos modelos animales también se ha estudiado la afectación de la retina (ver **Tabla 9**). En ratones infectados con *P. berghei* se ha detectado la presencia del parásito dentro de vasos retinianos, e incluso dentro de las capas de la retina; y se ha sugerido la ruptura de la BHR, tal y como se observa en el caso de la BHE. En este modelo se ha podido también observar los síntomas característicos de la RM mediante técnicas no invasivas de imagen (**Fig.25**), tales como áreas blanquecinas que sugieren una reducida perfusión sanguínea; o edema retiniano por una alteración en el drenaje de los vasos sanguíneos (Paquet-Durand *et al.*, 2019). En la retina la activación de las poblaciones gliales también se produce antes del desarrollo de los síntomas, lo que significa que juegan un papel importante en la patogenia de la RM (Medana *et al.*, 1996; Medana *et al.*, 1997a).

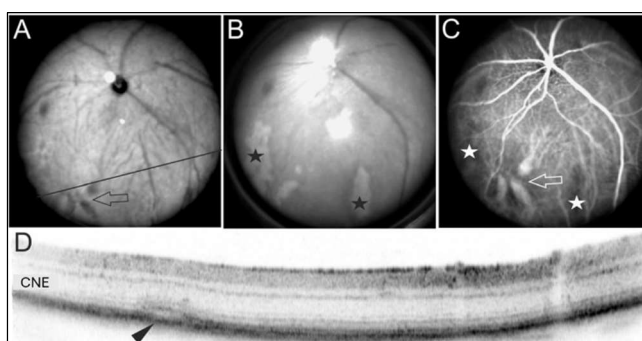


Figura 25. Alteraciones producidas en la retina en un modelo de RM por *P. berghei* ANKA en ratones. Imágenes tomadas mediante oftalmoscopia de láser de barrido (A-B) y angiografía (C): dilatación vascular (flechas), blanqueamiento retiniano (estrellas). (D) Tomografía de coherencia óptica: edema (punta de flecha). CNE, capa nuclear externa. Barra de aumentos: 200 μ m. Tomada de Paquet-Durand *et al.*, 2019 y modificada.

Tabla 8. Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la inoculación de *P. berghei* en el cerebro de ratones.

Ratones (cepa, sexo)	Parásito (cepa, dosis, vía)	Tiempo de evaluación	Efecto observado	Referencia
CBA/T6	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	7d	↑Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα)	Medana <i>et al.</i> , 1997b
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 5x10 ⁴ GRI, i.p.)	6d-7d	↑Monocitos adheridos a los vasos	Clark <i>et al.</i> , 2005
			↑Células GFAP ⁺	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	Células microgliales con morfología ameboide	Zhu <i>et al.</i> , 2015
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	7d	d4: <10%; d6: <20%; d7: <25%	Capuccini <i>et al.</i> , 2016
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁵ GRI, i.p.)	7d	↓Células neuronales	Miranda <i>et al.</i> , 2016
			Alteración de la morfología neuronal	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d	d6: <5%; d10: ≈15%	Sarkar <i>et al.</i> , 2017
			Parasitemia	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	8d	↑Permeabilidad	Strangward <i>et al.</i> , 2017
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	7d	↑Infiltración celular	Strangward <i>et al.</i> , 2018
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	↑Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNFα)	Ataide <i>et al.</i> , 2020
			Parasitemia	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	↑Expresión de genes de proliferación celular, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias	Mukherejee <i>et al.</i> , 2022
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Células microgliales	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	d4: <10%; d5: <15%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	7d	↑Expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNFα)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	8d	↑Niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNFα)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	d5: <10%; d6: <15%; d8: <20%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	Acumulación de GRI	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Oclusión de vasos	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	↑Expresión génica y proteica de TLR4, IL-17 y TNFα	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	↓Expresión génica y proteica IL-10	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	↑GFAP	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Activación macroglial	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	↑CD11; agregación de células microgliales	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Activación microglial	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	7d	↓NeuN	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neurodegeneración	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	7d	d4: <1%; d7: <10%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	↑Carga parasitaria en el cerebro	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Acumulación	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	Acumulación de GRI principalmente en los capilares	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Oclusión de vasos	
C57BL/6 (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁴ GRI, i.v.)	8d	↑Células inmunes en los vasos	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
Swiss (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d	↑Permeabilidad; ↑Edema; Hemorragias	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	d6: <5%; d8: <10%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	Acumulación de GRI	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Oclusión de vasos	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Células inmunes en los vasos	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Permeabilidad; ↑Edema; Hemorragias	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	d6: <20%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Permeabilidad; ↑Edema; Hemorragias	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	Acumulación de GRI	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Oclusión de vasos	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Células inmunes en los vasos	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Permeabilidad	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα, IFNγ), quimioquinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM1)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	10d	↑Niveles de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IFNγ)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	d4: <5%; d6: <10%; d7: <15%	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Parasitemia	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Carga parasitaria en el cerebro	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Acumulación del parásito	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	Acumulación de GRI; ↓Flujo (RM)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Oclusión de vasos	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Permeabilidad; ↑Edema; Hemorragias	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Ruptura de la BHE	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Infiltración celular	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Expresión génica de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias (TNFα)	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Neuroinflamación	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑GFAP	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Activación macroglial	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Iba1	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Activación microglial	
C57BL/6 y BALB/c (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	↑Caspasa-3	Oelschlegel <i>et al.</i> , 2024
			Apoptosis	

Datos obtenidos de diferentes regiones cerebrales. GRI: glóbulos rojos infectados; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso; d: día; BHE: barrera hematoencefálica; RM: resonancia magnética; IL: interleuquina; NeuN: proteína de unión a hexaribonucleótidos-3; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado; TNFα: factor de necrosis tumoral alpha; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; IFNγ: interferón gamma; CD11: cluster de diferenciación 11; TLR4: receptor tipo *Toll* 4.

Tabla 9. Principales resultados encontrados en la literatura sobre los efectos de la inoculación de *P. berghei* en la retina de ratones

Ratones (cepa, sexo)	Parásito (cepa, dosis, vía)	Tiempo de evaluación	Metodología	Efecto obtenido	Referencia	
CBA y DBA (♀ y ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d-7d	<i>Ex vivo</i>	Tinción de Hoechts	↓Integridad endotelial ↓Viabilidad de las células endoteliales	Neill <i>et al.</i> , 1993
				Tinción de azul de Evans	↑Permeabilidad: Ruptura BHR Disminución de la perfusión retiniana	
				Tinción H-E	↑Permeabilidad: Edema	
				Tinción de azul de monastral	↑Monocitos ↑Actividad fagocítica ↑Adhesión: Neuroinflamación	
CBA/T6 (♀)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	7d	<i>Ex vivo</i>	Tinción de azul de Evans	↑Permeabilidad: Ruptura BHR	Ma <i>et al.</i> , 1996
				Tinción HRP	↑Permeabilidad: Ruptura BHR	
				Tinción HRP-Azul de toluidina	↑Edema (CFNO, CCG,CPI): Ruptura BHR Oclusión de vasos	
				IHQ- VCAM1/ICAM1	↑ICAM1 ↑VCAM1: Neuroinflamación	
CBA/T6	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	6d-7d	<i>Ex vivo</i>	IHQ-GFAP	↑GFAP, apariencia gliótica: Activación macroglial	Medana <i>et al.</i> , 1996
				Tinción de azul de monastral	↑Monocitos activados en la circulación retiniana: Neuroinflamación	
CBA/T6	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	5d-7d	<i>Ex vivo</i>	Tinción de azul de monastral	↑Monocitos ↑Adhesión ↑Extravasación : Neuroinflamación	Medana <i>et al.</i> , 1997a
				Histología - lectina GS / NDPasa	↑Células microgliales, morfología amebode: Activación microglial	
CBA/T6	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	7d	<i>Ex vivo</i>	Tinción de azul de Evans	↑Permeabilidad: Ruptura BHR	Medana <i>et al.</i> , 2000
				Histología - lectina GS / NDPasa	↑Células microgliales, morfología amebode: Activación microglial	
C57Bl/6 (♀ ♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.p.)	4d-7d	<i>In vivo</i>	ERG	Disminución de la amplitud.	Oliveira <i>et al.</i> , 2017
				ELISA (citoquinas)	Sin cambios	
			<i>Ex vivo</i>	Espectrofotometría	↓GSH: Estrés oxidativo	
				Ensayo de captación	↑Captación de glutamato: Estrés oxidativo	
C57Bl/6 (♂)	<i>P. berghei</i> (ANKA, 10 ⁶ GRI, i.v)	6d	<i>In vivo</i>	Presencia del parásito (capas vasos y retinianos)		Paquet-Durand <i>et al.</i> , 2019
				Engrosamiento de los vasos.		
				Anormalidad en la perfusión.		
			<i>Ex vivo</i>	↑Edema: Ruptura de la BHR		
				Alteraciones en el grosor		
				Áreas opacas y pálidas: Blanqueamiento		
ERG		Sin cambios				
Histología		Presencia del parásito tanto en la zona vascular como avascular: Extravasación				
IHQ - GFAP		↑GFAP: Activación macroglial				
IHQ-TUNEL		↑Células TUNEL* (CNE, CNI y CCG): Neurodegeneración				
IHQ-Caspasa-3		Sin marcaje				

GRI: glóbulos rojos infectados; i.p.: intraperitoneal; i.v.:intravenosa; d: día; H-E: hematoxilina-eosina; HRP: *horseradish peroxidase* ; IHQ: inmunohistoquímica; VCAM1: molécula de adhesión vascular 1; ICAM1: molécula de adhesión intracelular 1; TCO: tomografía de coherencia óptica; OLB: oftalmoscopia de láser de barrido; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; ERG: elctroretinograma; ELISA:Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas; GS: *Griffonia simplicifolia* ; NDPasa: nucleosido difosfatasa; BHR: barrera hematorretiniana; CFNO: capa de fibras del nervio óptico; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; GSH: glutatión; NO: nervio óptico.

La extensa caracterización de la MC y la RM en modelos murino de infección por *P. berghei* (Paquet-Durand *et al.*, 2019; Oelschlegel *et al.*, 2024) proporciona evidencias sólidas para el empleo de este modelo en el estudio de las alteraciones producidas por la malaria en las poblaciones neuronales y gliales a lo largo de los principales núcleos de la vía visual, así como para evaluar la posible eficacia de fármacos y terapias que puedan ejercer efectos antiinflamatorios y neuroprotectores y así evitar y/o mitigar las secuelas producidas por el parásito de la malaria.

3.5. DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA MALARIA

EL diagnóstico de la malaria y su posterior manejo son complejos ya que la patología cursa con un amplio rango de síntomas inespecíficos. De forma general, el diagnóstico de la patología se lleva a cabo mediante la realización de frotis sanguíneos y su posterior observación al microscopio lo que permite confirmar la presencia del parásito en la sangre y cuantificar la parasitemia (Varo *et al.*, 2020; Fikadu & Ashenafi 2023). Sin embargo, en el caso de infecciones por *P. falciparum* esta técnica subestima la parasitemia (White, 2022) por lo que se están implementando otras metodologías de diagnóstico, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa; del inglés: *polymerase chain reaction*); sin embargo, la PCR es una técnica muy costosa que ha de realizarse en el laboratorio (White, 2022; Fikadu & Ashenafi, 2023). Y que, en áreas endémicas, en casos agudos no resulta útil ya que genera un elevado porcentaje de falsos positivos (White, 2022). Por otro lado, el manejo de la malaria implica tanto enfoques preventivos, como el control de vectores, quimiopprofilaxis, vacunas; como curativos (WHO, 2023).

Una de las primeras medidas es el control de los vectores, por ejemplo, a través del empleo de mosquiteras tratadas con o sin insecticidas; estas mosquiteras proporcionan una barrera física contra los insectos, y puede ir acompañada del uso de insecticidas que incrementa la protección frente a estos insectos. Se emplea también la quimiopprofilaxis, o toma de fármacos profilácticos contra el parásito, bien en su etapa hepática o preeritrocítica (profilaxis causal), o en su etapa sanguínea o eritrocítica (profilaxis supresiva), cuyo consumo ha de mantenerse durante al menos 4 semanas tras el contacto con el parásito. La toxicidad asociada a la quimiopprofilaxis y la resistencia del parásito frente a los antimaláricos ha impulsado el desarrollo de vacunas (para revisión consultar: Arora *et al.*, 2021; Fikadu & Ashenafi, 2023); vacunas que desde 2021 la OMS recomienda administrar en niños, en regiones de alta transmisión de *P. falciparum* (WHO, 2023).

En el tratamiento de la malaria se emplean antimaláricos que pueden agruparse en tres categorías dependiendo de su estructura y/o mecanismo de acción: los derivados de la quinolona, antifolatos y derivados de la artemisinina. La OMS recomienda la combinación de, al menos, dos fármacos antimaláricos con diferentes mecanismos de acción para evitar la aparición de la resistencia a estos medicamentos (Fikadu & Ashenafi, 2023). El artesunato, derivado de la artemisina, está siendo ampliamente utilizado y ha mejorado notablemente la tasa de mortalidad producida por la malaria severa y la malaria cerebral; sin embargo, la tasa de mortalidad sigue siendo alta y las complicaciones neurológicas persisten. De forma adicional, se están estudiando diferentes terapias adyuvantes

(corticoides, transfusiones sanguíneas, terapias anti-TNF), que no están jugando un papel esencial en la reducción de la mortalidad y el daño neurológico (Varo *et al.*, 2020). Es, por tanto, aún necesario la búsqueda e investigación de fármacos que pueden resultar de utilidad para el tratamiento de la malaria. Hoy en día la malaria sigue suponiendo un enorme problema de salud pública, principalmente en aquellas áreas donde la transmisión es más elevada, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevos tratamientos que reduzcan la tasa de mortalidad y las complicaciones neurológicas asociadas a la misma.

4. CILASTATINA

La **cilastatina (CIL)** es la sal monosódica del ácido {R-[R*, S*-(Z)]}-7-[(2-amino-2-carboxietil)tio]-2-[[2,2-dimetilciclopropil)carbonil]amino]-2-hepteonico. Su fórmula empírica es $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$ (**Fig.26**) y tiene un peso molecular de 380,44 Da (Clissold *et al.*, 1987).

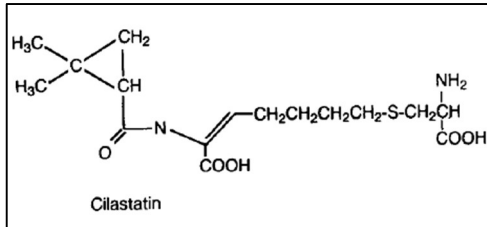


Figura 26. Estructura química de la cilastatina. Tomado de Clissold *et al.*, 1987.

Es un fármaco que actúa como inhibidor de la enzima **dehidropeptidasa renal I (DHP-I, DPEP1)**, y que se utiliza desde el año 1985 en combinación con el antibiótico de amplio espectro imipenem (**Fig.27**) para el tratamiento de infecciones bacterianas (consultar: Clissold *et al.*, 1987). La DHP-I es una glicoproteína, localizada en el borde en cepillo de las células renales, principalmente en las balsas de colesterol (Parkin *et al.*, 2001), cuya función principal es la de hidrolizar dipéptidos presentes en el filtrado glomerular, facilitando la reabsorción de aminoácidos en el túbulo proximal (Campbell *et al.*, 1966; Adachi *et al.*, 1990). La inhibición de la DHP-I renal previene la hidrólisis del anillo beta-lactámico del imipenem y su degradación (Kropp *et al.*, 1982) aumentando su concentración plasmática y la recuperación urinaria del antibiótico del 7,7%-43% al 72%, sin alterar su vida media (Norrby *et al.*, 1983).

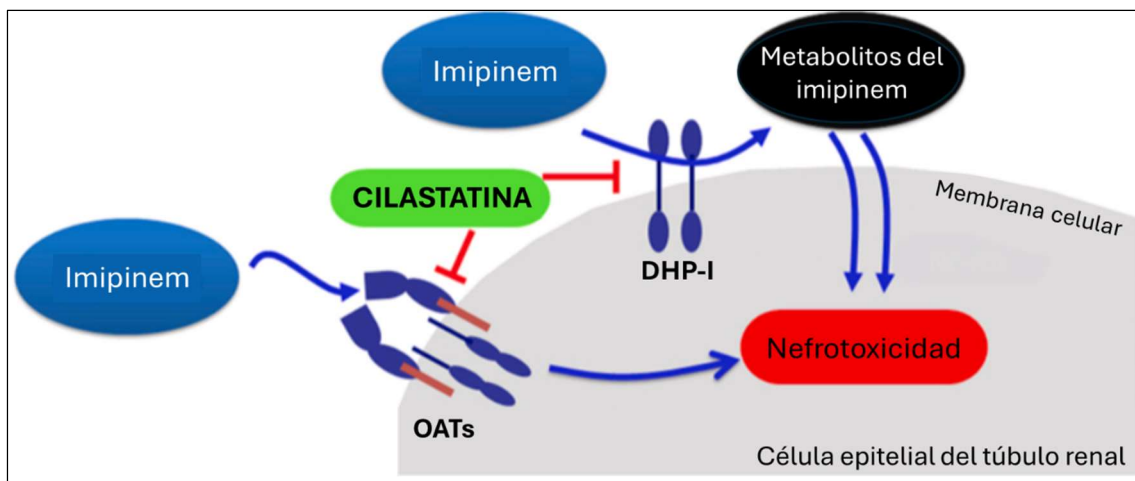


Figura 27. Mecanismo de entrada del imipenem a las células epiteliales del túbulo renal y acción de cilastatina. La dehidropeptidasa I (DHP-I) se localiza en las células epiteliales del túbulo renal. La degradación del antibiótico imipenem por la DHP-I produce una serie de metabolitos los cuales pueden entrar al interior de las células; otro mecanismo de entrada del imipenem es a través de los transportadores de aniones orgánicos renales (*organic anion transporters*, OATs). La acumulación de estos fármacos, o de sus metabolitos en las células epiteliales produce nefrotoxicidad. La administración conjunta con cilastatina evita este daño renal gracias a la inhibición de la enzima DHP-I o al bloqueo de los OATs. Tomado de Huo *et al.*, 2019 y modificado.

4.1. PROTECCIÓN DE LA CILASTATINA FRENTE AL FRA

Los primeros estudios que demostraron el papel nefroprotector de CIL frente a fármacos tóxicos fueron llevados a cabo en la década de los 80 y 90 utilizando la combinación de imipenem/cilastatina o bien sólo CIL (consultar Shayan & Elyasi, 2020). La combinación de CIL con imipenem ha demostrado su efecto nefroprotector frente a inmunosupresores como la ciclosporina en pacientes sometidos a un trasplante de corazón (Markewitz *et al.*, 1994) o de médula ósea (Gruss *et al.*, 1996). Recientemente nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un estudio clínico observacional retrospectivo/prospectivo en pacientes oncológicos tratados con cisplatino en los que este tratamiento combinado consiguió una mejora en la función renal de estos pacientes (Zaballos *et al.*, 2021). Además, tras demostrar su seguridad en pacientes sanos en un ensayo clínico en fase I (NCT03595189); se ha iniciado un nuevo ensayo (en curso, EudraCT Number: 2022-001417-39, fase II) con el fin de confirmar su potencial como nefroprotector.

Nuestro grupo de investigación ha profundizado también en los mecanismos de nefroprotección de CIL mediante el empleo de diversos modelos animales de inducción de FRA (ver **Tabla 10**) descubriendo importantes propiedades **antiapoptóticas, antioxidantes y antiinflamatorios**. Estos hallazgos han sido respaldados por otros autores en otros modelos de daño renal por isquemia/reperfusión (Hong *et al.*, 2020; Funahashi *et al.*, 2024).

En los últimos años, se ha investigado el mecanismo de acción de la CIL en la nefroprotección, destacando su capacidad para atenuar la activación de las vías inflamatorias y apoptóticas. CIL ha demostrado producir cambios en la fluidez de las balsas lipídicas (Pérez *et al.*, 2004), estructuras celulares que tienen un papel esencial en el transporte a través de la membrana plasmática (Zajchowski & Robbins, 2002). De esta manera, CIL es capaz de limitar el correcto acoplamiento de los ligandos a sus receptivos receptores como por ejemplo Fas (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012; Jado *et al.*, 2020) o TLR4 (González-Nicolás *et al.*, 2022), inhibiendo diferentes rutas inflamatorias, como la vía NF- κ B (Humanes *et al.*, 2017; González-Fernández *et al.*, 2022) o la activación del inflammasoma mediado por NLRP3 (González-Nicolás, 2022), así como la vía extrínseca de la apoptosis, favoreciendo la supervivencia celular, ejerciendo así mecanismos de protección frente al FRA (Camaño *et al.*, 2010; Humanes *et al.*, 2012; Jado *et al.*, 2020; González-Nicolás, 2022).

Tabla 10. Principales resultados de nuestro grupo en relación con los mecanismos de acción propuestos para cilastatina en el ámbito de la nefrotoxicidad

Modelo	Estudio	Efecto	Evidencias	Referencia
Nefrotoxicidad (ciclosporina)	<i>In vitro</i>	Nefroprotector	↑Viabilidad celular ↓Degradación DNA	Pérez <i>et al.</i> , 2004
Nefrotoxicidad (vancomicina)	<i>In vitro</i>	Nefroprotector	↑Viabilidad celular ↓Degradación DNA	Humanes <i>et al.</i> , 2015
		Anti-apoptótico	↓ Células Anexina V ⁺ /IP ⁺	
Nefrotoxicidad (gentamicina)	<i>In vitro</i>	Nefroprotector	↓Degradación DNA	Jado <i>et al.</i> , 2020
		Anti-apoptótico	↓ Caspasa-3	
	Nefroprotector	↓Cre _s ↓NUS ↑TFG ↓KIM-1 ↓Alteraciones morfológicas		
	Anti-apoptótico	↓Ratio Bax/Bcl2 ↓Caspasa-3 / 9 ↓Fas y FasL		
	Antioxidante	↓Células TUNEL ⁺ ↑CAT / SOD ↓4-HNE		
	Anti-inflamatorio	↓TNFα ↓Células CD68 ⁺ ↓VCAM1		
Nefrotoxicidad (cisplatino)	<i>In vitro</i>	Nefroprotector	↑Viabilidad ↓Degradación DNA	Camaño <i>et al.</i> , 2010
		Anti-apoptótico	↓Liberación LDH ↓Caspasa-3 / 8 / 9	
Nefrotoxicidad (cisplatino)	<i>In vivo</i>	Nefroprotector	↓Cre _s ↓NUS ↑TFG ↓Diuresis ↓Alteraciones morfológicas	Humanes <i>et al.</i> , 2012
		Anti-apoptótico	↓ Caspasa-3 / 8 / 9 ↓Fas y FasL ↓Ratio Bax/Bcl2 ↓Células TUNEL+	
		Antioxidante	↑CAT ↓H ₂ O ₂ (EROs)	
		Anti-inflamatorio	↓Cre _s ↓NUS ↑TFG ↓KIM-1 ↓Alteraciones morfológicas ↓NF-Kb	
Nefrotoxicidad (cisplatino)	<i>In vivo</i>	Anti-inflamatorio	↓MCP-1 / IL-6/ TNF-α ↑IL-10 ↓Células CD68 ⁺ ↓VCAM1 / ICAM1	Humanes <i>et al.</i> , 2017
		Nefroprotector	↓Cre _s ↓NUS ↑TFG ↓Diuresis ↓Alteraciones morfológicas	González-Fernández <i>et al.</i> , 2022
Nefrotoxicidad (cisplatino)	<i>In vivo</i>	Anti-inflamatorio	↓NF-Kb ↓TNFα	
		Nefroprotector	↓Cre _s ↓NUS ↓Alteraciones morfológicas	Moreno-Gordaliza <i>et al.</i> , 2024
Antioxidante	↓4-HNE			
Anti-inflamatorio	↓Células CD68 ⁺			
Sepsis (CLP)	<i>In vivo</i>	Nefroprotector	↓Cre _s ↓NUS ↑TFG ↓KIM-1 ↓Alteraciones morfológicas	González-Nicolás, 2022
		Anti-apoptótico	↓Caspasa-3 / 8 / 9 ↓Fas y FasL ↓Ratio Bax/Bcl2 ↓Células TUNEL ⁺	
Rabdomiólisis (glicerol)	<i>In vivo</i>	Antioxidante	↑CAT / SOD ↓4-HNE	González-Nicolás, 2022
		Anti-inflamatorio	↓TLR4 ↓NF-KB ↓CD68 / MCP-1 ↓NLRP3 / Caspasa-1 / IL-1β ↓VCAM1 / ICAM1	

En la tabla se muestran de forma resumida las principales evidencias obtenidas por el grupo de investigación sobre el papel de la CIL en cultivos celulares o en modelos animales de daño renal. CLP: ligadura y punción cecal; LDH: lactato deshidrogenasa; IP: propidio yoduro; Cres: creatinina sérica; NUS: nitrógeno uréico en sangre; TFG: tasa de filtración glomerular; KIM-1: molécula de lesión renal 1; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; 4-HNE: 4-hidroxinonena; TNFα: factor de necrosis tumoral alpha; CD68: cluster de diferenciación 68; VCAM1: molécula de adhesión vascular 1; ICAM1: molécula de adhesión intracelular 1; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; EROs: especies reactivas del oxígeno; IL: interleuquina; NF-Kb: factor nuclear kappa B; TLR4: receptor tipo *Toll* 4; NLRP3: dominio pirina 3 de la familia NLR.

Recientemente, se ha demostrado que DHP-I actúa también como receptor de adhesión de neutrófilos tanto en células endoteliales de pulmón e hígado (Choudhury *et al.*, 2019), cómo de riñón (Lau *et al.*, 2022) en modelos animales; y los efectos beneficiosos de CIL, por tanto, podrían deberse también a su papel en el bloqueo del reclutamiento de neutrófilos lo cual reduciría los procesos inflamatorios asociados.

CIL no solo es capaz de bloquear DHP-1, sino, otros tantos transportadores cómo los transportadores de aniones orgánicos (del inglés, *organic anion transporters*, OATs) o la megalina. La CIL inhibe los OATs de las células del túbulo proximal renal (**Fig.27**), reduciendo la entrada de fármacos tóxicos como el imipenem, cisplatino y diclofenaco. Esto previene el acúmulo de estos compuestos, protegiendo las células renales, disminuyendo el estrés oxidativo, la inflamación y promoviendo la supervivencia celular (Huo *et al.*, 2019, 2020). Por su parte, la megalina es un receptor endocítico que se expresa en varios tejidos, principalmente en la membrana apical de las células del túbulo proximal. Tiene múltiples ligandos como hormonas, vitaminas, lipoproteínas, pero también puede introducir fármacos al interior celular (Hori *et al.*, 2017; Elsakka *et al.*, 2022). En modelos animales, la CIL ha demostrado efectos nefroprotectores al inhibir la endocitosis mediada por megalina, reduciendo la toxicidad de fármacos (Hori *et al.*, 2017, Jado *et al.*, 2020, Arita *et al.*, 2021) y otros factores dañinos cómo el inducido por rabdomiólisis, isquemia-reperusión (Matsushita *et al.*, 2021; Funahashi *et al.*, 2024) o por el incremento de mioglobina (Han *et al.*, 2022).

4.2. POTENCIAL ACCIÓN PROTECTORA DE LA CILASTATINA EN EL SNC

Estudios recientes de nuestro grupo de investigación han demostrado por primera vez, en modelos animales, el potencial neuroprotector y antiinflamatorio de CIL (ver **Tabla 11**). En un modelo murino de glaucoma, la administración periférica del fármaco aislado evitó la pérdida de CGRs-Brn3a⁺ y la activación macro- y microglial en la retina (Martínez-López *et al.*, 2024). De forma similar, en un modelo animal de toxicidad por cisplatino, la CIL fue capaz de atenuar la activación glial, principalmente a nivel del CS (Martín-Sánchez, 2024).

Tabla 11. Principales resultados de nuestro grupo en relación con los potenciales efectos terapéuticos de cilastatina en el SNC

Modelo animal	Tipo de estudio	Región	Efecto	Resultados tras la administración de CIL	Referencia
Glaucoma (por hipertensión ocular)	<i>In vivo</i>	Retina	Neuroprotector	↑Células Brn3a ⁺	Martínez-López <i>et al.</i> , 2024
			Anti-inflamatorio	↓GFAP ↓Células Iba1 ⁺	
Neurotoxicidad (inducida por cisplatino)	<i>In vivo</i>	CS	Anti-inflamatorio	↓Células Iba1 ⁺ ↓Activación microglial	Martín-Sánchez, 2024

En la tabla se muestran de forma resumida las principales evidencias obtenidas por el grupo de investigación sobre el papel de la CIL en el SNC. CS: colículo superior; Brn3a: homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado.

Ambos estudios sugieren una posible eficacia de CIL como agente neuroprotector y antiinflamatorio, aspectos que estudiaremos en la presente Tesis Doctoral en nuestros modelos de patología de sepsis y de malaria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

En base a estas evidencias, nos planteamos la hipótesis de que, en patologías sistémicas, como la sepsis o la malaria, existe un daño inflamatorio y neuronal en la vía visual, tanto en la retina como en los principales núcleos de relevo: colículo superior (CS), núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) y corteza visual primaria (V1). En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para mitigar las alteraciones descritas en el SNC asociadas a estas patologías, proponemos un nuevo abordaje terapéutico con el empleo de la cilastatina (CIL), cuya acción ha sido ampliamente estudiada a nivel renal.

OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral nos proponemos dos objetivos generales:

1. Caracterizar el daño inflamatorio y neuronal en la vía visual en un **modelo animal de sepsis** inducido por una única administración de lipopolisacárido (LPS); y evaluar la eficacia de la CIL en la prevención y/o reversión del daño inducido.
2. Caracterizar el daño inflamatorio y neuronal en la vía visual en un **modelo animal de malaria** inducido por la inoculación del parásito *Plasmodium berghei*; y evaluar la eficacia de la CIL en la prevención y/o reversión del daño inducido.

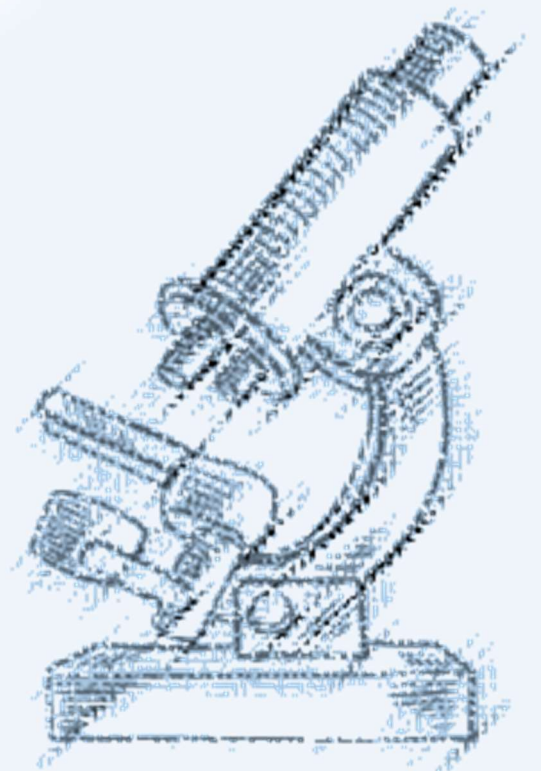
MODELO ANIMAL DE SEPSIS: OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el daño a nivel del peso y de la función renal producido por el LPS mediante la evaluación de creatinina sérica, nitrógeno ureico en sangre (NUS), diuresis y tasa de filtración glomerular (TFG). Evaluar la eficacia de la CIL.
2. Evaluar *in vivo*, mediante tomografía de coherencia óptica (TCO), las posibles alteraciones estructurales por el LPS en la retina. Evaluar la eficacia de la CIL.
3. Caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas el daño producido por el LPS en las células ganglionares de la retina (CGRs), las células macrogliales y microgliales, utilizando los marcadores Brn3a, GFAP e Iba1, respectivamente. Evaluar la eficacia de la CIL.
4. Analizar mediante técnicas de inmunofluorescencia los posibles mecanismos asociados al daño inducido por LPS en la retina; en concreto la vía del inflammasoma mediado por TLR4 y NLRP3.
5. Caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas el daño producido por LPS en los principales núcleos de relevo de la vía visual en las neuronas, células macrogliales y microgliales, utilizando los marcadores NeuN, GFAP e Iba1, respectivamente. Evaluar la eficacia de la CIL.

MODELO ANIMAL DE MALARIA: OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la parasitemia, los niveles de hemoglobina, y el daño renal asociado a la inoculación del parásito *P. berghei* en nuestro modelo. Evaluar la eficacia de la CIL.
2. Caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas el daño producido por el parásito *P. berghei* en las células ganglionares de la retina (CGRs), las células macrogliales y microgliales, utilizando los marcadores Brn3a, GFAP e Iba1, respectivamente. Evaluar la eficacia de la CIL.
3. Analizar mediante técnicas de inmunofluorescencia los posibles mecanismos asociados al daño inducido por el parásito en la retina; en concreto la vía del inflamasoma mediado por TLR4 y NLRP3.
4. Caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas el daño inducido por la inoculación del parásito en los principales núcleos de relevo de la vía visual en las neuronas, células macrogliales y microgliales, utilizando los marcadores NeuN, GFAP e Iba1, respectivamente. Evaluar la eficacia de la CIL.

MATERIAL Y MÉTODOS



En la presente Tesis Doctoral se han empleado dos modelos animales de fracaso multiorgánico: uno inducido por sepsis (Modelo 1) y otro inducido por malaria (Modelo 2). Los estudios, en los que se han empleado animales con fines experimentales, fueron diseñados y realizados conforme a la Directiva del Parlamento Europeo 2010/63/UE y de acuerdo con la normativa española vigente recogida en el RD53/2013, el cual establece las normas básicas aplicables para el uso de animales en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia. Los proyectos de investigación fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) y recibieron la aprobación final de la Autoridad Competente correspondiente, esto es, la Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Sostenibilidad de la Comunidad de Madrid (PROEX: 089/18 y PROEX: 088/18). Toda la experimentación aquí recogida se ha realizado considerando las Directrices ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) que incluye recomendaciones para la planificación, el diseño y la redacción de los estudios llevados a cabo en animales (Kilkenny *et al.*, 2010; Percie du Sert *et al.*, 2020).

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el Modelo 1 se emplearon 36 ratas (*Rattus norvegicus*) macho, de la estirpe *Wistar*: 28 para los estudios inmunohistoquímicos; y 8 para los estudios *in vivo* mediante TCO. En el Modelo 2 se emplearon 32 ratones (*Mus musculus*) hembra, de la estirpe C57BL/6J; en ambos casos procedentes de la empresa Charles River Laboratories (Les Oncins, Francia). Los animales se alojaron en las instalaciones del animalario del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM, Madrid, España; número de registro: ES-28079-000087), salvo los animales empleados para el estudio por TCO que se alojaron en las instalaciones del animalario de la UCM (CAI Animalario UCM, Madrid, España; N° de Registro: ES-28079-000086). Los animales se estabularon en jaulas de policarbonato (55 x 32 x 18 cm), y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y humedad (60±5%), en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luz blanca encendida a las 8:00 h), y con acceso libre a agua y alimento en forma de pellets (Hybridpellet, Altromin®, Alemania). En todos los casos los animales disfrutaron de condiciones de enriquecimiento ambiental, mediante la introducción de tubos de cartón y/o piezas de madera dispuestas en el interior de las jaulas.

2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

La CIL fue suministrada en polvo por la compañía Sun Pharmaceutical Industries Limited (Madhya Pradesh, India). La CIL se preparó a diario, antes de cada administración, disolviéndola en solución salina (NaCl 0,9%, *Braun Medical SA*, España) a una concentración de 30 mg/mL. Las inyecciones se realizaron, por vía intraperitoneal (i.p.), a una concentración de 150 mg/kg en un volumen de administración de 5 mL/kg. Para la elección de la dosis empleada nos basamos en resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que CIL demostró propiedades nefroprotectoras en diversos modelos animales de daño renal agudo (Humanes *et al.*, 2012, 2017; Jado *et al.*, 2020). El régimen de administración de la CIL en el Modelo 1, consistió en una única administración inmediatamente posterior al daño, mientras que en el Modelo 2, se realizó una administración repetida de CIL con dosis diarias del fármaco durante un total de 6 días.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. MODELO 1: MODELO ANIMAL DE SEPSIS

En el Modelo 1, se utilizó un modelo animal de sepsis basado en la administración de una dosis única de lipopolisacárido (LPS) bacteriano. El LPS (*Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, EE. UU.) se disolvió a una concentración de 5 mg/mL en solución salina (vehículo, VH), y se administró i.p., en un volumen de 5 mL/kg, a una dosis de 10 mg/kg en base a estudios previos (para revisión consultar: Hoogland *et al.*, 2015).

En la primera cohorte de animales (N=28), dedicada a los estudios inmunohistoquímicos (**Fig.28**), los animales llegaron a nuestras instalaciones con un peso aproximado de 140-200 g, y fueron estabulados en grupos de 2 o 3 individuos en las condiciones anteriormente indicadas (ver apartado “1. Animales de experimentación”). En todos los casos se dejó un tiempo de habituación de, al menos, 10 días.

Los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales y recibieron dos inyecciones, una primera con LPS (10 mg/kg, i.p.), o su VH; e inmediatamente después otra con CIL (150 mg/kg, i.p.) o su VH. A priori, y con el fin de contrarrestar los posibles efectos deletéreos del LPS (Semmler *et al.*, 2005, 2007, 2008) se asignó un número desigual de animales por grupo experimental (VH-VH: n=5; VH-CIL: n=5; LPS-VH: n=10; LPS-CIL: n=8) aunque únicamente se registró una baja en el grupo LPS-VH. Todas las inyecciones se realizaron en la misma franja horaria, entre las 10:00 h y las 13:00 h para evitar posibles interferencias con los ritmos circadianos. Tras las inyecciones, los

animales fueron alojados de forma individual en jaulas metabólicas (Harvard Apparatus®, EE. UU.) para la obtención de orina durante 24 h con el fin de obtener los valores totales de diuresis en estos animales. Se registró el peso de los animales antes de la administración de los fármacos, y a las 24 h de su administración. El sacrificio y toma de muestras de los animales se realizó a las 24 h de la administración de los fármacos.

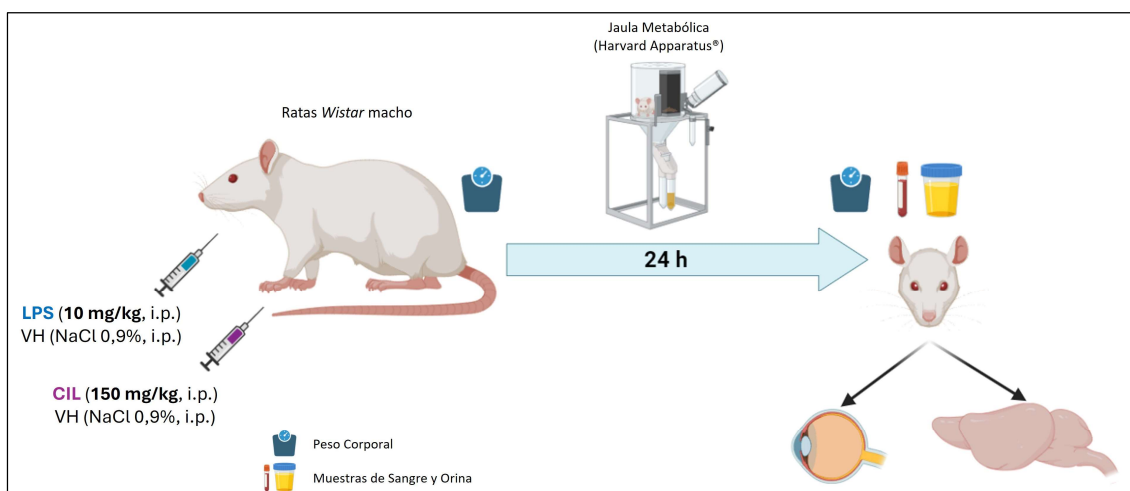


Figura 28. Diseño experimental del modelo de sepsis, Modelo 1. Los animales, ratas *Wistar* macho, recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg) o de su vehículo (VH; NaCl 0,9%) e inmediatamente después, recibieron una dosis i.p. del fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg) o de su VH (NaCl 0,9%). Se obtuvieron cuatro grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Tras los tratamientos las ratas fueron alojadas en jaulas metabólicas durante 24 h. Los animales fueron pesados el día de las inyecciones y 24 h después, el día del sacrificio, donde se obtuvo la orina de 24 h, una muestra de sangre y las muestras de tejido del sistema nervioso central. Esquema creado con BioRender.com

La siguiente cohorte de animales (N=8; n=2 por grupo experimental) se dedicó a los estudios *in vivo*. En este caso, los animales llegaron a nuestras instalaciones con un peso aproximado de 180-200 g, se distribuyeron en los cuatro grupos experimentales anteriormente mencionados y se realizaron las administraciones farmacológicas en las mismas dosis y regímenes que en la primera cohorte, sin alojar a los animales en jaulas metabólicas. Los registros de TCO se realizaron 24 h después de la administración de los fármacos.

3.2. MODELO 2: MODELO ANIMAL DE MALARIA

En el Modelo 2 (**Fig.29**), se empleó un modelo animal de malaria basado en la administración del parásito de la especie *Plasmodium berghei* según estudios previos (Bensalel *et al.*, 2023). En concreto, en este estudio se inyectó i.p. la cepa ANKA proporcionada por el Dr. Juan José García, del Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (UCM), en un volumen de 0,2 mL de stock, que contiene 5×10^6

glóbulos rojos (GR) infectados (GRI) por mililitro en tampón fosfato salino 0,01 M (*Phosphate Saline-Buffer*, PBS, Sigma-Aldrich, EE. UU.), por lo que la cantidad total inoculada fue de 1×10^6 GRI, concentración similar a lo encontrado en la literatura (Zhu *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2022).

Los animales llegaron a nuestras instalaciones con un peso aproximado de 12-20 g y fueron estabulados en grupos de 5-6 animales en las condiciones anteriormente indicadas (ver apartado “*Animales de experimentación*”). Tras el periodo de habituación, de 10 días, se llevó a cabo el diseño experimental, realizándose el estudio en la sala de bioseguridad P2 del animalario del IISGM.

Se inoculó i.p. el parásito en los grupos animales correspondientes, e inmediatamente los grupos tratados con el fármaco recibieron una dosis de CIL la cual se administró durante 5 días consecutivos; conformado de esta manera los cuatro grupos experimentales (Control: n=6; Control-CIL: n=5; Malaria: n=11; Malaria-CIL: n=10). Para asegurar un mínimo de animales con una parasitemia adecuada, se utilizó un mayor tamaño muestral en los grupos inoculados con el parásito. Las inyecciones se administraron siempre en la misma franja horaria (10:00 h-11:00 h). El sacrificio y toma de muestras de los animales se realizó el sexto día.

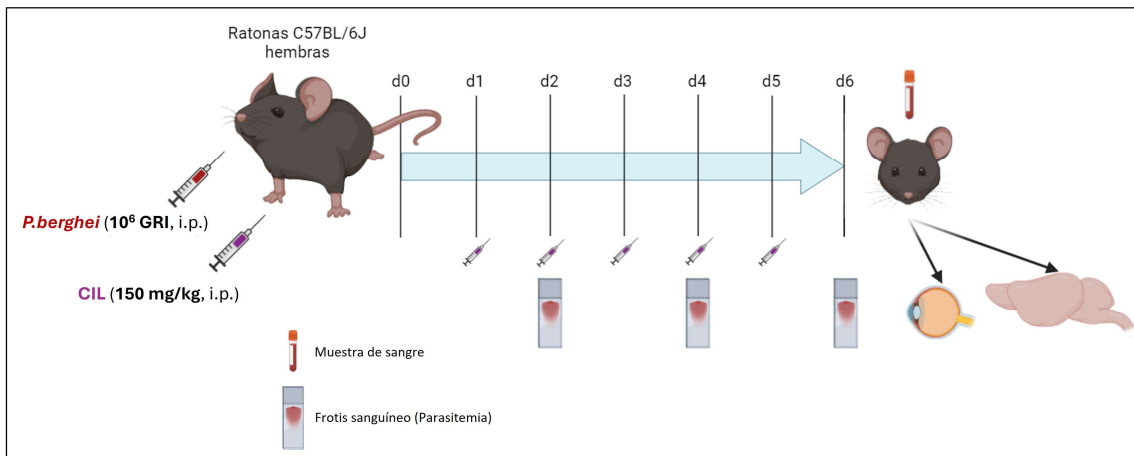


Figura 29. Diseño experimental del modelo de malaria, Modelo 2. Los animales C57BL/6J hembra fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con el parásito *Plasmodium berghei* ANKA (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI), e inmediatamente después se les administró una dosis del fármaco citastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se inyectó diariamente hasta el día 5 (d5) postinfección, recibiendo un total de 6 inyecciones. A uno de los grupos control se le administraron el mismo número y las mismas dosis de CIL. Se obtuvieron 4 grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. El segundo (d2), cuarto (d4) y sexto día (d6) se realizó un frotis sanguíneo para la evaluación de la parasitemia. El día del sacrificio (d6) se obtuvo una muestra de sangre, y se llevó a cabo la extracción las muestras de tejido del sistema nervioso central. Esquema creado con Biorender.com

3.2.1. Evaluación de la parasitemia

A los 2, 4 y 6 días tras la inoculación del parásito se obtuvo una muestra de sangre se la cola de los animales (grupos Malaria y Malaria-CIL), con la que se realizó un frotis dónde se

evaluó el porcentaje de GRI, como lo realizado por Bensalet y cols. (2023). El frotis sanguíneo se fijó con metanol absoluto (1 min), y, tras secarse se realizó una tinción de Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) durante 1 min; tras un lavado con buffer fosfato pH 6.6 (Thermo scientific, EE. UU.) y agua destilada, los portaobjetos se dejaron secar, y se guardaron hasta su valoración. Para ello, los portaobjetos fueron observados en un microscopio Olympus CH30 (Japón), con el objetivo de 100 aumentos (100x) y aceite de inmersión; en cada portaobjetos se analizaron cuatro campos aleatorios, y se contó el número de GRI por campo. La cuantificación se realizó por dos investigadores independientes. A continuación, se calculó el promedio de los campos, así como el índice de parasitemia, expresado como el porcentaje de glóbulos rojos infectados (%GRI) frente al total de GR, para cada animal, en cada uno de los días de estudio, según la siguiente fórmula.

$$\text{Parasitemia (\%GRI)} = \frac{\text{GRI}}{\text{GR Totales}} \times 100$$

Los animales infectados que a lo largo del estudio no habían desarrollado parasitemia (0% de GRI) fueron descartados, y no se tuvieron en cuenta para el resto de los análisis. En el grupo Malaria hubo 3 animales que fueron eliminados del estudio por este motivo.

4. VALORACIONES BIOQUÍMICAS

Al sacrificio se obtuvieron muestras de sangre, bien de la de la aorta abdominal o bien mediante punción cardiaca en la aurícula derecha. Las muestras fueron recogidas en tubos comerciales que fueron centrifugados a 2.500 rpm durante 15 min a 4°C para la obtención de suero sanguíneo. En las muestras de suero y orina se analizaron, en el Modelo 1, los niveles de creatinina (Cre, mg/dL) y urea en suero (mg/dL), y de Cre en orina, mediante el empleo de un analizador automático RxL (Dade-Behring, Siemens, Alemania) en el Servicio de Bioquímica del HGUGM según las instrucciones y los protocolos del fabricante. A partir de estos valores se calcularon los siguientes parámetros de función renal:

- Nitrógeno Ureico en Sangre (NUS, mg/dL):

$$\text{NUS} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Urea sérica} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)}{2,1428}$$

- Tasa de aclaramiento (mL/min):

$$\text{T. Aclaramiento} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = \frac{[\text{Cre}_{\text{orina}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)] \times \frac{\text{Volumen de orina (mL)}}{24 \text{ h} \times 60 \frac{\text{min}}{\text{hora}}}}{[\text{Cre}_{\text{suero}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)]}$$

- Tasa de Filtración Glomerular (TFG, mL/min/100g):

$$\text{TFG} \left(\frac{\text{mL}}{\frac{\text{min}}{100 \text{ g}}} \right) = \frac{\text{T. Aclaramiento} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) \times 100}{\text{Peso del animal (g)}}$$

En el Modelo 2, los niveles de Cre sérica (mg/dL) se analizaron mediante un kit comercial enzimático (*Mouse Creatinine Assay*, Crystal Chem, Holanda) y en las muestras de sangre completa se evaluaron los niveles de hemoglobina (Hb, g/dL) en un analizador automático (*Autohematology analyzer BC-2800 Vet*, Mindray, China) disponible en el animalario del IISGM del HGUGM.

5. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

La TCO se realizó en colaboración con el Instituto Universitario de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo (IIORC-UCM, Madrid, España). Esta prueba permite la obtención, *in vivo*, de imágenes de alta resolución de la estructura retiniana. Se emplea como técnica de rutina en el diagnóstico oftalmológico ya que permite, mediante el empleo de interferometría, la cuantificación del grosor de la retina y de sus capas. Aunque esta técnica se ha empleado extensamente en el diagnóstico de enfermedades de la retina, son cada vez más numerosos los estudios que ponen de manifiesto su potencial en la evaluación de pacientes con afecciones neuro-oftalmológicas y/o neurodegenerativas (Costello & Burton, 2018; López-Cuenca *et al.*, 2021; Zeppieri *et al.*, 2023).

La TCO se realizó, de acuerdo con el protocolo previamente establecido en Salobar-García y cols. (2021), empleando el equipamiento clínico específico (*Spectralis OCT 2*, Heidelberg Engineering, Alemania) adaptado a modelos animales mediante una lente de contacto específica de especie (rata) de polimetilmetacrilato (Cantor & Nissel, Reino Unido) con el fin de crear una superficie refractiva uniforme. Este análisis se realizó de forma unilateral únicamente en el ojo izquierdo de los animales, tras la dilatación de la pupila mediante la administración de un colirio específico (Colircusi Tropicamida®, 10 mg/mL, Alcon Healthcare, España). Este procedimiento se realizó bajo condiciones de

anestesia general [ketamina (75 mg/kg, i.p.), Anesketin®, Dechra Veterinary Products SLU, España; y medetomidina (0,26 mg/kg, i.p.), Medetor®, Virbac España S.A., España)]; manteniendo la córnea hidratada en todo momento gracias a la administración de lágrima artificial reticulada (VisuXL, VisuFarma, España).

Los datos fueron obtenidos realizando un escaneo alrededor del disco óptico centrando la imagen en la salida de los vasos retinianos. La TCO de Spectralis dispone de un sistema especial (*TruTrack Active Eye Tracking*, Heidelberg Engineering, Alemania) en el que permite corregir los artefactos resultantes de los pequeños movimientos oculares producidos durante la respiración. Para el análisis del espesor de la retina total la captura de imágenes se realizó ajustando un cubo centrado en el nervio óptico, mientras que la cuantificación del espesor de la capa de fibras retinianas se realizó B-Scan en los 360° alrededor de la papila. Tanto los registros de TCO, como la captura y el análisis de las imágenes obtenidas, fueron realizadas por un experimentador especializado (Dra. Elena Salobar-García). Los datos de espesores de las capas de la retina obtenidos se analizaron con el software específico de la propia TCO (*Heidelberg Eye Explorer v6.13*, Heidelberg Engineering, Alemania). Durante todo el procedimiento se vigilaron las constantes vitales de los animales (respiración y frecuencia cardíaca) y se garantizó la ausencia de hipotermia asociada a la anestesia mediante el empleo de bolsas térmicas. Este procedimiento fue considerado como procedimiento de no recuperación y, se les administró, antes de despertar una sobredosis de pentobarbital sódico (650 mg/kg, i.p., Dolethal®, Vetoquinol, Francia).

6. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LOS ESTUDIOS INMUNOISTOQUÍMICOS

Los animales se sacrificaron a los tiempos indicados (ver **Fig.28** y **Fig.29**) con una sobredosis de anestésico, empleando una mezcla de ketamina (Ketolar, Pfizer, EE. UU.) y xilacina (Xylasol, Provetsa, España) según las dosis recomendadas [rata: (100 mg/kg, / 12 mg/kg, i.p., respectivamente, y ratón: 200 mg/kg, / 20 mg/kg, i.p., respectivamente)]. Para los estudios de inmunohistoquímica, la posición de los globos oculares y sus respectivas retinas se mantuvo mediante la realización de un punto de sutura en el párpado superior de cada ojo (**Fig.30A**). Tanto los globos oculares como el cerebro completo (a excepción del cerebelo) fueron introducidos en viales con el fijador, paraformaldehído (PFA, Santa Cruz, EE. UU.) al 4% en PBS 1X, a 4°C, que fue renovado a las 24 h y, en el caso de los globos

oculares, se extrajeron tanto la córnea como el cristalino. El encéfalo (**Fig.30B**) y las copas ópticas (**Fig.30C**) se mantuvieron en frío (4°C) en el fijador, un total de 48 h.

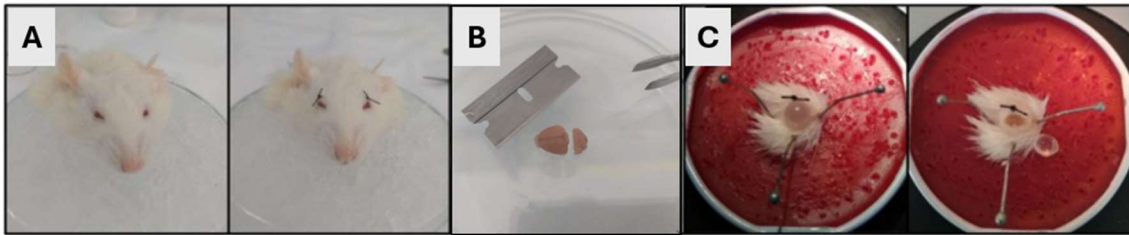


Figura 30. Extracción de los tejidos utilizados en los análisis. (A) Se realizó un punto de sutura en el párpado superior antes de la extracción de los globos oculares. (B) A continuación se extrajo el cerebro y se separó el cerebelo. (C) A las 24 h del sacrificio, se diseccionó la córnea y se extrajo el cristalino.

A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 0,01 M (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a pH 7,4, para eliminar los restos de PFA; los tejidos se crioprotegieron mediante inmersión en concentraciones crecientes de sacarosa (Millipore Merck, Alemania) disuelta en PBS 0,01 M: primero se introdujeron en una concentración de sacarosa al 11% durante 48 h, y a continuación, en sacarosa al 33% durante otras 48 h. Los tejidos se mantuvieron siempre en frío (4°C) y los medios se renovaron cada 24 h para evitar una posible contaminación. Por último, los tejidos fueron incluidos rápidamente empleando como medio de congelación *Tissue-Tek* (*Optimal cutting temperature*, O.C.T.®, Sakura Finetek, EE. UU), y las muestras se almacenaron en un arcón congelador a -30°C hasta el momento de su uso.

Los tejidos se cortaron en un criostato (modelo CM3050, Leica, Alemania). Las secciones obtenidas se recogieron en portaobjetos (Menzel Glaser, Alemania) gelatinizados (Gelatina, Sigma-Aldrich, EE. UU.), que posteriormente se mantuvieron a -30°C hasta la realización de los análisis inmunohistoquímicos.

- Corte de las copas ópticas para la obtención de secciones de la retina: se realizaron cortes sagitales de 16 μm de grosor en sentido Nasal-Temporal. Los cortes se realizaron de forma seriada y se recogieron 2-3 secciones por portaobjetos. La realización de este protocolo de corte nos permite mantener siempre las referencias anatómicas de cada retina tanto en el eje horizontal con las regiones Nasal, Central y Temporal, como en el eje vertical con las zonas Superior, Central e Inferior (**Fig.31**). Esta división nos permite obtener las 9 áreas anatómicas en la retina, según lo establecido en trabajos previos del grupo de investigación (Fernández-Albarral *et al.*, 2021b; Martínez-López *et al.*, 2024), en las que se realizarán los estudios posteriores: 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).

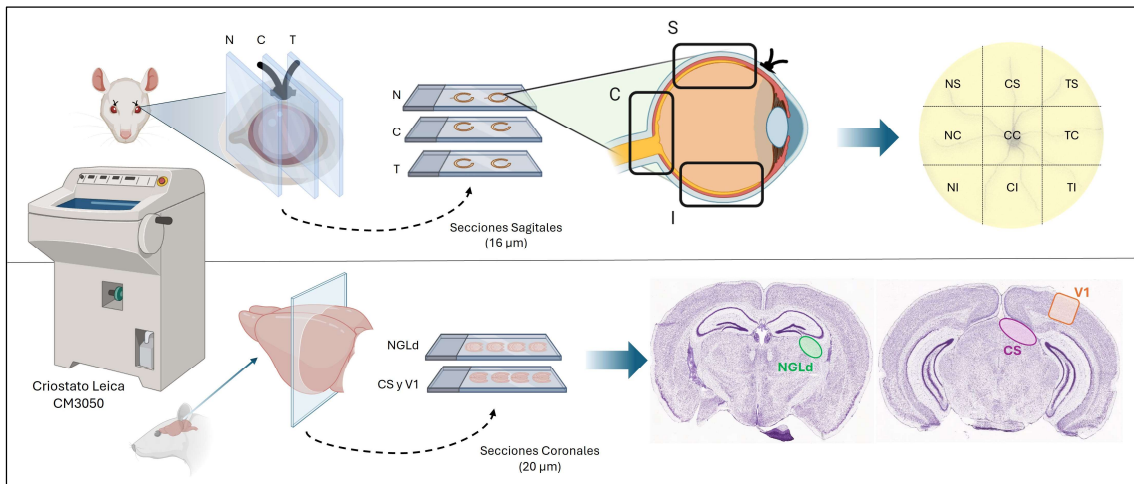


Figura 31. Esquema del procesamiento de las muestras: corte en el criostato y selección de las áreas de estudio. Los cortes se realizaron en un criostato y se recogieron en portaobjetos gelatinizados. En el caso de la retina (**parte superior**), se obtuvieron secciones sagitales de 16 μm de grosor de cada una de las regiones a analizar: Nasal (N), Central (C) y Temporal (T); se mantuvo la posición anatómica también para poder analizar en cada región las zonas: Superior (S), Central (C) e Inferior (I); obteniendo 9 áreas de estudio: 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). En el caso de los encéfalos (**parte inferior**), se obtuvieron secciones coronales de 20 μm de grosor, dónde se analizaron: el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd), el colículo superior (CS) y la corteza visual primaria (V1). Esquema creado con BioRender.com

- Corte de los encéfalos para obtención de secciones de cerebrales: se realizaron cortes coronales de 20 μm de grosor desde la zona más rostral hacia la zona más caudal. Los cortes se realizaron en series de 4 portaobjetos y se situaron 4 secciones en cada uno (**Fig.31**). Las áreas de interés seleccionadas fueron los 3 núcleos de relevo principales de la vía visual: CS, NGLd, y V1. La localización de dichos núcleos se realizó al microscopio con la ayuda de los atlas: Paxinos & Watson, 2006, para el tejido de rata (Modelo 1, **Fig.32A-B**); y Paxinos & Franklin, 2001 para el tejido de ratón (Modelo 2, **Fig.32C-D**).

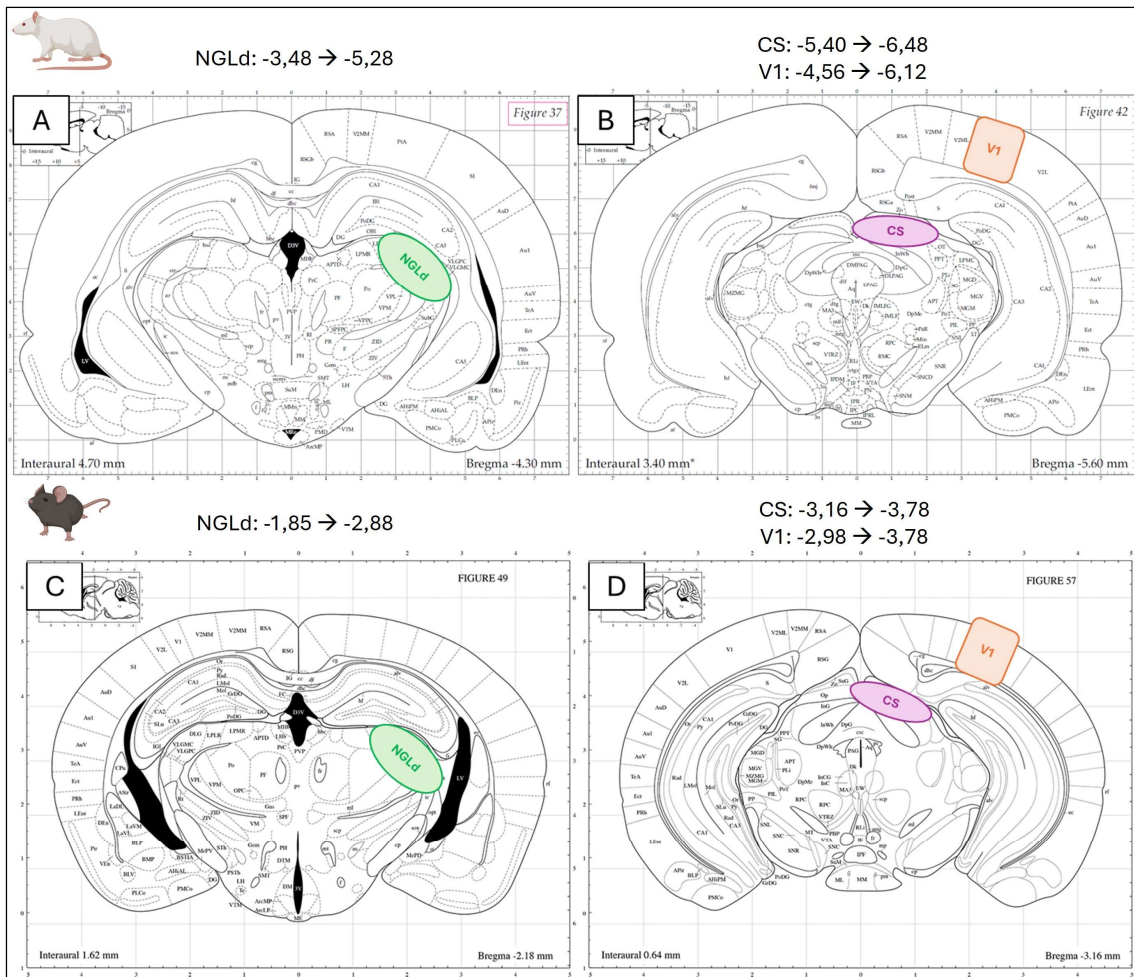


Figura 32. Núcleos de relevo de interés de la vía visual. Se muestran secciones coronales del atlas neuroanatómico de rata (A-B, Paxinos & Watson, 2006) y de ratón (C-D, Paxinos & Franklin 2001), en las que se localizan los 3 núcleos de relevo principales de la vía visual que son objeto del presente estudio: el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd, verde), el colículo superior (CS, morado), y la corteza visual primaria (V1, naranja). Encima de las fotografías se puede observar el rango de bregma empleado en los cortes inmunohistoquímicos.

7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron según el protocolo establecido previamente en nuestro grupo de investigación (Martínez-López *et al.*, 2024), con pequeñas modificaciones. Se seleccionaron muestras de, al menos, 5 animales diferentes de cada uno de los grupos experimentales para cada uno de los análisis inmunohistoquímicos. Para la realización de estos, los portaobjetos se dejaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Los lavados e incubaciones se realizaron con el tampón de inmunohistoquímica (TI), compuesto por PBS 0,01 M con un 0,5% de albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y un 0,3% de Tritón-X-100 (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se hidrató el tejido en un primer lavado de 10 min con TI y, a continuación, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución al 0,5% de peróxido de hidrógeno (Merck KGaA, Alemania) disuelto en TI, durante 15 min a TA. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TI y, después, se incubó con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 12) en TI

suplementado con un 5% de BSA durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras 3 lavados de 10 min con TI a TA, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 12**) en TI durante 2 h a TA. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de 10 min con TI, y posteriormente se incubaron las muestras durante 90 min con el complejo avidina-biotina peroxidasa (*Vectastain ABC Peroxidase Staining Kit*, Thermo Scientific, EE. UU.) a TA, y a una concentración de 1:250. Tras 3 lavados de 10 min con TI, se procedió al revelado con 3,3- diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich, EE. UU.) activada con 0,2% de peróxido de hidrógeno en PBS 0,01 M, durante 10 min aproximadamente, en función del anticuerpo empleado en cada caso. Tras el revelado, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 0,01 M y se procedió al montaje de los portaobjetos con Aquatex® (Merck KGaA, Alemania).

En la **Tabla 12** se presentan los anticuerpos empleados en el estudio para la identificación de diferentes tipos celulares. Se utilizó el anticuerpo Brn3a para identificar células ganglionares de la retina (CGRs), según lo descrito por Nadal-Nicolás *et al.* (2009). Para marcar los núcleos neuronales en las regiones cerebrales de estudio, se empleó NeuN, un marcador específico que se localiza en los núcleos y el citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (Mullen *et al.*, 1992). La evaluación de las poblaciones macrogliales se llevó a cabo utilizando GFAP, un marcador que se expresa específicamente en los astrocitos y las células de Müller. La expresión de GFAP aumenta en respuesta a diferentes formas de lesión, lo que se conoce como macrogliosis (Eng, 1985). Por otro lado, para identificar las células microgliales, se utilizó el marcador Iba1, cuya expresión aumenta durante la activación microglial (Ito *et al.*, 1998).

Tabla 12. Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos

MARCADOR	Proteína marcada	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Células Ganglionares de la Retina	Brn3a (<i>brain-specific homeobox/POU domain protein 3A</i>)	Mouse Anti-Brn3a (ref. MAB1585, Merck KGaA, Alemania) [1:600]	Goat-Anti-mouse IgG (H+L) Biotinylated (ref. BA9200, Vector Laboratories, EE. UU.) [1:200]
	NeuN (<i>Neuronal Nuclei</i>)	Mouse Anti-NeuN (ref. MAB377, Merck KGaA, Alemania) [1:100]	
Macroglía	GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)	Rabbit Anti-GFAP (ref. Z0334, Dako, EE. UU.) [1:800]	Goat-Anti-rabbit IgG (H+L) Biotinylated (ref. 31820, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:200]
Microglía	Iba1 (<i>Ionized calcium binding adaptor molecule-1</i>)	Rabbit Anti-Iba1 (ref. 019-19741, Wako Chemicals, Japón) [1:1000]	

Entre corchetes se muestran las concentraciones a las que se empleó cada uno de los anticuerpos. Brn3a: homeobox específica del cerebro/proteína de dominio POU 3A; NeuN: proteína de unión a hexaribonucleótidos-3; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Iba-1/Iba1: molécula adaptadora 1 de unión al calcio ionizado. Entre corchetes se indica la concentración empleada de cada anticuerpo, y se indica la casa comercial y número de referencia para cada uno de ellos.

En cada uno de los análisis inmunohistoquímicos se incluyeron muestras de todos los grupos experimentales, pero, además, para los análisis de la retina se incluyeron muestras

de cada una de las regiones de interés (N, C y T); y, en el caso de los núcleos de relevo, uno de cada núcleo de estudio (CS, NGLd y V1). En todos los casos se incluyó un control negativo, portaobjetos al que no se adicionó anticuerpo primario con el fin de verificar la especificidad de cada anticuerpo.

Los portaobjetos con las secciones inmunomarcadas se observaron en un microscopio Zeiss Axio-Imager A.12. (Zeiss Alemania), acoplado a una cámara de fotos de alta resolución (Zeiss Axioplan 712 color, Alemania). Las microfotografías se realizaron manteniendo siempre las mismas condiciones de luz, brillo y contraste, empleando un software específico (ZEN2, Carl Zeiss AG, Alemania). Las láminas que contienen las microfotografías se han realizado con el programa Adobe Photoshop CS4 Extended 10.0 (Adobe Systems, EE. UU.).

8. INMUNOFLUORESCENCIA

Los análisis de inmunofluorescencia (IF) se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Albarral y cols. (2021a), con el fin de evaluar algunos de los posibles mecanismos moleculares subyacentes en la retina. Para ello, se analizaron algunos marcadores de la vía del inflammasoma, en concreto, NLRP3 (*Nucleotide Leucine-Repeat-containing Protein 3*, Dominio pirina 3 de la familia NLR) y TLR4 (*Toll Like Receptor 4*, o Receptor tipo *Toll 4*) en combinación con los marcadores de las principales poblaciones celulares de la retina: CGR, astrocitos/células de Müller, y células de microglía.

Para la realización de los análisis de IF, los portaobjetos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min, y, después, se hidrataron con PBS 0,01M durante 15 min a TA. Todos los lavados e incubaciones se realizaron en tampón de IF [PBS 0,01M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, EE. UU.) con 0,1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EE. UU.)]. En este caso se realizaron 3 lavados con tampón de IF, y se realizó la incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 13**) diluidos en tampón de IF con un 0,5% de suero universal Animal-Free Blocker® and Diluent R.T.U. (Vector Laboratories Inc., EE. UU.), durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados para eliminar el anticuerpo sobrante, y, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios (**Tabla 13**) durante 2 h a TA. Finalmente, las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS 0,01M y se realizó el montaje de las preparaciones con el medio Vectashield Vibrance Antifade® con DAPI (Vector Laboratories Inc., EE. UU.).

La observación de las secciones inmunomarcadas se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan Microscope, Alemania), acoplado a una cámara de alta

resolución (Zeiss Axioplan 712 color, Alemania). Para la captura de imágenes, se empleó un software específico (ZEN2, Carl Zeiss AG, Alemania) con el objetivo de 20x aumentos manteniendo siempre fijas las condiciones ópticas de luz, brillo y contraste. Las imágenes se capturaron primero en el canal rojo, luego en el canal verde, y, por último, se combinaron para visualizar la colocalización de ambos anticuerpos. Para la preparación de las láminas que contienen las microfotografías se utilizó el programa Adobe Photoshop CS4 Extended versión 10.0 (Adobe Systems, EE. UU.).

Como una primera aproximación, los estudios de colocalización se realizaron en los grupos correspondientes a los modelos de patología (LPS-VH y Malaria), y tratados (LPS-CIL y Malaria-CIL), tras comprobar que la expresión de NLRP3 y TLR4 en los grupos control (VH-VH/VH-CIL y Control/Control-CIL, **Anexo I**) era muy baja, reflejando posiblemente una expresión constitutiva de estos receptores. En estos estudios de colocalización se analizó la posible coexpresión de los marcadores estudiados, mediante el empleo de los filtros correspondientes al marcaje de cada anticuerpo secundario.

Tabla 13. Anticuerpos empleados en los análisis de inmunofluorescencia

	Proteína marcada	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Colocalizaciones con el receptor NLRP3	NLRP3	Rabbit Anti-NLRP3 (ref. NBP2-12446, Novus Biological, EE. UU.) [1:500]	Goat Anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 (ref. 150077, Abcam, UK) [1:500]
	Brn3a	Mouse Anti-Brn3a (ref. MAB1585, Merck KGaA, Alemania) [1:300]	Goat Anti-mouse IgG1 Alexa Fluor™ 594 (ref. A21125, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:500]
	GFAP	Chicken Anti-GFAP (ref. AB5541, Sigma-Aldrich, EE. UU.) [1:300]	Goat Anti-chicken IgY (H+L) Alexa Fluor™ 594 (ref. A11042, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:500]
	Iba1	Goat Anti-Iba1 (ref. AB5076, Abcam, UK) [1:300]	Donkey Anti-goat IgG (H+L) Alexa Fluor™ 594 (ref. A11058, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:400]
	TLR4	Mouse anti-TLR4 (ref. SC-293072, Santa Cruz, EE. UU.) [1:200]	Goat Anti-mouse IgG1 Alexa Fluor™ 594 (ref. A21125, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:300]
Colocalizaciones con el receptor TLR4	Brn3a	Mouse Anti-Brn3a (ref. MAB1585, Merck KGaA, Alemania) [1:300]	Goat Anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor™ 405 (ref. A31553, Thermo Scientific, EE. UU.) [1:500]
	GFAP	Rabbit Anti-GFAP (ref. Z0334, Dako, EE. UU.) [1:500]	Goat Anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 (ref. 150077, Abcam, UK) [1:300]
	Iba1	Rabbit Anti-Iba1 (ref. 019-19741, Wako Chemicals, Japón) [1:600]	Goat Anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 (ref. 150077, Abcam, UK) [1:1000]

Entre paréntesis se muestra el número de referencia y la casa comercial, mientras que entre corchetes se muestran las concentraciones a las que se empleó cada uno de los anticuerpos. 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.

9. ANÁLISIS CUANTITATIVO

9.1. 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 (**Fig.33**): un área central (C0) 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.33B**): sector 1 (T1, I1, N1, S1) y sector 2 (T2, I2, N2, S2).

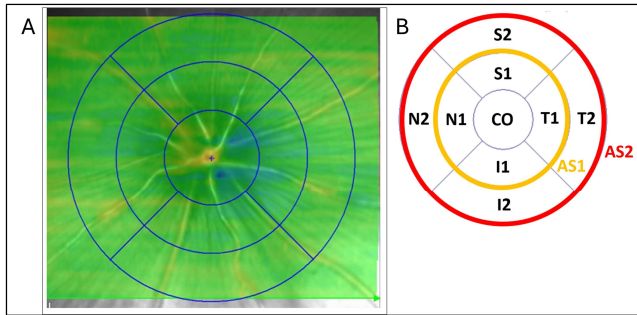


Figura 33. Áreas descritas en el análisis por TCO. (A) Imagen obtenida en la TCO en la que se ha superpuesto el esquema de las regiones a analizar. (B) Esquema de las regiones establecidas en el análisis de TCO. Área central (CO), o zona más cercana al disco óptico; área sectorial situada a 1 mm del disco (AS1, en amarillo); y área más externa situada a 2 mm del disco (AS2, en rojo). Se indican las áreas en función de la distribución anatómica: I, Inferior; N, Nasal; S, Superior; y T, Temporal.

Cada corte obtenido mediante la TCO fue delimitado manualmente por el mismo investigador experimentado, utilizando como referencias los límites del espesor total de la retina: la Membrana Limitante Interna (MLI) y la Membrana de Bruch (MB) (**Fig.34**).

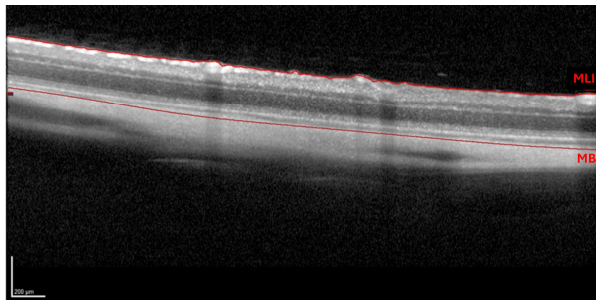


Figura 34. Esquema de la retina en el análisis del espesor total de la retina por TCO. Las líneas rojas indican el área de retina empleado para medir el espesor de la retina. MLI, Membrana Limitante Interna; MB, Membrana de Bruch. Barra de aumentos: 200 µm.

Además, se llevó a cabo el análisis del espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), cuya área se delimitó también manualmente por el mismo examinador experimentado sobre un *B-Scan peripapilar* centrado en el nervio óptico, tal y como se indica en la **Fig.35**. Se tomaron en consideración el promedio de la capa de fibras en los 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).

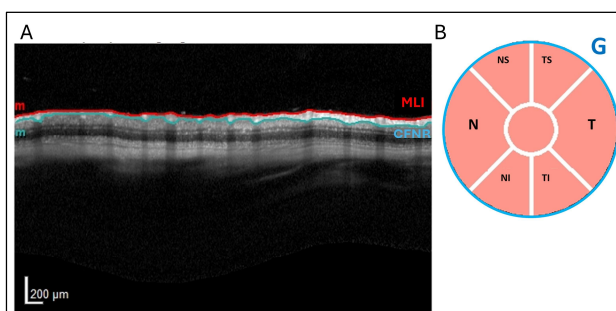


Figura 35. Esquema de la retina en el análisis del espesor de la capa de fibras por TCO. (A) Imagen de *B-Scan* de la TCO. (B) Áreas de estudio. La línea roja delimita la membrana limitante interna y la azul la capa de fibras del nervio óptico. MLI, Membrana Limitante Interna; CFNR, capa de fibras de la retina; G, Global; N, Nasal; NI Nasal Inferior; NS Nasal Superior; T, Temporal; TI Temporal Inferior; TS Temporal Superior. Barra de aumentos: 200 µm.

9.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES CELULARES

La valoración de los diferentes marcadores celulares en la retina y en los tres núcleos de estudio de relevo principales, se realizó en todos los casos por dos miembros del grupo de investigación, de forma independiente, a ciego respecto al grupo experimental analizado y sin permitir más de un 15 % de coeficiente de variación entre las medidas de ambos investigadores.

9.2.1. Estudio inmunohistoquímico de la retina

En la retina para la **determinación de las CGRs** se empleó el marcador Brn3a (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009), y se realizó el conteo de las células marcadas positivamente (Brn3a⁺) directamente al microscopio con el objetivo de 10 aumentos (10x). Para cada una de las retinas analizadas se realizó la suma del número de células Brn3a⁺ contabilizadas en cada una de las 9 áreas, con el fin de obtener el número total de células Brn3a⁺ de cada retina completa. Los datos se expresan como el número de células Brn3a⁺ (ver **Fig.36** como ejemplo de conteo).

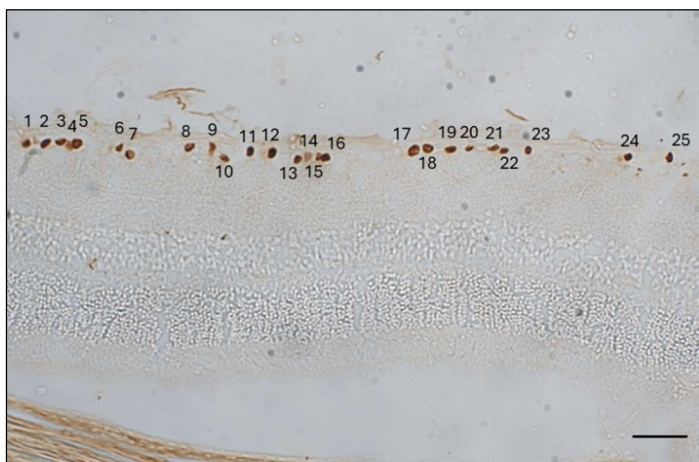


Figura 36. Análisis por conteo de las células Brn3a⁺ en la retina. Imagen representativa de la cuantificación realizada en el microscopio de las células ganglionares de la retina (CGR), marcadas con Brn3a. Los números indican cada una de las CGRs presentes en la imagen. Microfotografía de la retina de rata tomada a 20 aumentos (20x). Barra de aumentos: 50 μ m.

Los **astrocitos y las células de Müller** marcados con GFAP (Eng, 1985) se cuantificaron sobre microfotografías realizadas con el objetivo 20x. Para la cuantificación del marcaje se realizó el densitometrado óptico-digital de cada microfotografía con el software libre ImageJ (*Research Services Branch-NIH*, EE. UU.) diseñando para ello regiones de interés (*Regions of Interest*, ROIs) específicas que cubrieran una parte representativa de cada una de las capas de la retina (ver **Fig.37** para una mayor explicación): CCG, CPI, CNI, CPE, CNE Y SE; que se agruparon posteriormente en retina interna (CCG, CPI y CNI) y externa (CPE, CNE y SE) para analizar la progresión del daño. Los resultados obtenidos se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica (D.O.). Los ROIs fueron incluidos de forma aleatoria, ajustándolos a las capas a evaluar, y la distribución fue la siguiente:

- En Modelo 1 se colocaron 2 ROIs como blancos para restar el marcaje no específico. Por cada capa de estudio se emplearon 6 ROIs; debido a que cada capa tiene un grosor diferente el área de cada ROI fue distinta [CCG (0,00042 mm²/ROI, área total densitometrada 0,00252 mm²), CPI (0,00083 mm² ROI, área total densitometrada 0,00498 mm²), CNI (0,00089 mm² ROI, área total densitometrada 0,00534 mm²); CPE (0,00028 mm² ROI, área total densitometrada 0,00168 mm²), CNE (0,00088 mm² ROI, área total densitometrada 0,00528 mm²) y SE (0,00027 mm² ROI, área total densitometrada 0,00162 mm²)]. El área total cuantificada fue de 0,02145 mm².
- En Modelo 2 se colocaron 2 ROIs como blancos y 8 ROIs en cada capa analizada [CCG (0,00023 mm²/ROI, área total densitometrada 0,00184 mm²), CPI (0,00065 mm² ROI, área total densitometrada 0,00520 mm²), CNI (0,00018 mm² ROI, área total densitometrada 0,00144 mm²); CPE (0,00008 mm² ROI, área total densitometrada 0,00064 mm²), CNE (0,00049 mm² ROI, área total densitometrada 0,00392 mm²) y SE (0,00008 mm² ROI, área total densitometrada 0,00064 mm²)]. El área total de la retina cuantificada fue de 0,01375 mm².

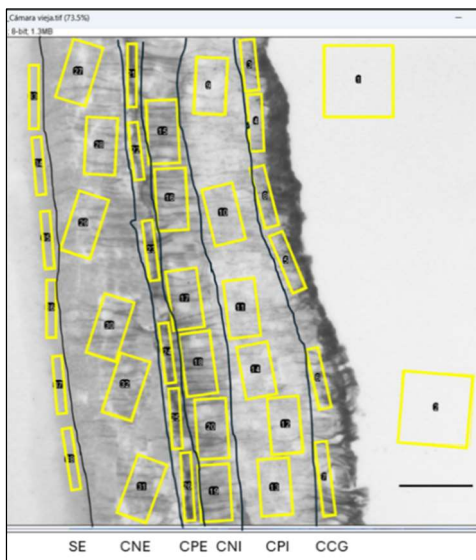


Figura 37. Análisis por densitometrado del marcaje de la GFAP en la retina. Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador GFAP. En cada fotografía se muestran unos rectángulos amarillos, correspondientes con las regiones de interés (*regions of interest*, ROIs) analizadas con el software ImageJ. CCG: capa de células ganglionares, CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa, SE: segmento externo. Microfotografía de la retina de rata tomada a 20 aumentos (20x). Barra de aumentos: 50 μ m.

La cuantificación de las **células microgliales** de la retina, células Iba1 inmunopositivas (Ito et al 1998), se realizó directamente en el microscopio con el objetivo 10x (**Fig.38**). Se contaron todas las células positivas en cada una de las 9 áreas y, en cada una de ellas, en las siguientes capas de la retina: CCG-CFN, CPI, CNI, CPE, CNE-SE. Los valores obtenidos en cada capa y/o área se expresan como número total de células Iba1⁺; además, la suma de las 9 áreas permitió obtener el número global de células microgliales.

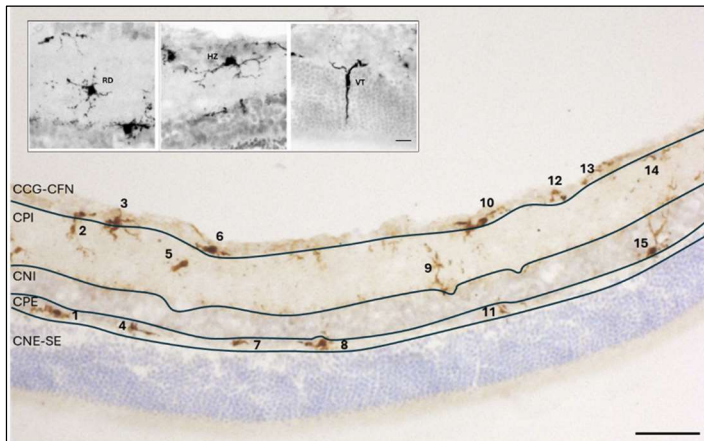


Figura 38. Análisis por conteo de las células Iba1⁺ en la retina. Imagen representativa de la cuantificación realizada sobre el microscopio de las células microgliales retinianas, marcadas con Iba1. Con números se indica cada una de las células presentes en las diferentes capas: CCG-CFN, capa de células ganglionares-capla de fibras nerviosas; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; y CNE-SE, capa nuclear externa-segundo externo. Microfotografía de retina de rata tomada a 10 aumentos (10x), los cuerpos celulares se pueden observar y distinguir en azul (tinción con violeta de cresilo). Barra de aumentos: 50 µm. En el recuadro superior se muestran microfotografías

representativas de los morfotipos presentes en la retina: morfotipo basal radial (RD); morfotipo migratorio horizontal (HZ) y morfotipo migratorio vertical (VT). Microfotografías tomadas a 40 aumentos (40x). Barra de aumentos: 10 µm.

En situaciones patológicas, al activarse las células microgliales se produce tanto un cambio en su patrón de distribución como en su morfología, (Ito *et al.*, 1998). Por ello, se analizó el grado de activación microglial mediante el estudio de la morfología y la orientación, estableciendo 3 morfotipos (Martínez-López *et al.*, 2024): un morfotipo basal (Radial, RD) con soma redondo y las prolongaciones en todas las direcciones; y dos morfotipos activos migratorios: morfotipo horizontal (HZ) con el soma y las prolongaciones paralelas a las capas de la retina, y morfotipo vertical (VT), con el soma y las prolongaciones perpendiculares a las capas de la retina, atravesándolas (**Fig.38**). Los valores de los morfotipos microgliales se expresan como el porcentaje de cada morfotipo respecto al total de células.

9.2.2. Estudio inmunohistoquímico de los núcleos de relevo

El análisis cuantitativo de las **neuronas**, células NeuN positivas (Mullen *et al.*, 1992), se realizó sobre 2 microfotografías tomadas a 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 específicas, que fueron colocados de forma aleatoria realizando los mínimos ajustes necesarios para situarlos sobre la estructura a analizar. En todos los casos los resultados se expresan en unidades arbitrarias de D.O.

En el Modelo 1 (Modelo de sepsis) la distribución de las ROIs (**Fig.39**) fue la siguiente:

- En el caso del CS y del NGLd se emplearon 10 ROIs de un área específica de 0,00315 mm² cada uno, que se colocaron en cada una de las microfotografías (**Fig.39A-B**), además de incluir una ROI adicional como blanco para eliminar el background. El área total cuantificada en cada uno de los núcleos fue de 0,03153 mm².

- En el caso de la V1 se emplearon 5 ROIs en cada una de las capas (II-III, IV, V y VI, **Fig.39C**). Cada ROI tenía un área específica de 0,00434 mm², además en cada capa se incluyó una ROI como blanco. El área total cuantificada en cada fotografía fue de 0,08688 mm². En un análisis posterior se agruparon los ROIs en dos grupos: en corteza externa (capas II-III) e interna (capas IV-V y VI).

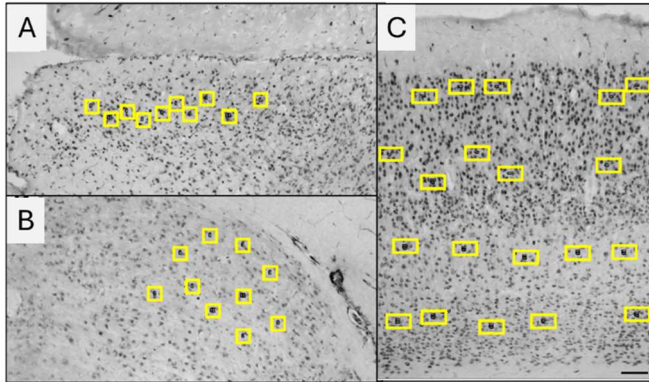


Figura 39. Análisis por densitometrado del marcador NeuN en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 1. Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador NeuN en cada uno de los núcleos estudiados: (A) colículo superior, CS; (B) núcleo geniculado lateral dorsal, NGLd; y (C) corteza visual primaria, V1. En cada microfotografía se muestran, a modo de ejemplo, la posición de las regiones de interés (*regions of interest*, ROIs) mediante unos rectángulos amarillos, analizadas. Microfotografías de rata tomadas a 10 aumentos (10x). Barra de aumentos: 100 µm.

En el Modelo 2 (Modelo de malaria) la distribución de las ROIs fue la siguiente:

- En el caso del CS se emplearon 6 ROIs de un área específica de 0,02026 mm² que se colocaron dentro de cada una de las microfotografías (**Fig.40A**), además de incluir una ROI adicional como blanco para eliminar el background. El área total cuantificada fue de 0,12159 mm².
- En el caso del NGLd se emplearon 8 ROIs de un área específica de 0,01044 mm² que se colocaron dentro de cada una de las microfotografías (**Fig.40B**), se incluyó un ROI adicional como blanco. El área total cuantificada fue de 0,08354 mm²
- En el caso de la V1 se emplearon 4 ROIs en cada una de las capas (II, III, IV, V y VI, **Fig.40C**). Cada ROI tenía un área específica de 0,01044 mm², además en cada capa se incluyó una ROI como blanco. El área total cuantificada en cada fotografía fue de 0,20885 mm². En un análisis posterior se agruparon los ROIs en dos grupos: corteza externa (capas II-III) e interna (capas IV, V y VI).

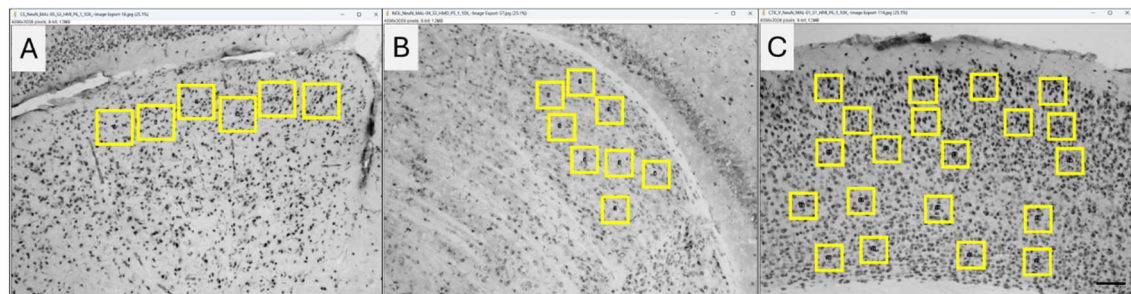


Figura 40. Análisis por densitometrado del marcador NeuN en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 2. Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador NeuN en cada uno de los núcleos estudiados: (A) colículo superior, CS; (B) núcleo geniculado lateral dorsal, NGLd; y (C) corteza visual primaria, V1. En cada microfotografía se muestran, a modo de ejemplo, la posición de regiones de interés (*regions of interest*, ROIs), mediante unos rectángulos amarillos, analizadas. Microfotografías de ratón tomadas a 10 aumentos (10x). Barra de aumentos: 100 µm.

El análisis cuantitativo de las **células de GFAP positivas** se realizó sobre 2 microfotografías tomadas de cada uno de los núcleos objeto del estudio, con un aumento de 10x. En cada microfotografía se realizó un análisis por densitometría óptica digital empleando el software libre ImageJ (*Research Services Branch-NIH*, EE. UU.). Al igual que en el caso de NeuN, se diseñaron ROIs específicos, los cuales fueron colocados de forma aleatoria realizando los mínimos ajustes necesarios para situarlos sobre la estructura a analizar. En todos los casos los resultados se expresan en unidades arbitrarias de D.O.

Las ROIs para la cuantificación del marcador GFAP en el Modelo 1 fueron:

- En el caso del CS (**Fig.41A**) y de la V1 (**Fig.41C**), se emplearon 10 ROIs de un área específica de $0,00273 \text{ mm}^2$ que se colocaron dentro de cada una de las microfotografías, además de incluir una ROI adicional como blanco para eliminar el *background*. El área total cuantificada fue de $0,02729 \text{ mm}^2$ en cada una de las zonas.
- En el caso del NGLd (**Fig.41B**) se emplearon 4 ROIs de un área específica de $0,01829 \text{ mm}^2$ que se colocaron dentro de cada una de las microfotografías, se incluyó una ROI adicional como blanco. El área total cuantificada fue de $0,07315 \text{ mm}^2$.

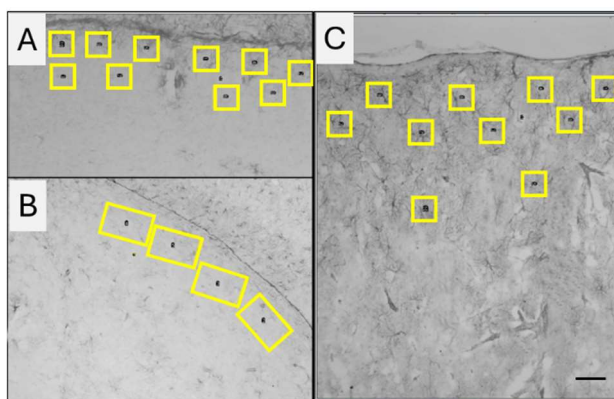


Figura 41. Análisis por densitometrado del marcador GFAP en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 1. Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador GFAP en cada uno de los núcleos estudiados: (A) colículo superior, CS; (B) núcleo geniculado lateral dorsal, NGLd; y (C) corteza visual primaria, V1. En cada microfotografía se muestran, a modo de ejemplo, la posición de regiones de interés (*regions of interest*, ROIs) mediante unos rectángulos amarillos, analizadas. Microfotografías de rata tomadas a 10 aumentos (10x). Barra de aumentos: $100 \mu\text{m}$.

Los resultados obtenidos en el Modelo 1, nos permitieron definir un análisis más exhaustivo de la expresión de GFAP en el Modelo 2; para ello las ROIs se distribuyeron de la siguiente manera:

- En el caso del CS (**Fig.42A**) se cuantificó por separado la zona periférica en la que se emplearon 8 ROIs de $0,00199 \text{ mm}^2$; y la zona central en la que se emplearon 6 ROIs de $0,01169 \text{ mm}^2$. Las ROIs se distribuyeron dentro de cada zona, y se incluyó una ROI en común como blanco. El área total cuantificada en el CS fue de $0,08605 \text{ mm}^2$.

- En el NGLd (**Fig.42B**) la expresión de GFAP también se cuantificó diferenciando la zona periférica (se emplearon 5 ROIs de 0,00172 mm²; 6 ROIs de 0,00144 mm² y 5 ROIs de 0,00099 mm²) de la zona central (se colocaron 6 ROIs de 0,00579 mm²). Las ROIs se distribuyeron dentro de cada zona, y se incluyó una ROI en común como blanco. El área total cuantificada en el NGLd fue de 0,05697 mm².
- En V1 (**Fig.42C**) se emplearon 12 ROIs de un área de 0,01044 mm²: 6 de los ROIs se situaron en la zona externa (capas II-III); y los otros 6 en la interna (capas IV-V-VI). Se estableció una ROI como blanco por cada zona. El área total fue de 0,12532 mm².

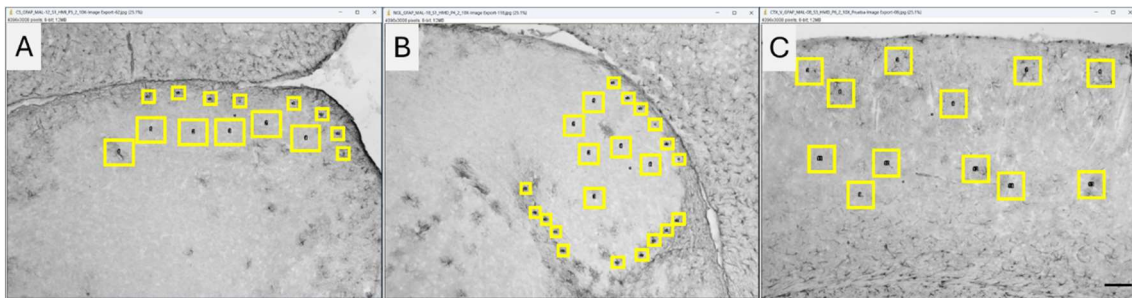


Figura 42. Análisis por densitometrado del marcador GFAP en los núcleos de relevo de la vía visual en el Modelo 2. Microfotografías representativas de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador GFAP en cada uno de los núcleos estudiados: (A) colículo superior, CS; (B) núcleo geniculado lateral dorsal, NGLd; y (C) corteza visual primaria, V1. En cada microfotografía se muestran, a modo de ejemplo, la posición de regiones de interés (*regions of interest*, ROIs) mediante unos rectángulos amarillos, analizadas. Microfotografías de rata tomadas a 10 aumentos (10x). Barra de aumentos: 100 μ m.

El análisis de las **células microgliales** se realizó sobre 2 microfotografías tomadas con un aumento de 10x de cada uno de los tres núcleos de relevo estudiados. En cada una de las imágenes se incorporó, de forma automática, una cuadrícula (GRID) de contaje mediante el software ImageJ (Research Services Branch-NIH, EE. UU.) (**Fig.43**), cuyas celdas se numeraron de izquierda-derecha y de arriba-abajo; posteriormente mediante un generador de números aleatorios se establecieron las celdas en las que se llevó a cabo el contaje manual de todas las células Iba1⁺. Los resultados se expresaron como el número de células inmunopositivas (células Iba1⁺) por unidad de área (10⁴ μ m²).

- En el Modelo 1, en el CS y en la V1 se cuantificaron 6 GRIDs de 0,01838 mm² cada uno, cuantificando un área total en cada zona de estudio de 0,11025 mm². En el caso del NGLd se cuantificaron 6 GRIDs de 0,07350 mm² cada uno, cuantificando un área total de 0,44100 mm².
- En el Modelo 2, se cuantificaron 10 GRIDs en el CS, 7 en el NGLd y 20 en la V1; con un tamaño de 0,01838 mm² cada uno. En este marcador, al igual que en el caso de GFAP, en la V1 también se realizó un estudio más detallado contando 8 GRIDs en corteza externa (capas II-III) y 12 en la corteza interna (capas IV, V y VI). El área total

cuantificado en el CS, el NGLd y la V1, fue de 0,18375 mm², 0,12862 mm² y 0,36750 mm², respectivamente.

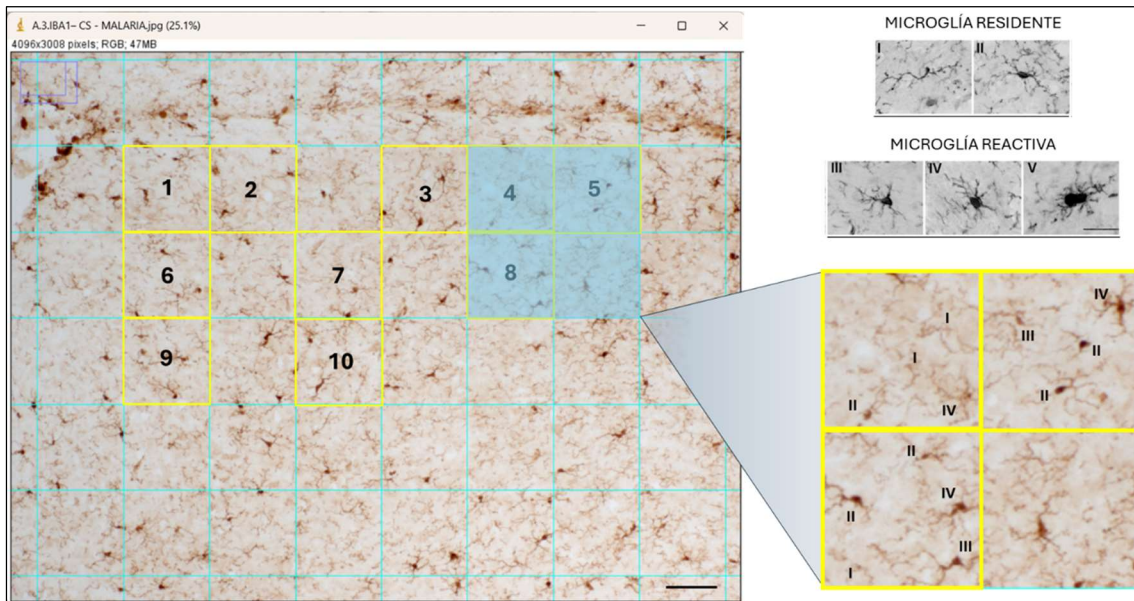


Figura 43. Análisis por conteo de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual. Imagen representativa de la cuantificación realizada en cada una de las inmunotinciones del marcador Iba1. Se muestra una fotografía (10x), a modo de ejemplo, del colículo superior de ratón. Se dividió la imagen en celdillas “Grids” y se procedió al conteo de los diferentes morfotipos microgliales. Barra de aumentos: 100 μ m. En la parte superior se muestra la clasificación de las células microgliales en función de su morfología en cinco morfotipos diferentes: los morfotipos I y II corresponden a la microglía residente; mientras que los morfotipos III, IV y V corresponden a la microglía reactiva. Microfotografías de rata tomadas a 40 aumentos (40x). Barra de aumentos: 10 μ m.

Por otro lado, en cada uno de los *Grids* de conteo se realizó un estudio de los diferentes morfotipos de las células microgliales (**Fig.43**) de acuerdo a la siguiente clasificación (Diz-Chaves *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2021): tipo I, células con soma pequeño y una o dos prolongaciones; tipo II, soma pequeño con 3-5 prolongaciones largas; tipo III, células con un soma poligonal y/o más de 5 prolongaciones; tipo IV, células con un gran soma y prolongaciones más cortas y anchas; y tipo V (morfotipo ameboide), con un gran soma y un gran número de cortas prolongaciones alrededor. Los morfotipos I y II se consideran como los morfotipos de la microglía residente, aquellas células que están en situación fisiológica controlando el ambiente que les rodea. Por otro lado, los morfotipos III, IV y V, se consideran los morfotipos reactivos, cuyo número y expresión de Iba1 aumenta en situaciones de daño. Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje relativo de cada uno de los morfotipos respecto al número total de células inmunopositivas (células Iba1⁺).

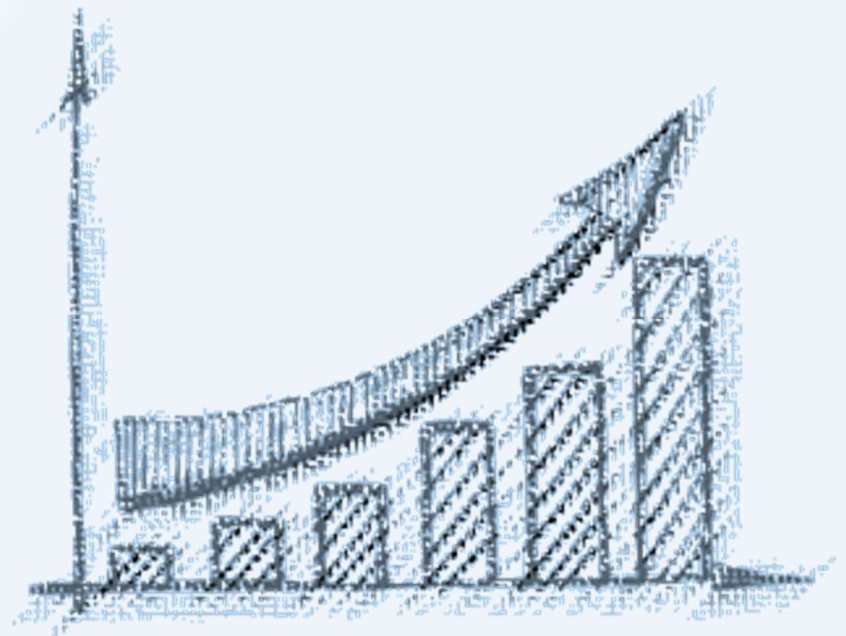
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El cálculo del tamaño muestral se realizó usando la calculadora online: <https://www.datarus.eu/aplicaciones/granmo/> y considerando un riesgo α de 0,05 y una potencia estadística superior a 0,8 en contraste unilateral; los cálculos se realizaron para detectar una diferencia mínima de entre 1,8 y 2,1 unidades entre las parejas de grupos asumiendo 4 grupos experimentales en cada uno de los estudios. Los cálculos mostraron la necesidad de un total de 10 sujetos en los grupos animales de las patologías, en los que se consideró una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%; y de 5 sujetos en los grupos de control en los que no se consideró pérdida alguna.

Los datos obtenidos se analizaron considerando dos variables independientes, con 2 niveles cada una de ellas: el modelo o patología (LPS o Malaria, y su correspondiente Control), y el tratamiento farmacológico (CIL o VH). Se aplicaron análisis paramétricos siempre que fue posible, generalmente un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2 vías. Se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de las variables, con las pruebas de Shapiro-Wilk y el test de Levene respectivamente; en caso de no cumplir dichos requisitos, los datos se transformaron, empleando el logaritmo neperiano (Ln). En todos los casos se tomó como valor significativo un p-valor menor a 0,05. En aquellos casos en los que se encontró una interacción significativa se realizaron las comparaciones a posteriori aplicando el test de Tukey. En el caso de variables no normales y/o no homocedásticas, incluso tras la transformación de la misma, se aplicaron pruebas no paramétricas: test de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones a posteriori por pares con la corrección de Bonferroni. Las correlaciones se realizaron con el test de Pearson, como la realizada entre la concentración de hemoglobina y la parasitemia a día 6.

La presentación de los resultados estadísticos incluye el valor del estadístico, los grados de libertad de cada análisis y el p-valor alcanzado. Se obtuvo además el tamaño del efecto mediante el cálculo de la eta parcial al cuadrado (η^2), alcanzando en los casos de los efectos estadísticamente significativos un tamaño del efecto grande (valor superior al 0,14), por lo que los resultados obtenidos se consideraron como biológicamente relevantes. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS (versión 27, IBM, EE. UU.), mientras que los gráficos se generaron con el programa *GraphPad Prism*® (versión 8.0.2, San Diego, CA, EE. UU.), presentándose principalmente histogramas que muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.).

RESULTADOS



1. RESULTADOS: MODELO ANIMAL DE SEPSIS

1.1. PESO CORPORAL Y VALORACIONES BIOQUÍMICAS

El análisis del peso corporal de los animales no mostró diferencias estadísticamente significativas tras la administración de los diferentes tratamientos (no se muestran los datos). Sin embargo, al analizar las diferencias en el peso corporal de los animales encontramos un efecto estadísticamente significativo del tratamiento farmacológico [$X^2(3)=16,37$; $p<0,001$] mostrando los animales tratados con LPS una mayor pérdida de peso que animales del grupo VH-CIL (LPS-VH vs. VH-CIL, $p<0,001$; LPS-CIL vs. VH-CIL, $p=0,012$), aunque las diferencias con el grupo control (VH-VH) no resultaron estadísticamente significativas. Cabe destacar además que en el grupo LPS-VH más de la mitad de los animales (5 de 9) mostró una pérdida de peso notable (mayor del 10%), mientras que en el grupo LPS-CIL este porcentaje se reduce hasta el 25% (2 de 8). Podemos, por tanto, indicar que el tratamiento con LPS provocó una considerable pérdida de peso en estos animales, y que dicha pérdida resultó menos marcada en los animales que habían recibido además el tratamiento con CIL (**Fig.44**).

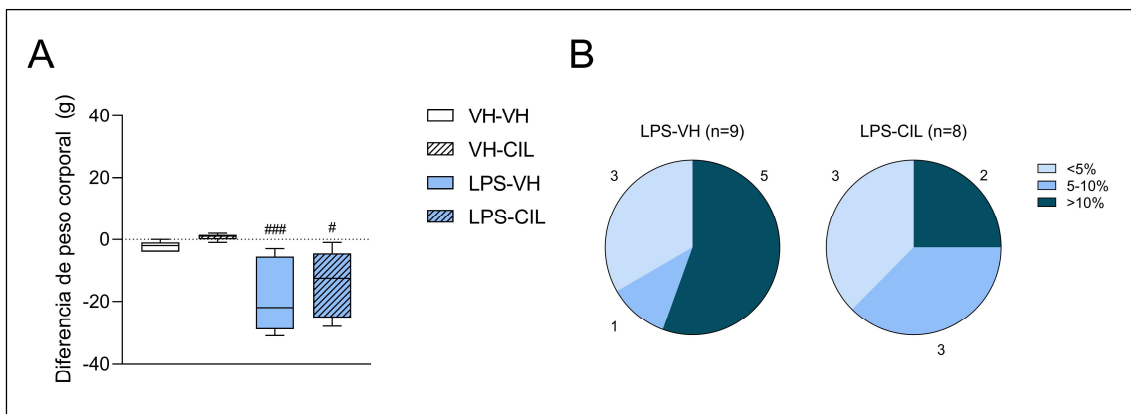


Figura 44. Análisis del peso corporal. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los pesos se registraron antes de los tratamientos y 24 h tras la administración de los mismos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. **(A) Cambio en el peso corporal.** Se muestran las diferencias de peso entre el peso de los animales en el día del sacrificio y el de los tratamientos. El histograma muestra la mediana \pm la desviación estándar (D.E.). Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: # $p<0,05$, ### $p<0,001$ vs. VH-CIL. **(B) Diagrama de frecuencias de la severidad de la pérdida de peso.** Se muestra la distribución de los animales de los grupos experimentales tratados con LPS en función de la severidad de la pérdida de peso mostrada (n=5-9 animales por grupo experimental).

Las valoraciones bioquímicas, es decir, el análisis de los niveles de creatinina sérica y de NUS, junto con los datos de diuresis y el cálculo de la TFG, nos permitieron inferir la presencia de un daño renal en los animales tratados con LPS. Al analizar los niveles séricos de creatinina (**Fig.45A**) encontramos un efecto estadísticamente significativo del LPS [$F(1,23)=8,87$; $p=0,007$], en ausencia de efectos de CIL [$F(1,23)=0,70$; ns] o de la interacción entre factores [$F(1,23)=0,33$; ns]; en este caso, la administración de LPS indujo un

incremento significativo en los niveles de creatinina sérica. Además, entre los animales administrados con LPS la severidad del daño pareció ser algo menor en los animales tratados con CIL, ya que en el grupo LPS-VH más de la mitad de los animales (5 de 9) mostraron niveles elevados de creatinina sérica (valores superiores a 0,30 mg/dL), y en el grupo LPS- CIL este porcentaje de afectación se vio reducido por debajo del 40% (3 de 8) (Fig.45B). Al analizar los niveles de NUS (Fig.45C) no se observaron diferencias estadísticamente significativas [$X^2(3)=5,84$; ns], aunque el perfil de la gráfica fue muy similar; y, de la misma manera que para los niveles de creatinina, los niveles de NUS fueron mayores en los animales del grupo LPS-VH, donde más de la mitad de los animales (5 de 9) presentaron valores por encima de los 20 mg/dL, mientras que en el grupo doble tratado, LPS-CIL, este porcentaje se redujo a la mitad, al 25% (2 de 8) (Fig.45D).

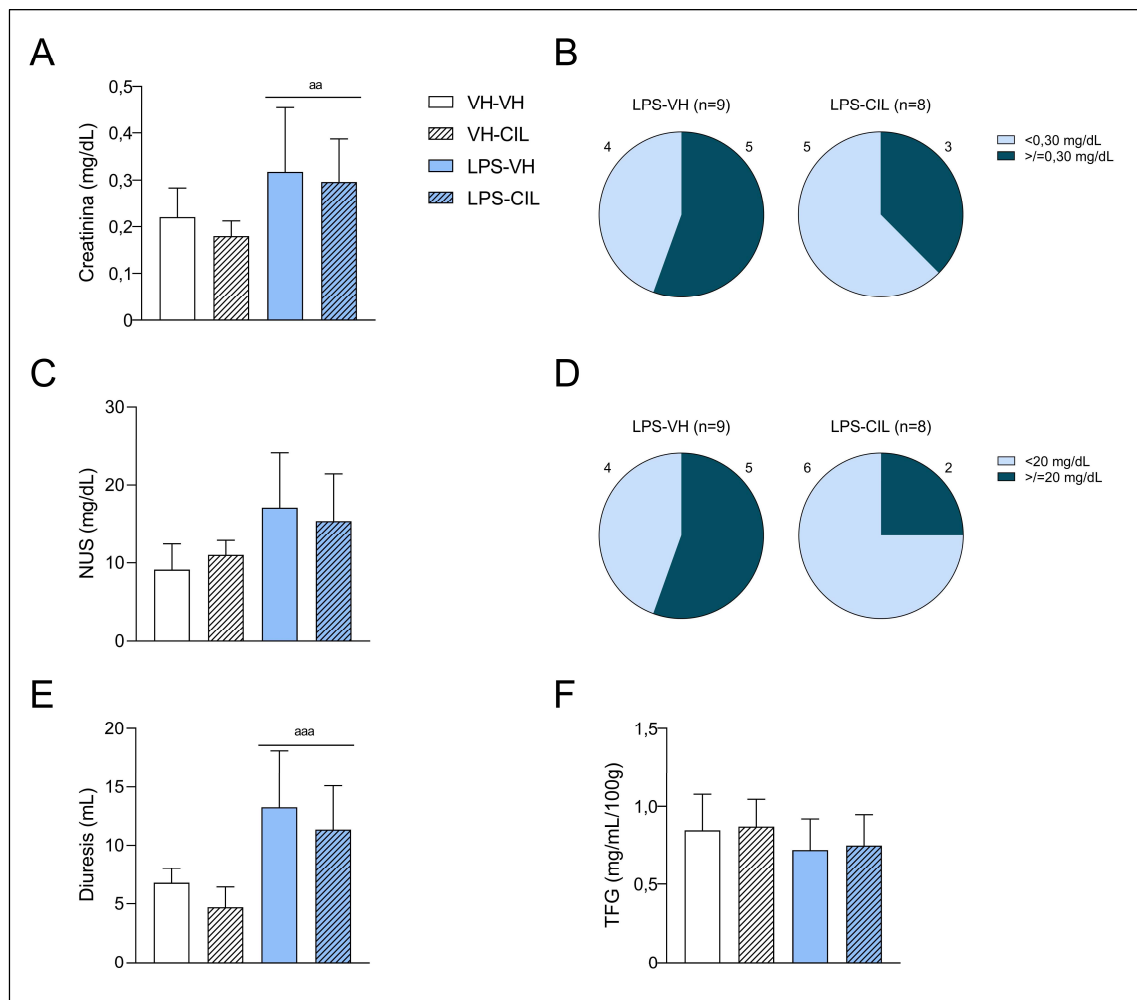


Figura 45. Parámetros para la evaluación de la función renal. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; las muestras de sangre se tomaron de la aorta abdominal a las 24h de la administración de los tratamientos, y la orina se recogió en la jaula metabólica en la que se estableció a los animales durante dicho periodo. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. (A-B) Niveles de creatinina sérica y distribución de la severidad del daño en los animales tratados con LPS; (C-D) Niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y distribución de la severidad del daño en los animales tratados con LPS; (E) Diuresis; y (F) Tasa de Filtración Glomerular (TFG). Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), mientras que en los diagramas de frecuencia se muestra la distribución de los animales de los grupos experimentales tratados con LPS en función de la severidad del daño renal. ANOVA de 2 vías: ^{aa}p<0,01, ^{aaa}p<0,001 efecto general del LPS. (n=5-9 animales por grupo experimental)

En los animales experimentales se encontró además un efecto estadísticamente significativo de la administración de LPS sobre la diuresis (**Fig.45E**) [$F(1,22)=25,76$; $p<0,001$], en ausencia de efectos de CIL [$F(1,22)=3,52$; ns] o de la interacción entre fármacos [$F(1,22)=0,76$; ns]. En este caso, la administración de LPS produjo un aumento en el volumen de orina diario. Sin embargo, no se observaron cambios en los valores de la TFG (**Fig.45F**) [LPS: $F(1,22)=2,37$; ns; CIL: $F(1,22)=0,11$; ns; LPS x CIL: $F(1,22)=0,00$; ns].

Resumen:

Una única dosis de LPS (10 mg/kg) produjo, a corto plazo (24 h), una pérdida de peso significativa y una disfunción renal que se manifestó mediante un aumento en la diuresis y un incremento en los niveles de creatinina sérica.

La administración de CIL no modificó estos parámetros *per se*, pero sí fue capaz de atenuar tanto la pérdida de peso como la severidad del daño renal descrito.

1.2. ESTUDIO *IN VIVO* DE LA RETINA: TCO

Los efectos del LPS y de la CIL fueron también evaluados, *in vivo*, mediante la aplicación de la TCO. En este caso se llevó a cabo un estudio piloto inicial en el que se emplearon 8 ratas *Wistar*, 2 por grupo experimental. Antes de la realización de los procedimientos se verificó la pérdida de peso en estos animales tras la administración del LPS (Diferencia de peso: VH-VH: $1,88 \pm 0,84\%$; VH-CIL: $2,14 \pm 0,28\%$; LPS-VH: $11,70 \pm 0,02\%$; LPS-CIL: $12,97 \pm 2,42\%$). En la TCO se evalúa el grosor de la retina en la zona más próxima al NO, y, en un primer análisis por sectores concéntricos encontramos un efecto estadísticamente significativo del LPS, incrementando el grosor de la retina (**Fig.46A**), en los sectores situados a 1mm (AS1: LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,002$; LPS-VH vs. VH-CIL, $p<0,001$) y a 2 mm (AS2: LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,040$; LPS-VH vs. VH-CIL, $p=0,003$), pero no en la zona más central (C0: LPS-VH vs. VH-VH, ns; LPS-VH vs. VH-CIL, $p<0,001$). Cabe destacar además que la administración de CIL, *per se*, ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre el grosor de la retina, en este caso sólo en C0 (VH-CIL vs. VH-VH, $p=0,025$) y AS1 (VH-CIL vs. VH-VH, $p=0,043$), no en AS2, reduciendo el grosor de la misma. En los animales LPS-CIL se observó un patrón similar a los animales LPS-VH (C0: LPS-CIL vs. VH-VH, ns; LPS-CIL vs. VH-CIL, $p<0,001$; AS1: LPS-CIL vs. VH-VH y VH-CIL, $p<0,001$; AS2: LPS-CIL vs. VH-VH y VH-CIL, $p<0,001$). Al analizar más en detalle las diferentes regiones de la retina (**Fig.46B**) en la TCO encontramos que el efecto del LPS fue sólo estadísticamente significativo en la subárea N1 (LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,039$), es decir, el sector más nasal localizado a 1 mm de C0. La administración *per se* de CIL no indujo cambios en las subregiones; sin embargo, la combinación de tratamientos incrementó el grosor de la retina en varias subregiones (S1, I1, T1, S2, T2: LPS-CIL vs. VH-VH, $p<0,05$; N1: LPS-CIL vs. VH-VH, $p<0,001$). En la TCO se analizaron también los datos relativos al grosor de la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

En global, la administración de LPS parece provocar un edema en la retina, mayor en AS1 y que se reduce ligeramente en AS2 que presenta un gradiente desde; este edema parece además tener una presencia mayor en la zona N1 de la misma. La administración de CIL, por el contrario, parece reducir el grosor de la retina en las zonas más centrales (C0 y S1), aunque la combinación de los fármacos no parece ejercer un efecto protector frente a este edema.

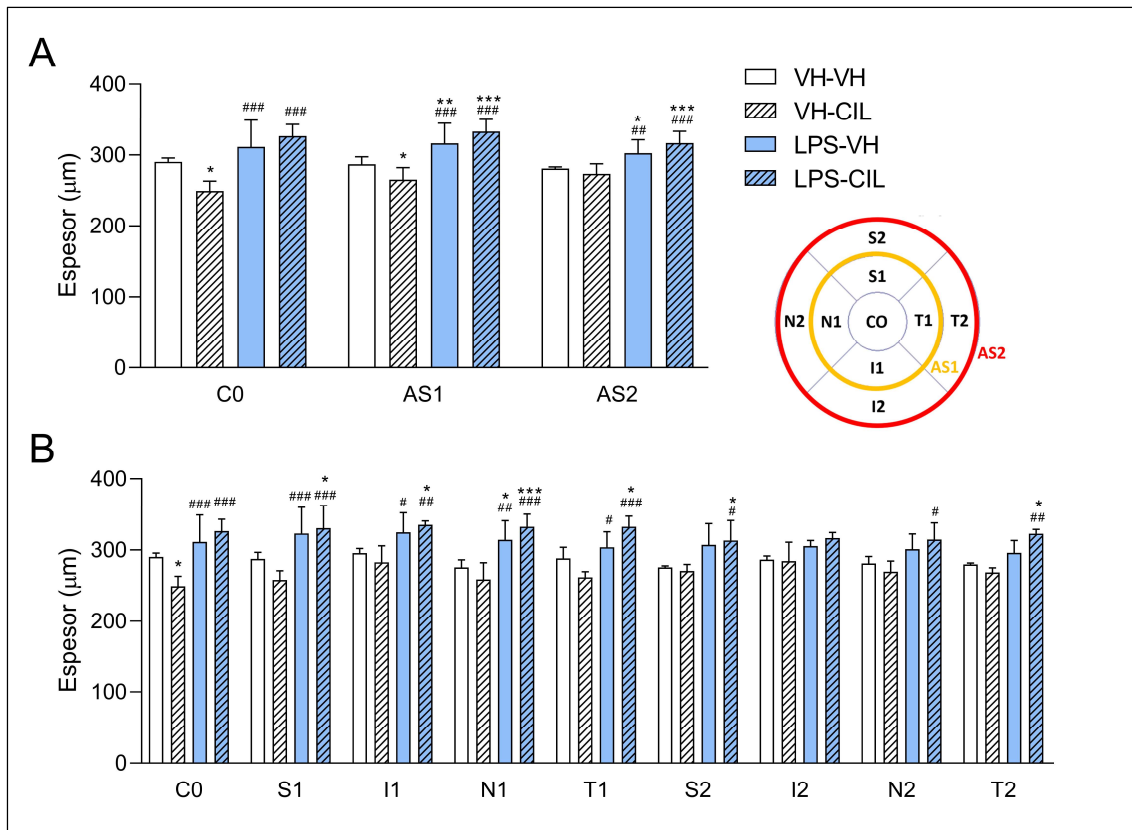


Figura 46. Análisis de la retina mediante TCO. (A) Análisis del espesor total de la retina en las diferentes áreas y **(B)** subáreas, según el esquema mostrado en la figura. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco citastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales fueron evaluados en la TCO en condiciones de anestesia profunda a las 24 h de la administración de los fármacos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.). Áreas y subáreas consideradas: centro óptico, C0; área sectorial 1, AS1, situada a 1 mm del centro óptico, y área sectorial 2, AS2, situada a 2 mm; diferenciándose en zonas superior, S; inferior, I; nasal, N; y temporal, T. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. VH-VH; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. VH-CIL. (n=2 por grupo experimental).

Resumen:

La evaluación *in vivo* mediante TCO permitió describir un edema en la retina de los animales tratados con LPS, en los sectores centrales próximos al NO, en AS1 y AS2, y fundamentalmente en la región nasal (N1). El grosor de la CFNO no se vio afectado.

El tratamiento con CIL provocó, *per se*, una reducción en el grosor de la retina en las zonas más centrales (C0 y AS1). Sin embargo, la combinación de fármacos no fue capaz de corregir el edema inducido por el LPS. EL grosor de la CFNO no se vio afectado ni por la CIL ni por la combinación de los fármacos.

Aunque preliminar, este primer estudio piloto resulta de gran interés dado su potencial traslacional en la evaluación y seguimiento del daño provocado en la retina por diversos factores (en este caso, por la administración del LPS), así como en la valoración de diversos fármacos protectores.

1.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA

1.3.1. Análisis de las células ganglionares de la retina (células Brn3a⁺)

En el análisis estadístico del número total de células Brn3a⁺, empleado como marcador de las células ganglionares de la retina (CGRs, **Fig.47**), observamos un efecto general de la administración de LPS [$F(1, 14)=8,16$; $p=0,013$], que redujo ligeramente la expresión de este marcador. En ausencia de efectos estadísticamente significativos de la CIL [$F(1, 14)=3,02$; ns] o de la interacción entre factores [LPS x CIS: $F(1, 14)=1,07$; ns].

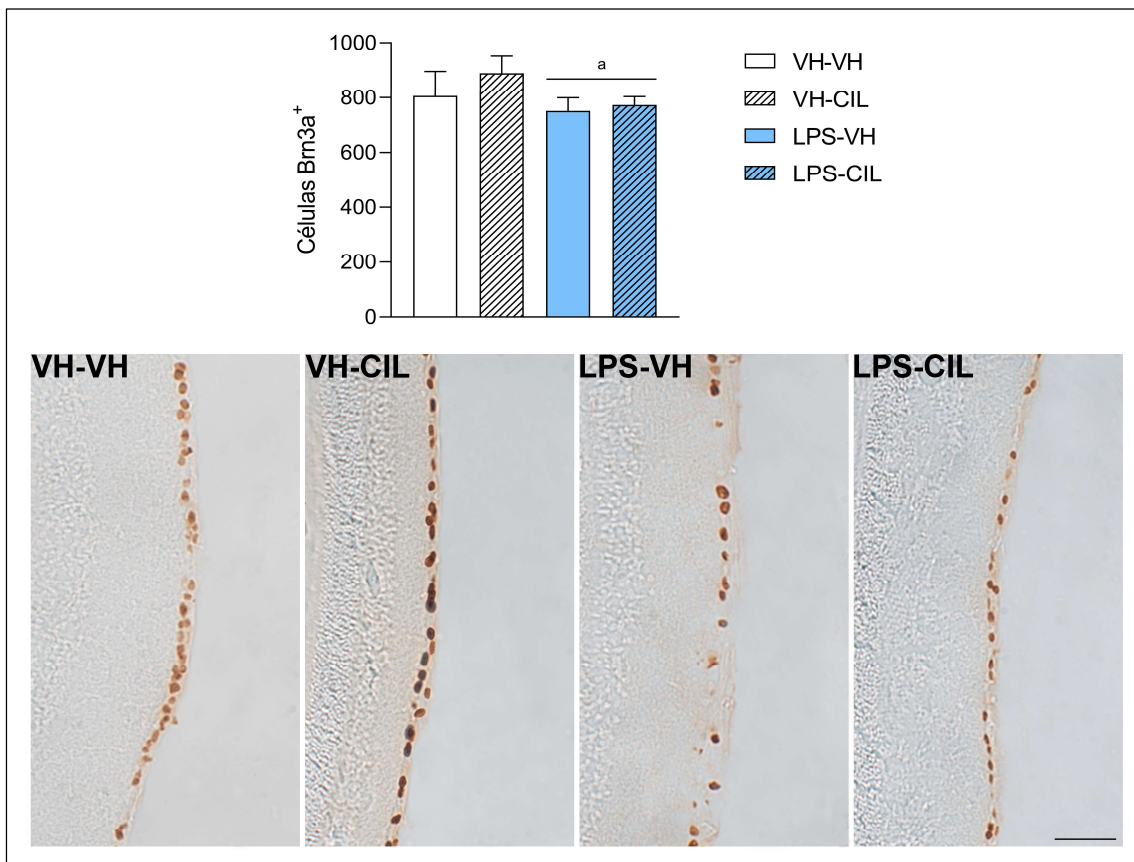


Figura 47. Expresión de células Brn3a⁺ en la retina completa en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media \pm la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. ANOVA de 2 vías: $^{\circ}p<0,05$, efecto general del LPS. (n=4-5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

El análisis detallado de las diferentes áreas (**Fig.48**) reveló una marcada reducción en el número de células Brn3a⁺ en el área Nasal-Inferior (LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,003$), junto con ligero efecto general del LPS en el área Temporal-Central, donde también redujo la expresión del marcador. Por el contrario, CIL, *per se*, indujo un incremento en el marcaje de Brn3a⁺ en el área Nasal-Superior (efecto general de la CIL, $p<0,05$), Central-Inferior (VH-CIL vs. VH-VH, $p<0,001$) y Temporal-Inferior (VH-CIL vs. VH-VH; $p=0,022$). Cabe destacar que,

en el área Nasal-Inferior de la retina, la CIL fue capaz de prevenir y/o revertir la reducción en el número de células Brn3a⁺ inducida por LPS (LPS-CIL vs. LPS-VH, p<0,001). Sin embargo, en el área Temporal-Inferior la combinación de ambos tratamientos redujo ligeramente la expresión de este marcador (LPS-CIL vs. VH-VH, p=0,046), efecto que, en ausencia de diferencias estadísticas, también parece observarse en el área Temporal-Superior (LPS-CIL vs. VH-CIL; p<0,01) (para más detalles sobre los resultados estadísticos, consultar la **Tabla 14**).

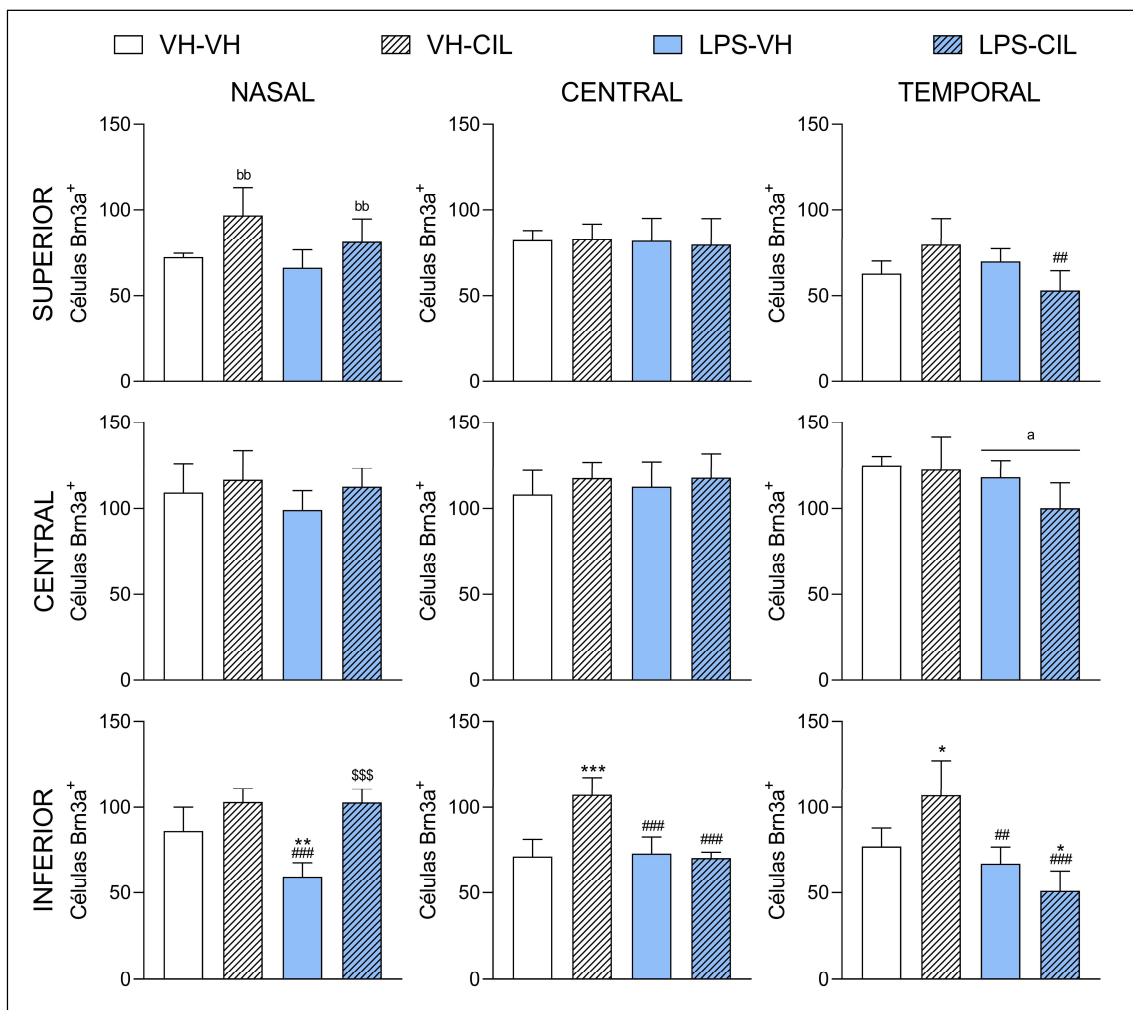


Figura 48. Expresión de células Brn3a⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su vehículo; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar (D.E.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^ap<0,05 efecto general del LPS; ^{bb}p<0,01 efecto general de la CIL; ^{*}p<0,05, ^{**}p<0,01, ^{***}p<0,001 vs. VH-VH; ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 vs. VH-CIL; ^{\$\$\$}p<0,001 vs. LPS-VH. (n=4-5 animales por grupo experimental)

Tabla 14. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Brn3a⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis

Células Brn3a ⁺		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	LPS	F(1,15)=3,62; ns	F(1,15)=0,11; ns	F(1,16)=4,06; p=ns
	CIL	F(1,15)=12,07; p=0,003	F(1,15)=0,02; ns	F(1,16)=0,00; ns
	LPS x CIL	F(1,15)=0,70; ns	F(1,15)=0,07; ns	F(1,16)=11,92; p=0,003
CENTRAL	LPS	F(1,16)=1,19; ns	F(1,16)=0,17; ns	F(1,16)=6,30; p=0,023
	CIL	F(1,16)=2,64; ns	F(1,16)=1,58; ns	F(1,16)=2,99; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=0,22; ns	F(1,16)=0,14; ns	F(1,16)=1,66; ns
INFERIOR	LPS	F(1,16)=9,24; p=0,008	F(1,14)=14,37; p=0,002	F(1,14)=27,57; p<0,001
	CIL	F(1,16)=46,31; p<0,001	F(1,14)=13,56; p=0,002	F(1,14)=1,17; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=8,97; p=0,009	F(1,14)=18,12; p=0,001	F(1,14)=13,39; p=0,003

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad; p, p-valor; ns, no significativo. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey (resultados mostrados en Fig.48).

Resumen:

La administración periférica de LPS indujo una reducción generalizada en el número de células Brn3a⁺ en la retina global, y, más concretamente en el área Nasal-Inferior. CIL fue capaz de atenuar dicha reducción, y, además, *per se*, CIL indujo un incremento en la expresión de este marcador en áreas específicas de la retina.

1.3.2. Análisis de las poblaciones macrogliales de la retina (células GFAP⁺)

En cuanto a la expresión del marcador GFAP, empleado para la identificación de las poblaciones macrogliales de la retina, astrocitos y células de Müller (**Fig.49**) el análisis estadístico mostró un efecto general del LPS [F(1,16)=21,91; p<0,001], en ausencia de efectos de la CIL [F(1,16)=0,22; ns], pero en presencia de una interacción significativa entre factores [LPS x CIL: F(1,16)=14,36; p=0,002]. Los análisis a posteriori mostraron un incremento significativo en la expresión de GFAP en la retina de los animales tratados con LPS (LPS-VH vs. VH-VH, p<0,001; LPS-VH vs. VH-CIL, p=0,038), y un efecto similar, aunque de menor magnitud en los animales tratados con LPS y CIL (LPS-CIL vs. VH-VH, p=0,011), cuyo marcaje con GFAP también resultó diferente del mostrado por el grupo tratado únicamente con LPS (LPS-CIL vs. LPS-VH, p=0,040); es decir, la administración de CIL atenuó parcialmente la activación macroglial inducida por el LPS en la retina global. De hecho, al observar las microfotografías de las retinas (**Fig.49**) correspondientes al grupo LPS-VH se observa un marcaje muy intenso de GFAP, pudiendo distinguirse las prolongaciones de las células de Müller que se extienden por las diferentes capas de la retina; mientras que, en el grupo doble tratado, LPS-CIL, aunque se distinguen las prolongaciones, su marcaje es mucho más tenue y parece limitarse a las capas más internas de la retina.

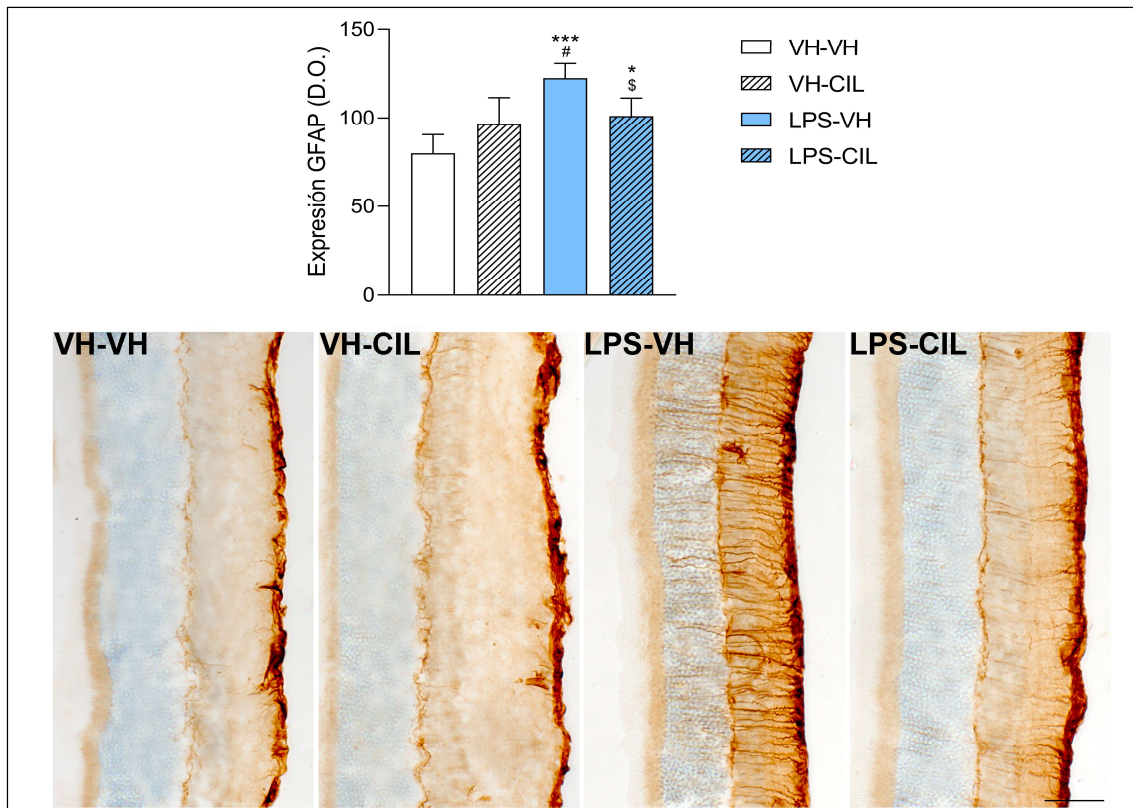


Figura 49. Expresión del marcador GFAP en la retina completa en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media \pm la desviación estándar (D.E.) de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. VH-VH; # $p < 0,05$ vs. VH-CIL; \$ $p < 0,05$ vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el análisis por áreas (**Fig. 50**), se observó un efecto generalizado del LPS en todas las áreas de la retina, observándose un incremento en la expresión de GFAP, de mayor magnitud en las áreas más próximas al disco óptico: Nasal-Superior, Nasal-Central, Central-Central, y Central-Inferior (LPS-VH vs. VH-VH, $p < 0,001$); un incremento algo menor en las áreas Central-Superior, Temporal-Superior, y Temporal-Inferior (LPS-VH vs. VH-VH, $p < 0,01$); y un efecto general del LPS en las áreas Nasal-Inferior y Temporal-Central (consultar **Tabla 15**). Por el contrario, la CIL fue capaz de atenuar dicha activación en las áreas Central-Superior, Temporal-Superior y Temporal-Inferior, donde el grupo doble tratado (LPS-CIL) no mostraba diferencias en el marcaje de GFAP; así como en las áreas Nasal-Superior y Nasal-Central donde la activación de GFAP en los grupos LPS-CIL fue algo menor que en el grupo LPS-VH (LPS-CIL vs. VH-VH, $p = 0,020$ y $p = 0,002$, respectivamente). Cabe destacar que CIL fue capaz de atenuar y/o revertir completamente el efecto de la activación macroglial (incremento en el marcaje de GFAP) inducida por LPS en las áreas Central-Central y Central-Inferior (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p = 0,034$ y $p = 0,003$, respectivamente). Sorprendentemente, CIL, *per se*, también indujo un ligero incremento en la expresión de GFAP en el área Central-Central (VH-CIL vs. VH-VH, $p = 0,031$).

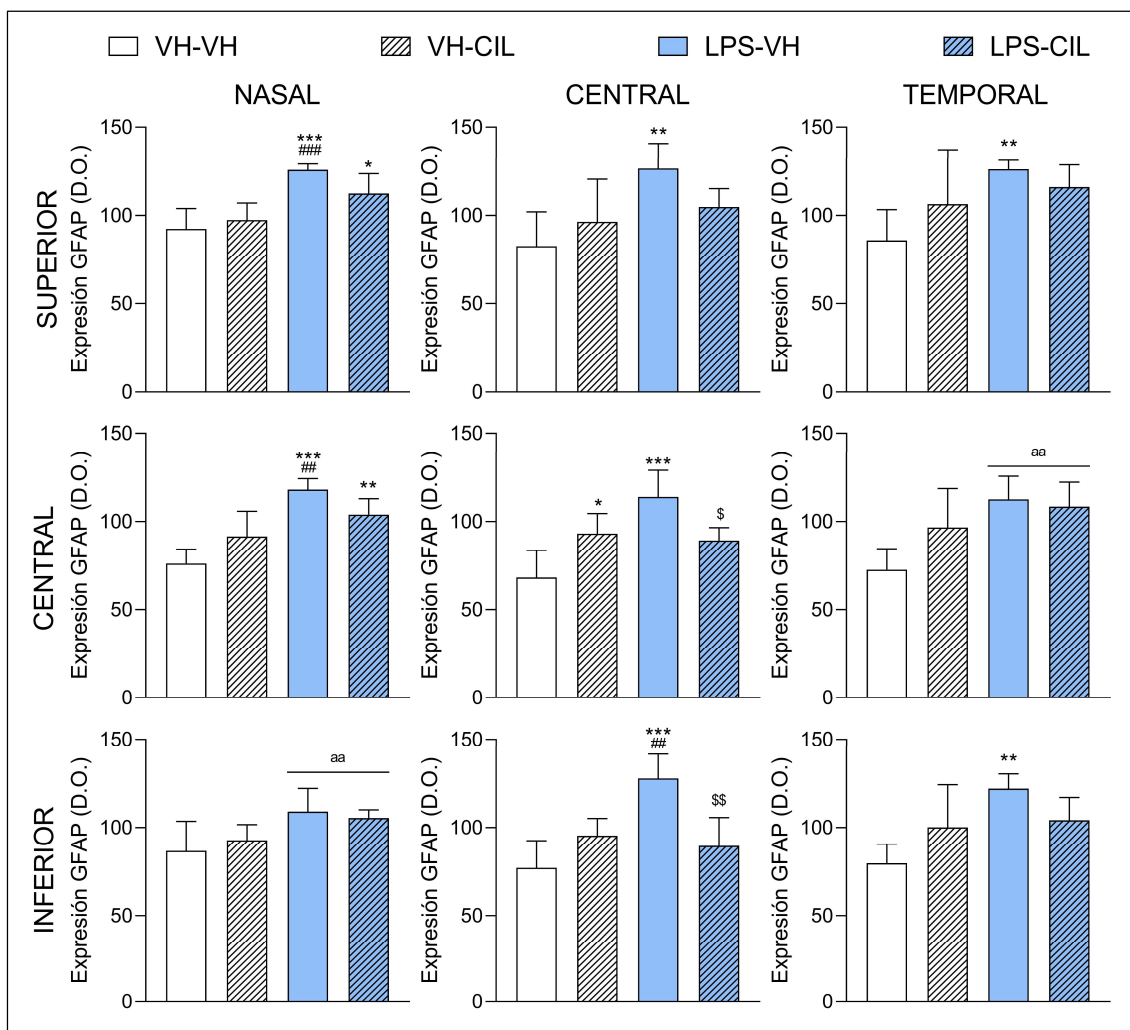


Figura 50. Expresión del marcador GFAP en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.); de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey/Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: ^{aa}p<0,01 efecto general del LPS; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. VH-VH; ###p<0,01, ####p<0,001 vs. VH-CIL; \$p<0,05, \$\$p<0,01 vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 15. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis

GFAP ⁺		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	LPS	F(1,16)=32,28; p<0,001	F(1,16)=10,77; p=0,005	
	CIL	F(1,16)=0,96; ns	F(1,16)=0,26; ns	X ² (3)=10,59; p=0,014
	LPS x CIL	F(1,16)=4,75; p=0,045	F(1,16)=5,01; p=0,040	
CENTRAL	LPS	F(1,16)=37,68; p<0,001	F(1,16)=13,57; p=0,002	F(1,16)=13,49; p=0,002
	CIL	F(1,16)=0,03; ns	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=2,02; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=11,22; p=0,004	F(1,16)=19,08; p<0,001	F(1,16)=4,00; ns
INFERIOR	LPS	F(1,16)=11,01; p=0,004	F(1,16)=12,86; p=0,002	F(1,16)=5,24; p=0,036
	CIL	F(1,16)=0,06; ns	F(1,16)=2,54; ns	F(1,16)=2,28; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=0,85; ns	F(1,16)=20,40; p<0,001	F(1,16)=5,84; p=0,028

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: X²; estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.50).

Se realizó, a continuación, el análisis de la expresión de GFAP en las diferentes capas de la retina (**Fig.51A**) observándose un efecto del LPS en todas ellas, salvo en el SE: la administración de LPS provocó un aumento en la expresión de GFAP (efecto general de LPS en CCG, CPI y CNE, e incremento estadísticamente significativo frente al grupo control, VH-VH, en CNI y CPE, $p<0,001$ y $p=0,019$, respectivamente). En este caso, la administración de CIL, que de forma aislada no produjo ningún efecto, fue capaz de atenuar y/o prevenir el incremento en la expresión de GFAP en la CNI (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p=0,009$) y bloquear la aparición de dicho efecto en la CPE (consultar **Tabla 16** para ver en detalle los resultados del análisis estadístico).

Con objeto de valorar la severidad y progresión del daño en la retina se realizó un análisis posterior comparando las capas más internas de la retina (Retina Interna: CCG, CPI y CNI) frente a las más externas (Retina Externa: CPE, CNE, SE) (**Fig.51B**); tras este análisis encontramos que el daño inducido por LPS fue significativamente mayor en la retina interna frente a la externa (LPS-VH vs. VH-VH, $p<0,001$ y $p=0,037$, respectivamente) (consultar **Tabla 16**). Sin embargo, en este análisis, CIL que no ejerció efectos *per se*, tampoco fue capaz de revertir los efectos del LPS, aunque sí observamos un menor incremento en la expresión de GFAP en el grupo LPS-CIL en la retina interna (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p<0,002$), y una ausencia de tal efecto en la retina externa (LPS-CIL vs. VH-VH, ns).

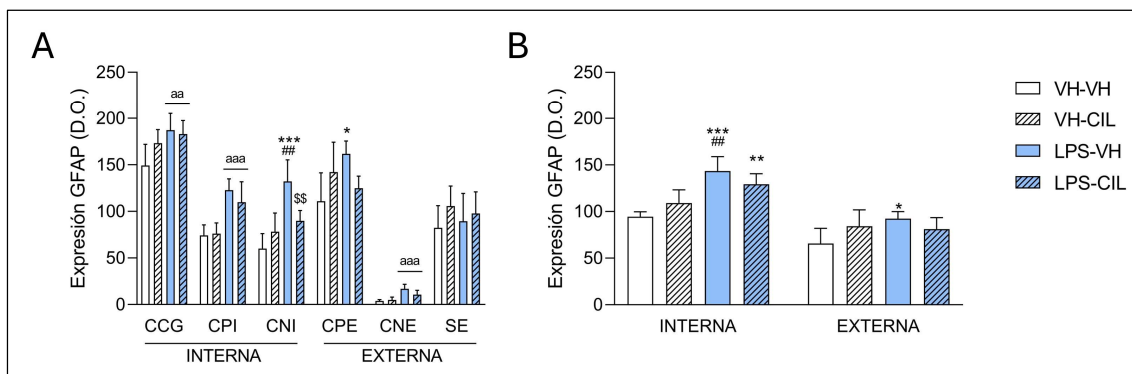


Figura 51. Expresión del marcador GFAP en las capas de la retina (A) y en la retina interna y externa (B) en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.); de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^{aa} $p<0,01$, ^{aaa} $p<0,001$ efecto general del LPS; ^{*} $p<0,05$, ^{**} $p<0,01$, ^{***} $p<0,001$ vs. VH-VH; ^{##} $p<0,01$ vs. VH-CIL; ^{\$\$} $p<0,01$ vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 16. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en la retina interna, retina externa y en las diferentes capas retinianas en un modelo animal de sepsis

GFAP*	INTERNA	CCG	CPI	CNI
LPS	F(1,16)=40,14; p<0,001	F(1,16)=8,94; p=0,009	F(1,16)=38,63; p<0,001	F(1,16)=26,55; p<0,001
CIL	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=1,53; ns	F(1,16)=0,70; ns	F(1,16)=2,22; ns
LPS x CIL	F(1,16)=7,02; p=0,017	F(1,16)=3,06; ns	F(1,16)=1,23; ns	F(1,16)=13,89; p=0,002
	EXTERNA	CPE	CNE	SE
LPS	F(1,16)=3,55; ns	F(1,16)=2,44; ns	F(1,16)=33,54; p=0,001	F(1,16)=0,00; ns
CIL	F(1,16)=0,34; ns	F(1,16)=0,07; ns	F(1,16)=0,60; ns	F(1,16)=2,03; ns
LPS x CIL	F(1,16)=5,64; p=0,030	F(1,16)=10,08; p=0,006	F(1,16)=2,79; ns	F(1,16)=0,45; ns

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis *post-hoc* con el test de Tukey. p, p-valor; ns, no significativo (resultados mostrados en Fig.51).

Resumen:

La administración de LPS produjo un incremento generalizado en la expresión de GFAP en toda la retina, principalmente en las áreas más próximas al disco óptico. Este incremento se observó en todas las capas de la retina, a excepción del SE de los fotorreceptores, pudiendo distinguirse el marcaje de las prolongaciones de las células de Müller en todas las capas, pero fundamentalmente en las capas de la retina interna.

CIL no mostró efectos *per se* en los niveles de expresión de GFAP, pero fue capaz de atenuar y/o revertir la activación microglial inducida por LPS, fundamentalmente en las áreas más centrales de la retina (Central-Central y Central-Inferior), y principalmente en la CNI.

1.3.3. Análisis de las células microgliales de la retina (células Iba1⁺)

El análisis del número de células Iba1⁺, indicativo del número de células microgliales, en la retina completa (**Fig.52**), reveló un efecto general del LPS [F(1,16)=57,41; p<0,001], en ausencia de efectos del factor CIL [F(1,16)=0,00, ns], aunque sí se encontró una interacción significativa entre factores [LPS x CIL: F(1,16)=15,51; p<0,001]. Las comparaciones a posteriori mostraron que los grupos tratados con LPS presentaban un número mayor de células de microglía en la retina completa al compararlos con la cantidad de células marcadas presentes en los grupos control (LPS-VH y LPS-CIL vs. VH-VH, p<0,001). La administración de CIL, *per se*, no modificó el número de células microgliales de la retina, pero sí mostró una tendencia (no significativa) hacia la atenuación del incremento inducido por LPS (LPS-CIL vs. LPS-VH, p=0,058). Estos cambios en el número de células marcadas con Iba1 puede observarse a continuación, en las microfotografías seleccionadas (**Fig.52**).

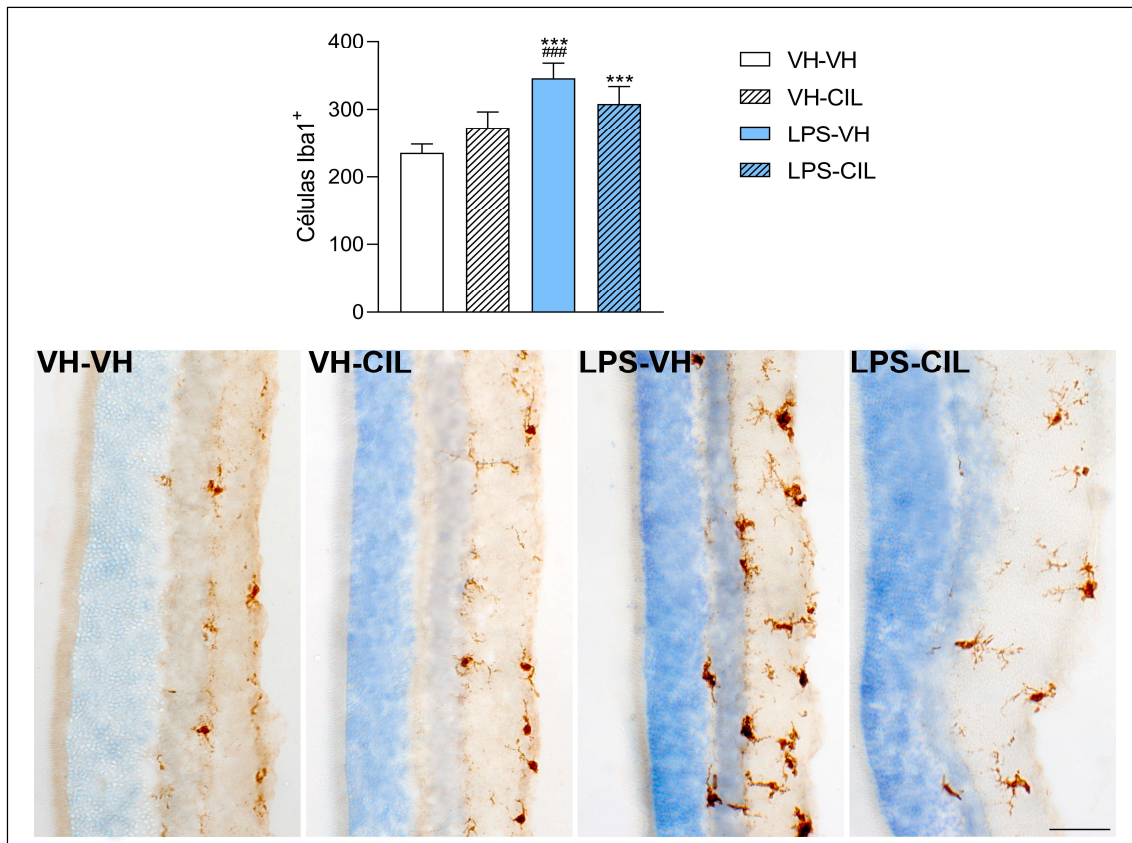


Figura 52. Expresión de células Iba1⁺ en la retina completa en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media \pm la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: *** p <0,001 vs. VH-VH; ### p <0,001 vs. VH-CIL. (n=5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el análisis pormenorizado por áreas (**Fig.53**) se observó que el incremento en el número de células Iba1⁺ provocado por la administración sistémica de LPS era generalizado, observándose dicho efecto en todas las áreas de la retina. El incremento más marcado se detectó en las regiones Nasal-Superior, Nasal-Inferior y Temporal-Central (LPS-VH vs. VH-VH, p <0,001), fue algo menor en las regiones Central-Inferior, Temporal-Superior y Temporal-Inferior (LPS-VH vs. VH-VH, p <0,01), y sólo se encontró como un efecto general del LPS en las áreas Nasal-Central, Central-Superior y Central-Inferior (para más información sobre los análisis estadísticos consultar: **Tabla 17**). CIL mostró un pequeño efecto en el área Temporal-Superior donde aumentó la cantidad de células microgliales (VH-CIL vs. VH-VH, p =0,022), y fue capaz de prevenir y/o revertir el efecto del LPS en el área Nasal-Superior (LPS-CIL vs. LPS-VH; p <0,01) y Nasal-Inferior (LPS-CIL vs. LPS-VH; p <0,001), redujo el efecto del LPS en el grupo doble tratado en el área Temporal-Superior (LPS-CIL vs. VH-VH, p =0,018), y evitó la aparición de dicho efecto en las áreas Central-Inferior y Temporal-Inferior (LPS-CIL vs. VH-VH, ns).

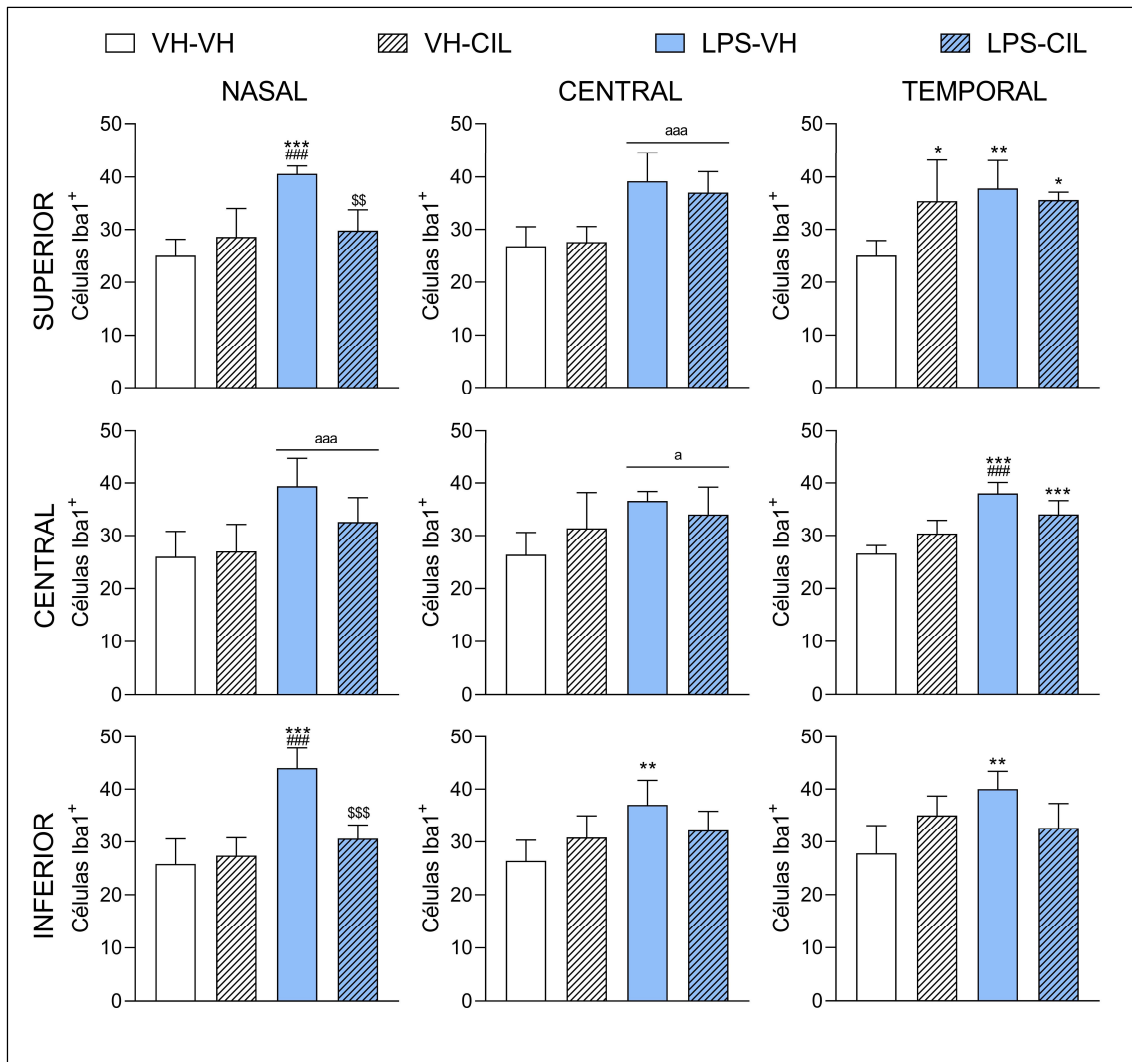


Figura 53. Expresión de células Iba1⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^{ab}p<0,01, ^{aaa}p<0,001 efecto general del LPS; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. VH-VH; ###p<0,001 vs. VH-CIL; \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 17. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de sepsis

Células Iba1 ⁺		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	LPS	F(1,16)=26,15; p<0,001	F(1,16)=35,60; p<0,001	F(1,16)=8,64; p=0,010
	CIL	F(1,16)=4,74; p=0,045	F(1,16)=0,13; ns	F(1,16)=3,39; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=18,83; p=0,001	F(1,16)=0,71; ns	F(1,16)=7,87; p=0,013
CENTRAL	LPS	F(1,16)=18,79; p=0,001	F(1,16)=8,48; p=0,010	F(1,16)=55,20; p<0,001
	CIL	F(1,16)=1,67; ns	F(1,16)=0,19; ns	F(1,16)=0,01; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=3,39; ns	F(1,16)=3,01; ns	F(1,16)=14,81; p=0,001
INFERIOR	LPS	F(1,16)=40,25; p<0,001	F(1,16)=11,16; p=0,004	F(1,16)=6,05; p=0,026
	CIL	F(1,16)=12,74; p=0,003	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=0,00; ns
	LPS x CIL	F(1,16)=19,72; p<0,001	F(1,16)=5,60; p=0,031	F(1,16)=14,40; p=0,002

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad; p, p-valor; ns, no significativo. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey (resultados mostrados en Fig.53).

Se analizó además la presencia de las células Iba1⁺ en las diferentes capas de la retina (**Fig.54A**) encontrando que el incremento en el número de células microgliales inducido por LPS solo era estadísticamente significativo en las capas más internas de la retina: CCG y CPI (LPS-VH vs. VH-VH, $p < 0,001$ en ambas capas), en las que la administración de CIL fue capaz de prevenir y/o revertir dicho aumento (CCG: LPS-CIL vs. LPS-VH, $p < 0,001$; CPI: LPS-CIL vs. LPS-VH, $p = 0,022$). Hay que destacar además la presencia de células Iba1⁺ en la CNE-SE únicamente en el grupo tratado con LPS (LPS-VH vs. VH-VH, $p = 0,010$), ya que el co-tratamiento con CIL eliminó la presencia de este tipo celular en esta capa (LPS-CIL vs. VH-VH, ns). (Para más información sobre el análisis estadístico consultar: **Tabla 18**).

En relación con la activación microglial se llevó a cabo un análisis por morfotipos (**Fig.54B; Tabla 18**) encontrando, en este caso, que la administración de LPS reducía la presencia del morfotipo RD (LPS-VH vs. VH-VH, $p = 0,002$; LPS-VH vs. VH-CIL, $p = 0,007$) a expensas de incrementar la presencia del morfotipo migratorio HZ (LPS-VH vs. VH-VH, $p = 0,010$). Este efecto sobre el morfotipo RD fue bloqueado por la administración de CIL (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p = 0,015$), y, además, en el grupo doble tratado no se observaron cambios en la expresión del morfotipo HZ (LPS-CIL vs. VH-VH, ns).

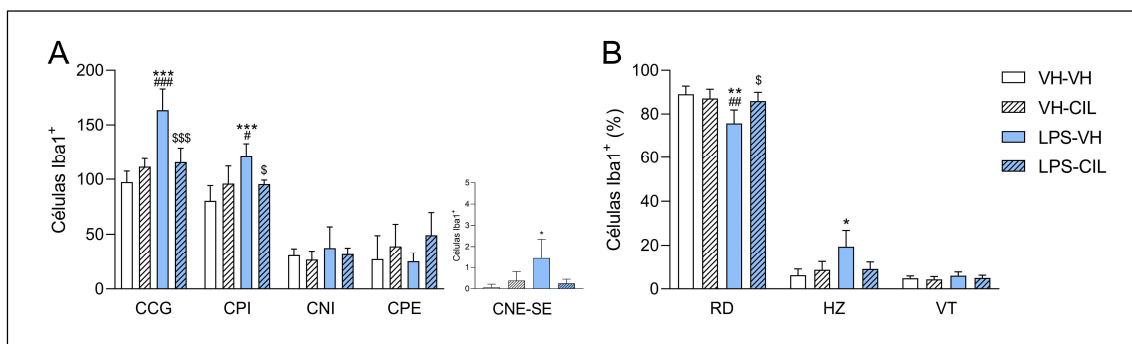


Figura 54. Expresión de células Iba1⁺ en las capas de la retina (A) y evaluación de su morfología (B) en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas (A) y del porcentaje de cada morfotipo (B): RD, radial; HZ, horizontal; VT, vertical. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey/Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. VH-VH; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. VH-CIL; \$ $p < 0,05$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 18. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas capas de la retina y del porcentaje de la evaluación de los morfotipos en un modelo animal de sepsis

Iba1 ⁺		CCG	CPI	CNI	CPE	CNE-SE
CAPAS	LPS	F(1,16)=34,02; p<0,001	F(1,16)=13,64; p=0,002		F(1,16)=0,60; ns	X ² (3)=10,09; p=0,018
	CIL	F(1,16)=5,01; p=0,040	F(1,16)=0,77; ns	X ² (3)=1,05; ns	F(1,16)=3,32; ns	
	LPS x CIL	F(1,16)=26,30; p<0,001	F(1,16)=14,02; p=0,002		F(1,16)=0,17; ns	
		RD	HZ	VT		
MORFOTIPOS	LPS	F(1,16)=12,11; p=0,003	F(1,16)=8,05; p=0,012	F(1,16)=0,46; ns		
	CIL	F(1,16)=4,18; ns	F(1,16)=0,76; ns	F(1,16)=0,10; ns		
	LPS x CIL	F(1,16)=8,39; p=0,011	F(1,16)=5,64; p=0,030	F(1,16)=0,32; ns		

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis no paramétricos: ANOVA de 2 vías: F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: X², estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.54).

En relación con el estudio de las células de microglía cabe destacar que la administración de LPS incrementó tanto su número como su grado de activación al favorecer la presencia del morfotipo migratorio HZ, efectos que pueden observarse en las microfotografías obtenidas en este estudio (**Fig.52**). Obsérvese además que la administración de CIL fue capaz de modular dicho efecto al prevenir la activación microglial, y reducir en algunas áreas de la retina el incremento de células microgliales inducido por la administración de LPS.

Resumen:

La administración de LPS provocó un aumento generalizado en el número de células microgliales en todas las áreas de la retina, incrementando además su presencia en las capas más internas de la misma (CCG y CPI) y en la CNE-SE. La administración de LPS provocó también la activación microglial incrementando la presencia del morfotipo migratorio HZ a expensas del morfotipo RD. CIL *per se* no afectó apenas a la población microglial de la retina, pero fue capaz de prevenir y/o revertir tanto el incremento en el número de células microgliales, principalmente en las áreas nasales y en las capas más internas de la retina, como la activación microglial, inducidas por LPS.

1.4. ESTUDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA DE LA RETINA

Con el fin de evaluar la posible implicación del inflamasoma mediado por TLR4 y NLRP3 en la retina se llevaron a cabo estudios de colocalización por inmunofluorescencia en las diferentes poblaciones celulares, empleando para ello los grupos experimentales en los que se observó un mayor daño, tanto de pérdida de CGR como de activación glial: LPS-VH y LPS-CIL.

En el caso del receptor NLRP3, se observó una coexpresión con las CGRs (células Brn3a⁺, **Fig.55**) pero no con las células macrogliales y/o microgliales, marcadas con GFAP e Iba1, respectivamente. En las microfotografías podemos observar en rojo las CGRs, alineadas perfectamente en la CCG, y en verde observamos el marcaje del receptor NLRP3; en la imagen fusionada, allí donde se coexpresan ambos marcadores (Brn3a⁺/NLRP3⁺) obtenemos el marcaje de color amarillo. Estas microfotografías demuestran que sólo las CGRs expresan el receptor del inflamasoma NLRP3 en determinadas condiciones de activación. Cabe destacar además que se observa un ligero marcaje de NLRP3 en la CNI, lo que sugiere la presencia de este receptor en otras poblaciones celulares de la retina, como células bipolares, o interneuronas amacrinas u horizontales.

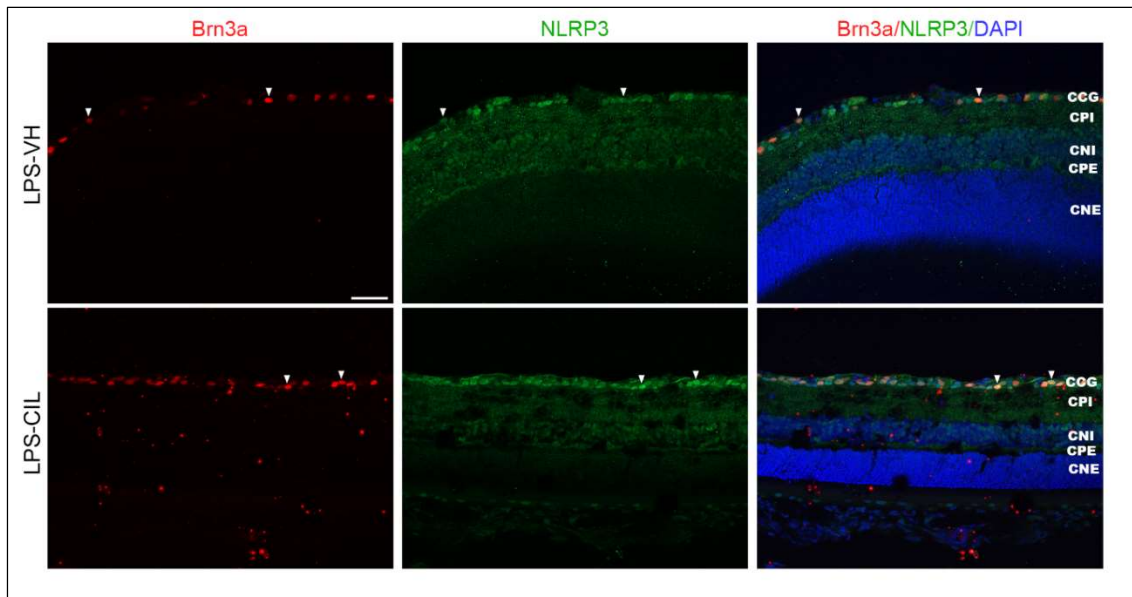


Figura 55. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 en las células Brn3a⁺ en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En la lámina se muestran microfotografías representativas con marcaje individual de cada marcador Brn3a (rojo) y NLRP3 (verde), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: LPS-VH y LPS-CIL. Con flechas se indican algunas células inmunopositivas para los dos marcadores (Brn3a⁺/NLRP3⁺). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. 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 μ m.

En cuanto al estudio del receptor TLR4, en las microfotografías obtenidas se observó una colocalización de este receptor con las células macrogliales (GFAP⁺, **Fig.56**); y no con los otros marcadores, Brn3a⁺ e Iba1⁺, de CGRs y microglía, respectivamente. En las imágenes de inmunofluorescencia los astrocitos y células de Müller (GFAP⁺) aparecen en color verde, mientras que el receptor TLR4 aparece en color rojo. Tras la fusión de las microfotografías, las zonas marcadas con ambos anticuerpos presentan un color amarillo. En la imagen se puede observar la colocalización del marcador de TLR4 con las células GFAP⁺ principalmente en la CFNO-CCG, sugiriendo que la expresión del receptor TLR4 se limita fundamentalmente a los astrocitos presentes a ese nivel de la retina, o, quizás, en las prolongaciones vítreas de las células de Müller.

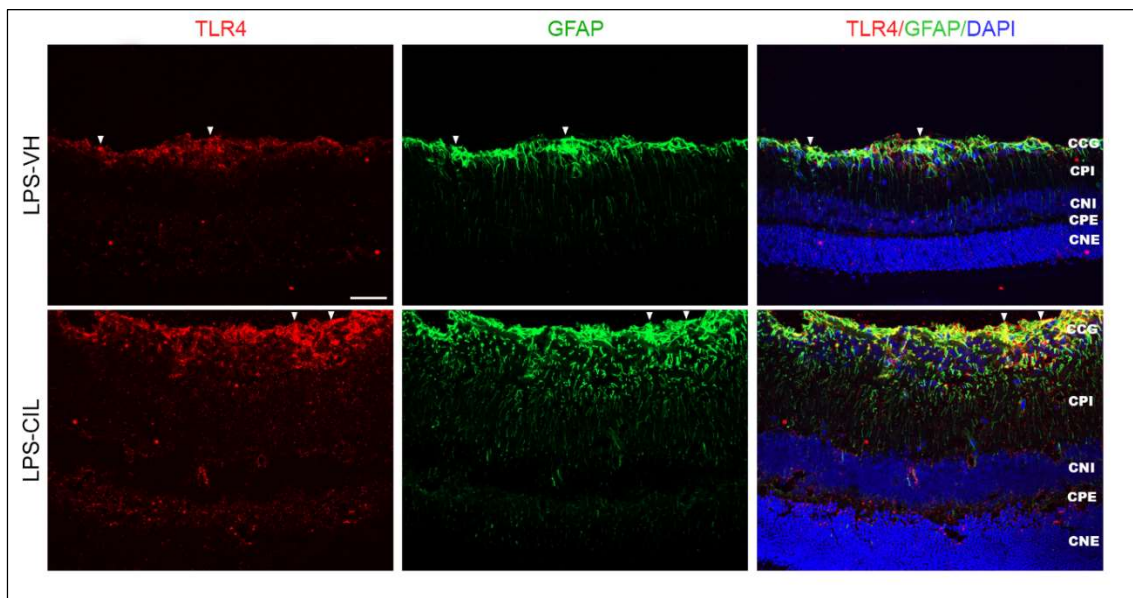


Figura 56. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de TLR4 en las células GFAP⁺ en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En la lámina se muestran microfotografías representativas con marcaje individual de cada marcador TLR4 (rojo) y GFAP (verde), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: LPS-VH y LPS-CIL. Con flechas se indican aquellos puntos dónde colocalizan ambos marcadores (TLR4⁺/GFAP⁺). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. TLR4, receptor de 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 μ m.

Por tanto, en la retina de ratas *Wistar* administradas con LPS se observa un marcaje del receptor NLRP3 en las CGRs, mientras que la expresión del receptor TLR4 parece limitarse a los astrocitos, y/o a las prolongaciones vítreas de las células de Müller, presentes en la CFNO-CCG. En estos estudios de colocalización no se han observado diferencias en la expresión de estos marcadores tras la administración de CIL (**Tabla 19**).

Tabla 19. Resultados de la colocalización de los receptores NLRP3 y TLR4 con diferentes poblaciones celulares en las retinas de un modelo animal de sepsis

Marcadores	Brn3a	GFAP	Iba1
NLRP3	SI	NO	NO
TLR4	NO	SI	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 sepsis en ratas Wistar inducido por la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS)

Resumen:

Estos estudios de colocalización demuestran la presencia del receptor NLRP3 en las células Brn3a⁺, CGRs; mientras que el receptor TLR4 se expresa en las células GFAP⁺ presentes principalmente en la CCG, sugiriendo la expresión del receptor en astrocitos en las prolongaciones vítreas de las células de Müller.

1.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS NÚCLEOS DE RELEVO DE LA VÍA VÍSUAL

1.5.1. Análisis de las células neuronales (células NeuN⁺)

El análisis de la expresión del marcador NeuN en las neuronas del CS (**Fig.57**), reveló un efecto general de la administración del LPS [$F(1,14)=10,28$; $p=0,006$], en ausencia de efectos de la administración de CIL [$F(1,14)=0,04$; ns]; junto con la observación de un efecto significativo de la interacción entre factores [$F(1,14)=12,29$; $p=0,003$]. Sin embargo, las comparaciones a posteriori sólo mostraron una reducción significativa en la expresión del marcador NeuN en el CS en los animales LPS-VH frente al grupo de control (LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,002$). CIL no produjo cambios en la expresión de NeuN en el CS, aunque sí mostró una tendencia (no significativa) a prevenir y/o revertir los cambios producidos por LPS en el grupo doble tratado (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p=0,063$), grupo que no presentó diferencias respecto al grupo control (LPS-CIL vs. VH-VH, ns).

En el NGLd (**Fig.57**), el análisis estadístico reveló un efecto general del LPS [$F(1,13)=23,59$; $p<0,001$] y de la CIL [$F(1,13)=6,41$; $p=0,025$], así como una interacción significativa entre factores [$F(1,13)=7,46$; $p=0,017$]. En este caso, las comparaciones a posteriori mostraron una menor expresión de NeuN en el grupo tratado con LPS (LPS-VH vs. VH-VH, $p<0,001$), mientras que CIL, que *per se* no produjo ningún efecto, sí fue capaz de revertir y/o prevenir la reducción en la expresión en el marcador neuronal (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p=0,009$).

En el tercer núcleo de relevo analizado, V1 (**Fig.57**) el análisis de la expresión de NeuN reveló un efecto general del LPS [$F(1,16)=98,65$; $p<0,001$], un efecto general de la CIL [$F(1,16)=11,57$; $p=0,004$], así como una interacción significativa entre los factores [$F(1,16)=29,41$; $p<0,001$]. La administración del LPS provocó una reducción muy significativa del marcador neuronal NeuN frente al grupo control (LPS-VH vs. VH-VH, $p<0,001$), mientras que la administración de CIL atenuó y/o revirtió dicho efecto (LPS-CIL vs. LPS-VH; $p<0,001$), aunque se siguió observando una menor expresión de NeuN en este grupo doble tratado frente al control (LPS-CIL vs. VH-VH; $p=0,009$).

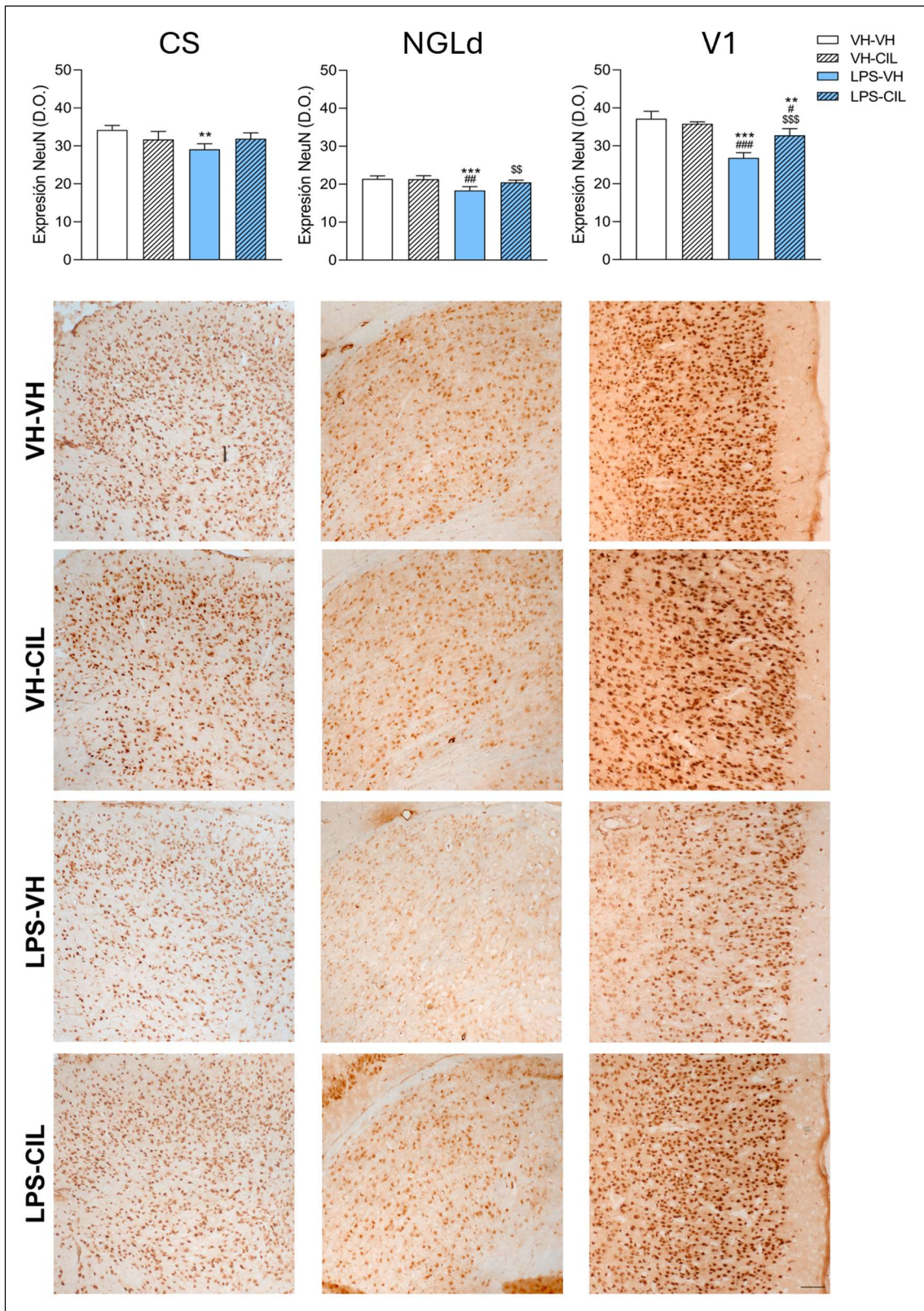


Figura 57. Expresión de células NeuN⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.) obtenida en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. VH-VH; # $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. VH-CIL; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. LPS-VH. (n=4-5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En V1, al analizar los efectos de los tratamientos sobre el marcador NeuN por capas (Fig.58), se observaron efectos estadísticamente significativo tanto en las más externas [LPS: $F(1,16)=38,42$; $p<0,001$; CIL: $F(1,16)=7,60$; $p=0,014$; LPS x CIL: $F(1,16)=5,09$; $p=0,038$] como en las más internas [$\chi^2(3)=16,82$; $p<0,001$]. Los análisis a posteriori revelaron que la administración de LPS inducía una disminución del marcaje de NeuN tanto en la V1 externa (capas II-III) como en la V1 interna (capas IV-VI) (LPS-VH vs. VH-VH y VH-CIL, $p<0,001$ en ambos casos), en tanto que la administración de CIL fue capaz de revertir tal efecto en el caso de la corteza externa (LPS-CIL vs. LPS-VH; $p=0,013$), y atenuarlo en la corteza interna (LPS-CIL vs. VH-VH y VH-CIL, ns).

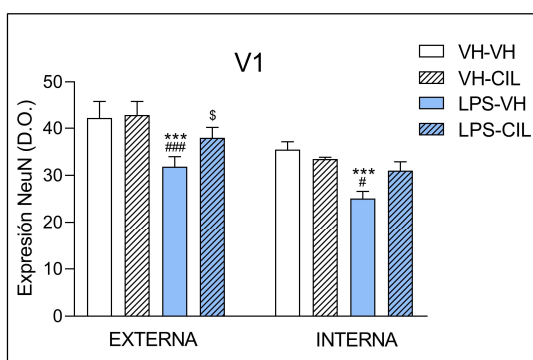


Figura 58. Expresión de células NeuN⁺ en la V1 externa e interna en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey/Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: *** $p<0,001$ vs. VH-VH; # $p<0,05$, ### $p<0,001$ vs. VH-CIL; \$ $p<0,05$ vs. LPS-VH. (n=5 animales por grupo experimental)

Resumen:

La administración sistémica de LPS produjo una notable reducción del marcador neuronal NeuN en los núcleos de relevo estudiados: CS, NGLd y V1. La administración de CIL, sin efectos *per se*, fue capaz de atenuar y/o revertir dicha reducción en el NGLd y en V1, fundamentalmente en las capas más externas de V1.

1.5.2. Análisis de las células microgliales (células GFAP⁺)

En cuanto al estudio de la expresión de GFAP, empleado como marcador de astrocitos (Fig.59), en el CS, se encontró un efecto general del LPS [$F(1,16)=107,73$; $p<0,001$], en ausencia de efectos de la administración de CIL [$F(1,16)=1,49$; ns]; pero en presencia de una interacción significativa entre factores [$F(1,16)=43,51$; $p<0,001$]. Las comparaciones a posteriori mostraron un incremento altamente significativo en el grupo tratado con LPS frente a los controles (LPS-VH vs. VH-VH y VH-CIL; $p<0,001$); en el grupo de CIL se observó un ligero, pero estadísticamente significativo, incremento en la expresión del marcador (VH-CIL vs. VH-VH, $p=0,008$); y la administración de CIL fue capaz de atenuar el incremento previamente descrito tras la administración de LPS (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p<0,001$), aunque los niveles de expresión de GFAP fueran aún algo elevados en este grupo frente al control (LPS-CIL vs. VH-VH, $p<0,001$).

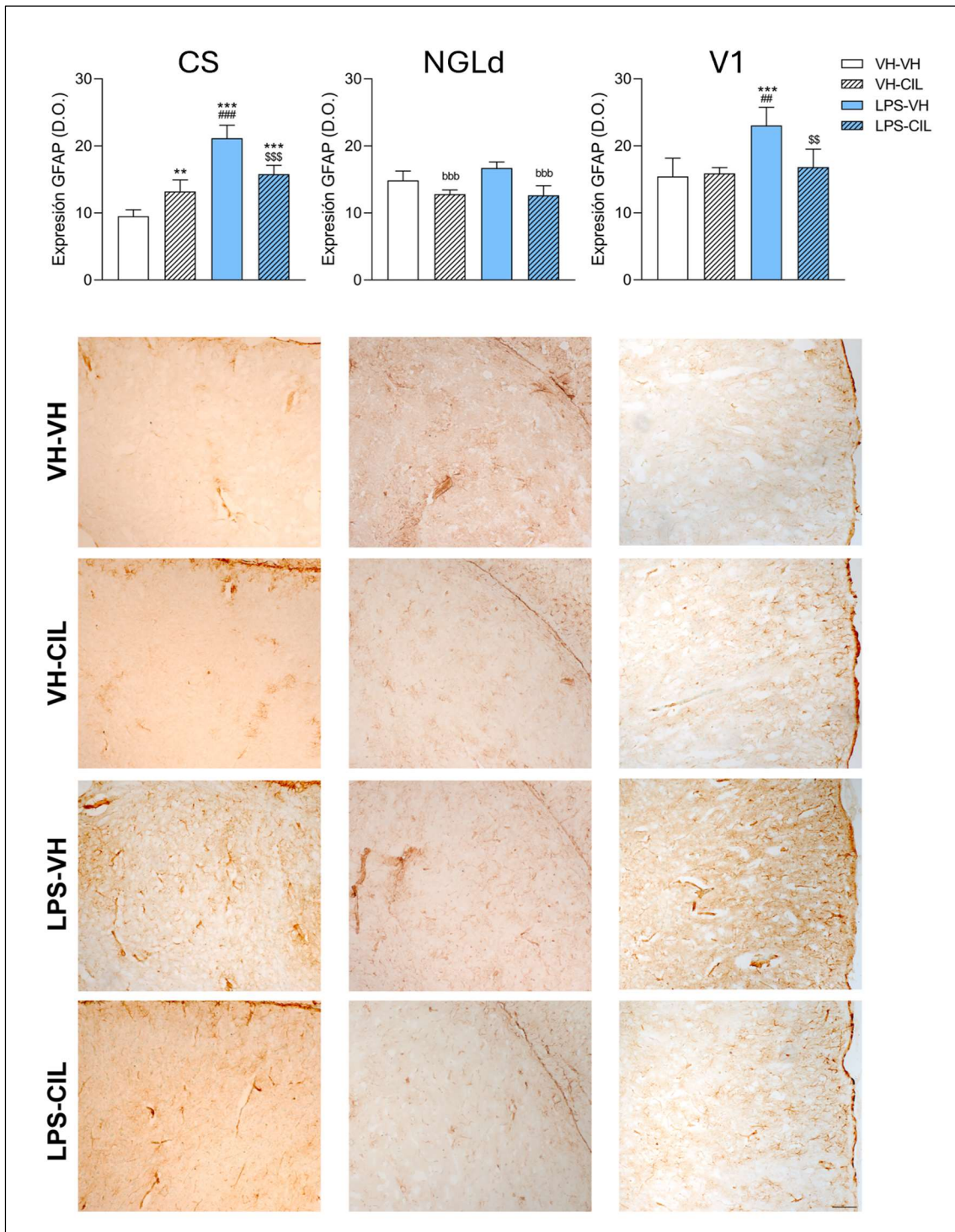


Figura 59. Expresión de células GFAP⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media ± la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.) obtenida en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^{bbb}p<0,001 efecto general de CIL; ^{**}p<0,01, ^{***}p<0,001 vs. VH-VH; ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 vs. VH-CIL; ^{\$}p<0,01, ^{\$\$\$}p<0,001 vs. LPS-VH. (n=4-5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 µm.

En el NGLd no se observaron efectos estadísticamente significativos de la administración de LPS [$F(1,15)=2,47$; ns], pero sí de la administración de CIL [$F(1,15)=32,65$; $p<0,001$], en ausencia de una interacción significativa entre factores [$F(1,15)=3,52$; ns]. En este caso la administración de CIL pareció reducir ligeramente la expresión de GFAP en este núcleo de relevo.

En V1 se observó un efecto estadísticamente significativo del tratamiento con LPS [$F(1,16)=16,05$; $p=0,001$], de la administración de CIL [$F(1,16)=7,24$; $p=0,016$] y de la interacción entre los factores [$F(1,16)=9,66$; $p=0,007$]. Las comparaciones a posteriori mostraron un incremento estadísticamente significativo en el marcaje de GFAP en los animales LPS-VH (LPS-VH vs. VH-VH; $p<0,001$), mientras que CIL, que *per se* no indujo ningún efecto, sí fue capaz de bloquear dicho aumento (LPS-CIL vs. LPS-VH; $p=0,004$).

Resumen:

La administración intraperitoneal de LPS indujo un incremento en la expresión de GFAP, esto es, una activación astrocitaria, en el CS y en la V1, en ausencia de cambios en el NGLd. La administración de CIL, en solitario, incrementó la activación macroglial en el CS, pero la redujo en el NGLd. La combinación de CIL y LPS fue capaz de prevenir la activación macroglial asociada al LPS en CS y V1.

1.5.3. Análisis de las células microgliales (células Iba1⁺)

En análisis del número de células Iba1⁺, es decir, de células microgliales (**Fig.60**) sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en el CS, y no en NGLd ni en V1. En el CS se observó un efecto general del LPS [$F(1,12)=5,09$; $p=0,043$], que redujo ligeramente el número de células; en ausencia de efectos estadísticamente significativos ni de CIL [$F(1,12)=0,10$; ns] ni de la interacción entre factores [$F(1,12)=3,14$; ns]. Las células Iba1⁺ no presentaron diferencias ni en el NGLd [LPS: $F(1,15)=1,30$; ns; CIL: $F(1,15)=1,11$; ns; LPS x CIL: $F(1,15)=3,69$; ns] ni en la V1 [LPS: $F(1,14)=3,11$; ns; CIL: $F(1,14)=0,43$; ns; LPS x CIL: $F(1,14)=3,63$; ns] en cuanto al número de células.

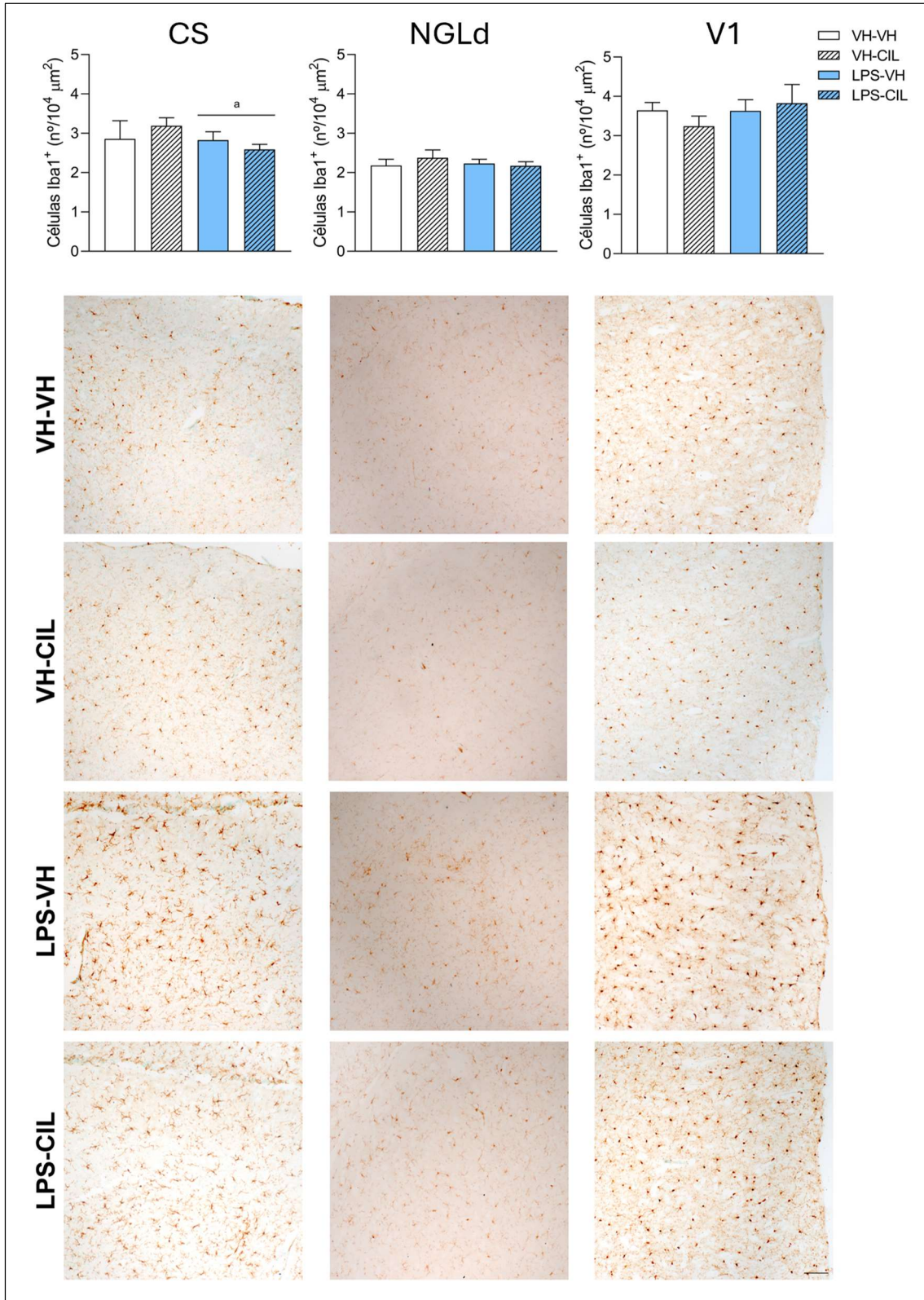


Figura 60. Expresión de células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), del número de células obtenido en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^ap<0,05 efecto general del LPS (n=4-5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En cuanto a la activación microglial, el análisis de los morfotipos (**Fig.61**) agrupados mostró, en el CS, un efecto estadísticamente significativo de LPS [$F(1,12)=14,30$; $p=0,003$] y de la CIL [$F(1,12)=13,88$; $p=0,003$], en ausencia de una interacción entre factores [$F(1,12)=2,08$; ns]. La administración de LPS redujo el porcentaje de morfotipos residentes en CS, favoreciendo la presencia de morfotipos reactivos, efecto especialmente evidente al estudiar el morfotipo II (LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,029$). En CS la administración de CIL mostró el efecto contrario, aumentando la presencia de morfotipos residentes frente a reactivos (ver **Tabla 20** para consultar los análisis estadísticos).

En el NGLd el perfil observado fue similar (**Fig.61**), con un efecto estadísticamente significativo de la administración de LPS [$F(1,15)=4,65$; $p=0,048$], en este caso en ausencia de efectos de la CIL [$F(1,15)=3,26$; ns] o de la interacción entre factores [$F(1,15)=1,38$; ns]. La administración de LPS redujo la presencia de morfotipos residentes, incrementando la presencia de morfotipos reactivos, fundamentalmente del morfotipos IV (consultar: **Tabla 20**), con una ligera tendencia (no significativa) en el morfotipo V.

En V1 el análisis de morfotipos permitió describir un efecto estadísticamente significativo del LPS [$F(1,14)=35,00$; $p<0,001$], de la CIL [$F(1,14)=13,86$; $p=0,002$] así como de la interacción entre factores [$F(1,14)=8,07$; $p=0,013$]. La administración de LPS redujo notablemente la presencia del morfotipo residente frente a los morfotipos reactivos que se vieron muy incrementados frente al grupo de control (LPS-VH vs. VH-VH y VH-CIL, $p<0,001$). En concreto, la administración de LPS pareció reducir la presencia de microglía con morfotipo I (LPS-VH vs. VH-VH y VH-CIL, $p<0,001$) e incrementar la microglía de morfotipo III (LPS-VH vs. VH-VH, $p=0,005$; LPS-VH vs. VH-CIL, $p=0,011$), de morfotipo IV, e incluso de morfotipo V (LPS-VH vs. VH-VH y VH-CIL, $p=0,009$) (consultar **Tabla 20**). Por el contrario, la administración de CIL, aún sin afectar *per se* a la activación microglial, permitió bloquear el paso de morfotipos residentes a reactivos en V1 (LPS-CIL vs. LPS-VH; $p=0,001$). Aunque los animales LPS-CIL experimentaron una disminución en la presencia de morfotipos I (LPS-CIL vs. VH-VH, $p=0,008$), el fármaco fue capaz de atenuarla (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p<0,001$), y fue capaz de prevenir y/o revertir el aumento en la presencia de morfotipos III (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p=0,031$) y V (LPS-CIL vs. LPS-VH, $p=0,004$) observada en el grupo LPS-VH.

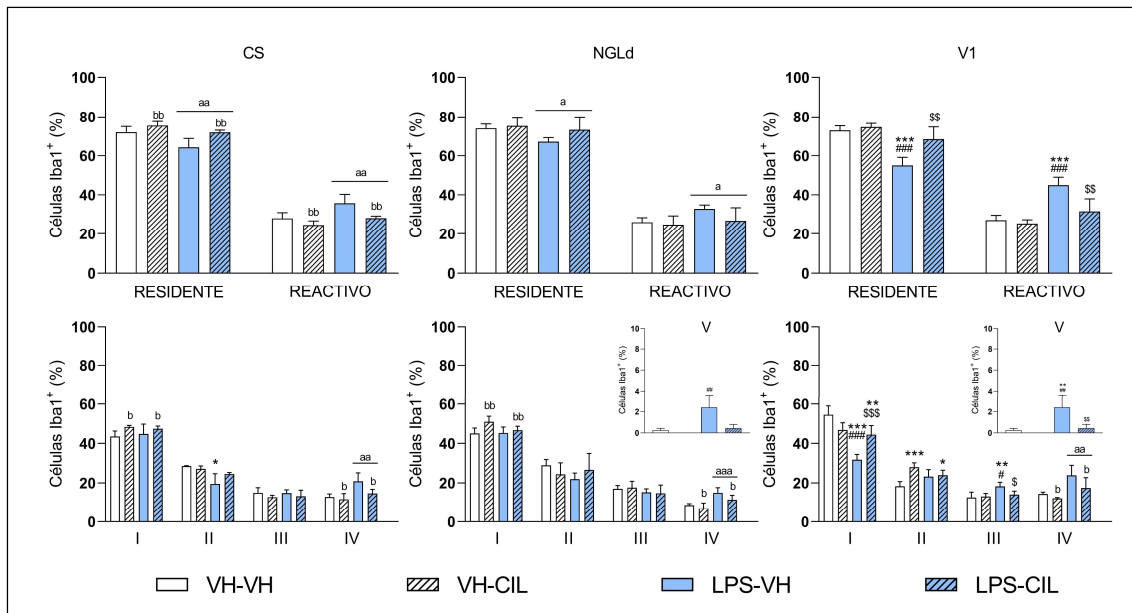


Figura 61. Morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis. Ratas *Wistar* macho recibieron una única dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 mg/kg, i.p.), o su vehículo (VH), e inmediatamente después, el fármaco cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), o su VH; los animales se sacrificaron a las 24 h para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: VH-VH, VH-CIL, LPS-VH y LPS-CIL. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar (D.E.), del porcentaje de los morfotipos residentes (I-II) o reactivos (III-V) en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey/Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: ^ap<0,05, ^{aa}p<0,01, ^{aaa}p<0,001 efecto general del LPS; ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 efecto general de la CIL; [#]p<0,05, ^{##}p<0,001 vs. VH-VH; [#]p<0,05, ^{###}p<0,001 vs. VH-CIL; ^{\$}p<0,05, ^{\$\$}p<0,01, ^{\$\$\$}p<0,001 vs. LPS-VH (n=4-5 animales por grupo experimental)

Tabla 20. Principales resultados estadísticos del análisis de los morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de sepsis

		MF I	MF II	MF III	MF IV	MF V
CS	LPS	F(1,12)=0,01; ns		F(1,12)=0,02; ns	F(1,12)=14,53; p=0,002	-
	CIL	F(1,12)=6,42; p=0,026	X ² (3)=10,68; p=0,014	F(1,12)=2,84; ns	F(1,12)=6,50; p=0,025	-
	LPS x CIL	F(1,12)=0,55; ns		F(1,12)=0,10; ns	F(1,12)=3,02; ns	-
NGLd	LPS	F(1,15)=2,67; ns	F(1,15)=0,83; ns	F(1,15)=2,83; ns	F(1,15)=25,83; p<0,001	X ² (3)=14,17; p=0,003
	CIL	F(1,15)=8,91; p=0,009	F(1,15)=0,00; ns	F(1,15)=0,00; ns	F(1,15)=6,24; p=0,025	
	LPS x CIL	F(1,15)=3,28; ns	F(1,15)=3,15; ns	F(1,15)=0,17; ns	F(1,15)=0,84; ns	
V1	LPS	F(1,14)=46,20; p<0,001	F(1,14)=0,11; ns	F(1,14)=11,62; p=0,004	F(1,14)=15,17; p=0,002	X ² (3)=16,47; p<0,001
	CIL	F(1,14)=1,79; ns	F(1,14)=15,17; p=0,002	F(1,14)=3,42; ns	F(1,14)=5,49; p=0,035	
	LPS x CIL	F(1,14)=30,74; p<0,001	F(1,14)=11,22; p=0,005	F(1,14)=5,61; p=0,033	F(1,14)=1,22; ns	

Tratamientos: LPS, lipopolisacárido; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétrico: Kruskal-Wallis: X², estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.61).

Resumen:

La administración de LPS apenas modificó la cantidad de células de microglía en los núcleos de relevo de la vía visual, induciendo únicamente un ligero decremento en el número de células Iba1⁺ en el CS. Sin embargo, la administración de LPS sí produjo una marcada activación microglial en los tres núcleos, reduciendo la presencia de morfotipos residentes e incrementando la presencia de morfotipos reactivos en CS, NGLd y V1, donde la administración de CIL bloqueó y/o revirtió dicha activación.

2. RESULTADOS: MODELO ANIMAL DE MALARIA

2.1. PARASITEMIA Y VALORRACIONES BIOQUÍMICAS

La evaluación de la parasitemia se realizó únicamente en los grupos tratados con el parásito (**Fig.62A**): en el primer día de valoración (d2) no se observaron diferencias entre los grupos ($U=40,00$; ns), que presentaron un valor próximo al 0%; en el momento de la siguiente medida (d4) ya se observó un ligero incremento en la parasitemia en ambos grupos (grupo Malaria: $3,64 \pm 2,07$ % y grupo Malaria-CIL: $1,80 \pm 0,47$ %) siendo significativamente menor el grado de parasitemia en el grupo Malaria-CIL ($U=16,50$; $p=0,034$); al final del estudio (d6), los niveles de parasitemia habían incrementado considerablemente en ambos grupos, aunque los niveles encontrados fueron similares (Malaria: $8,92 \pm 2,81$ %; Malaria-CIL: $8,69 \pm 2,07$ %; $U=39,50$; ns).

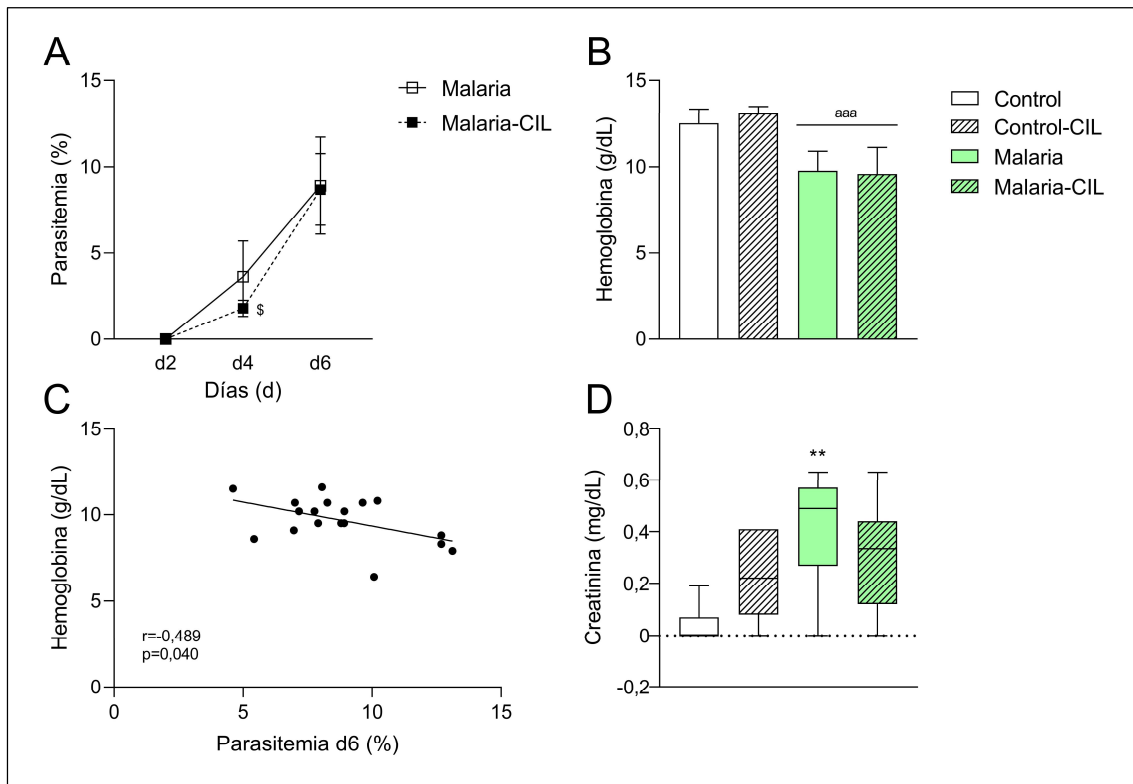


Figura 62. Parámetros fisiopatológicos. Ratones C57BL/6J hembra fueron inoculados con *Plasmodium berghei* ANKA (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.), e, inmediata después, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), a diario, hasta el día 5 postinfección (d5). El grupo de control del fármaco recibió el mismo número de administraciones de CIL a la misma dosis. Los animales se sacrificaron el d6. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. **(A) Evaluación del porcentaje de parasitemia.** Se muestra la media \pm la desviación estándar (D.E.) del porcentaje de GRI encontrado en un frotis sanguíneo, en los días 2, 4 y 6 postinfección. Análisis no paramétrico: Mann Whitney: $^{\$}p < 0,05$ vs Malaria ($n=8-10$ por grupo experimental). **(B) Concentración de hemoglobina (g/dL).** El histograma muestra la media \pm desviación estándar (D.E.). ANOVA de 2 vías: $^{aaa}p < 0,001$ efecto general de la Malaria ($n=5-10$ por grupo experimental). **(C) Correlación entre el grado de parasitemia d6 y los niveles de hemoglobina en sangre.** Se muestra la correlación lineal entre los dos parámetros: coeficiente de Pearson (r) y p -valor. **(D) Concentración de creatinina en suero (mg/dL).** El diagrama muestra las medianas \pm la desviación estándar (D.E.). Análisis no paramétrico: Kruskal-Wallis, *post-hoc* con la corrección de Bonferroni: $^{**}p < 0,01$ vs. Control ($n=5-10$ por grupo experimental).

En el análisis de la concentración de hemoglobina en sangre (**Fig.62B**), encontramos un efecto estadísticamente significativo del factor Malaria [$F(1,25)=48,69$; $p<0,001$] en ausencia de efectos del fármaco [$F(1,25)=0,19$; ns] o de la interacción entre factores [$F(1,25)=0,76$; ns]. Los grupos inoculados con el parásito mostraron niveles menores de hemoglobina en sangre; además, al analizar la correlación entre los niveles de hemoglobina en sangre y la parasitemia al final del estudio, d6 (**Fig.62C**), encontramos una relación inversamente proporcional entre ambas variables (Pearson: $r = -0,489$; $p=0,040$): a medida que aumenta el grado de parasitemia se reduce la concentración de hemoglobina en sangre, y, por tanto, la severidad de la patología.

Se analizaron además los niveles de creatinina sérica con el fin de evaluar el posible daño renal (**Fig.62D**). EL análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los diferentes grupos [$X^2(3)=10,47$; $p=0,015$], mostrando los animales del grupo de Malaria unos niveles de creatinina sérica significativamente mayor que los animales Control (Malaria vs. Control, $p=0,008$), en ausencia de efectos del tratamiento con CIL.

Resumen:

La inoculación de *Plasmodium berghei* en ratones produjo un incremento gradual de los niveles de parasitemia, directamente proporcionales a la reducción en los niveles de hemoglobina en sangre; la inoculación de este parásito se relaciona además con un fracaso renal ya que se encontraron elevados los niveles de creatinina sérica. La administración de CIL, que *per se* no presentó ningún efecto, moduló el incremento en los niveles de parasitemia, y previno del daño renal al atenuar el aumento en los niveles de creatinina sérica.

2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA

2.2.1. Análisis de las células ganglionares de la retina (células Brn3a⁺)

El análisis del número total de CGRs-Brn3a⁺ (**Fig.63**) reveló un efecto general de la inoculación del parásito [F(1,16)=36,43; p<0,001], que redujo notablemente la expresión del marcador; así como de la administración del fármaco [F(1,16)=5,70; p=0,030], que indujo un ligero aumento en el mismo; no se observaron efectos de la interacción entre factores [F(1,16)=3,85; ns].

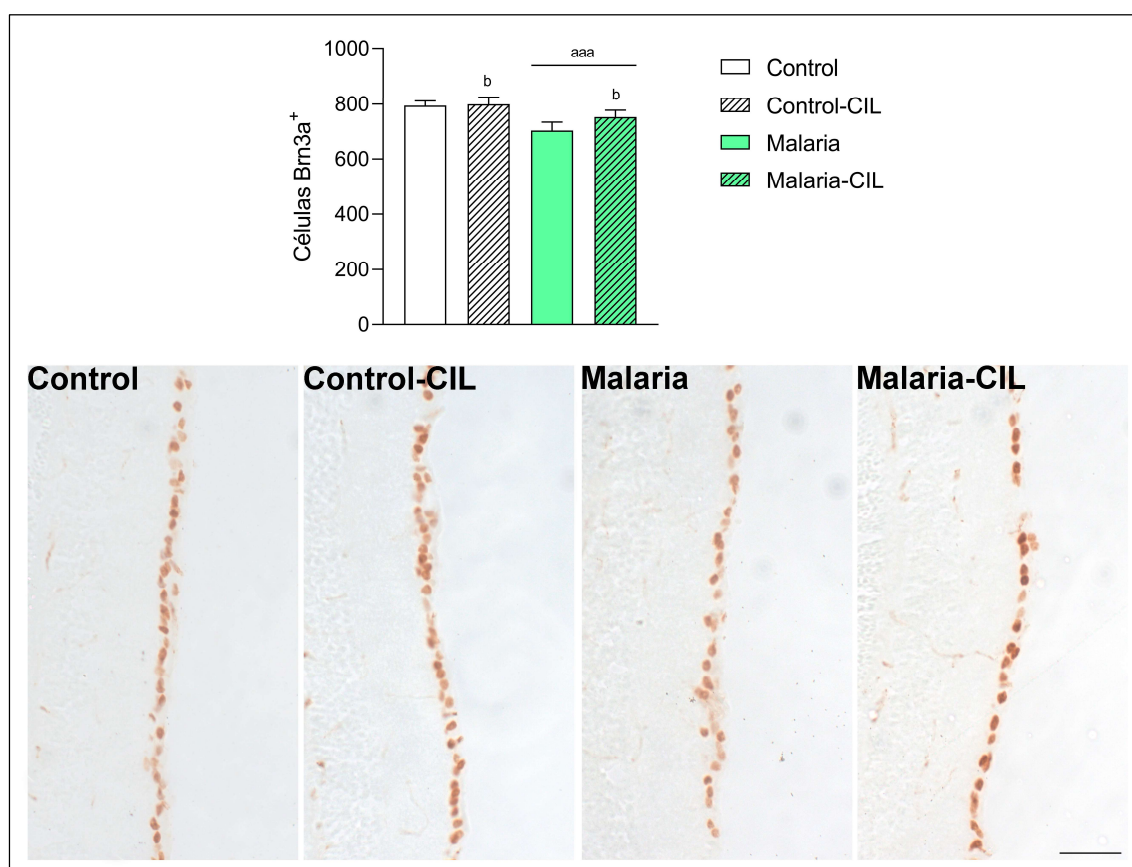


Figura 63. Expresión de células Brn3a⁺ en la retina completa en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media ± la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. ANOVA de 2 vías: ^{aaa}p<0,001, efecto general de la malaria; ^bp<0,05, efecto general de la CIL. (n=5 por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (20x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μm.

En el análisis por áreas (**Fig.64**) se observó una notable reducción de la expresión del marcador Brn3a⁺ en el área Central-Inferior (Malaria vs. Control, p=0,006), junto con un efecto general de la inoculación del parásito en las áreas Nasal-Superior, Nasal-Central, Temporal-Superior y Temporal-Inferior (consultar **Tabla 21** para los análisis estadísticos): en todas ellas la inoculación del parásito de la Malaria redujo el número de células Brn3a⁺.

La administración de CIL, *per se*, no presentó ningún efecto; pero sí que previno y/o revirtió la reducción observada en el área Central-Inferior (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,020$), además, la combinación de tratamientos incrementó el número de células Brn3a⁺ en el área Central-Superior frente a los animales del grupo Malaria (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,042$).

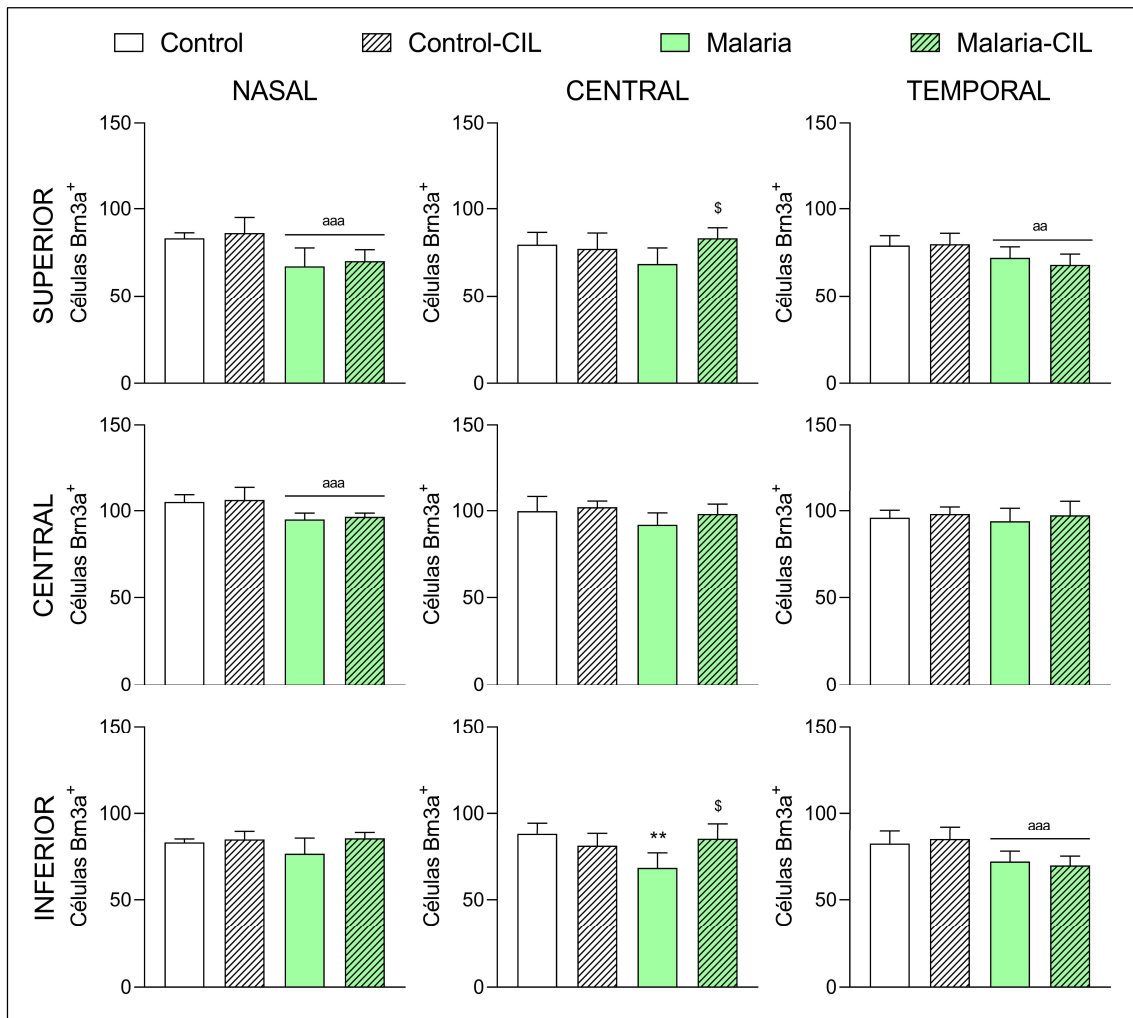


Figura 64. Expresión de células Brn3a⁺ en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.). ANOVA de 2 vías, test de Tukey: ^{aa} $p<0,01$, ^{aaa} $p<0,001$, efecto general de la malaria; ^{**} $p<0,01$ vs. Control; [§] $p<0,05$ vs. Malaria. (n=5 por grupo experimental).

Tabla 21. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Brn3a⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

Células Brn3a ⁺		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	MAL	F(1,16)=20,68; p<0,001	F(1,16)=0,50; ns	F(1,16)=12,28; p=0,003
	CIL	F(1,16)=0,85; ns	F(1,16)=3,00; ns	F(1,16)=0,36; ns
	MAL x CIL	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=5,96; p=0,027	F(1,16)=0,72; ns
CENTRAL	MAL	F(1,16)=20,82; p<0,001	F(1,16)=4,15; p=0,059	F(1,16)=0,27; ns
	CIL	F(1,16)=0,54; ns	F(1,16)=2,29; ns	F(1,16)=1,04; ns
	MAL x CIL	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=0,53; ns	F(1,16)=0,06; ns
INFERIOR	MAL		F(1,16)=4,94; p=0,041	F(1,16)=19,80; p<0,001
	CIL	X ² (3)=5,07; ns	F(1,16)=1,98; ns	F(1,16)=0,01; ns
	MAL x CIL		F(1,16)=10,77; p=0,005	F(1,16)=0,77; ns

Tratamientos: MAL, malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: X², estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.64).

Resumen:

La inoculación del parásito indujo una reducción generalizada en el número de células Brn3a⁺ en la retina completa, siendo este efecto más marcado en el área Central-Inferior. La administración de CIL fue capaz de prevenir y/o revertir dicha reducción, en ausencia de otros efectos.

2.2.2. Análisis de las poblaciones macrogliales de la retina (células GFAP⁺)

El análisis de la expresión del marcador GFAP en la retina completa (**Fig.65**), reveló un efecto general de la inoculación del parásito [F(1,12)=19,37; p<0,001], en ausencia de efectos del tratamiento con CIL [F(1,12)=2,44; ns], pero en presencia de una interacción significativa entre factores [F(1,12)=8,46; p=0,013]. Los análisis a posteriori mostraron una mayor expresión de GFAP en los animales del grupo Malaria frente a los del grupo Control (p=0,001) y Control-CIL (p=0,006); y la administración de CIL fue capaz de prevenir y/o revertir este aumento (Malaria vs. Malaria-CIL, p=0,036). En las microfotografías representativas del marcaje por inmunohistoquímica de GFAP (**Fig.65**) se observa, en el grupo Control, que el marcaje de GFAP se limita, fundamentalmente, a la CCG; mientras que, en el grupo Malaria, se observa un mayor marcaje de GFAP a lo largo de las prolongaciones de las células de Müller, que se extiende a través de las distintas capas de la retina; sin embargo, este marcaje se reduce y atenúa notablemente en el grupo doble tratado: Malaria-CIL.

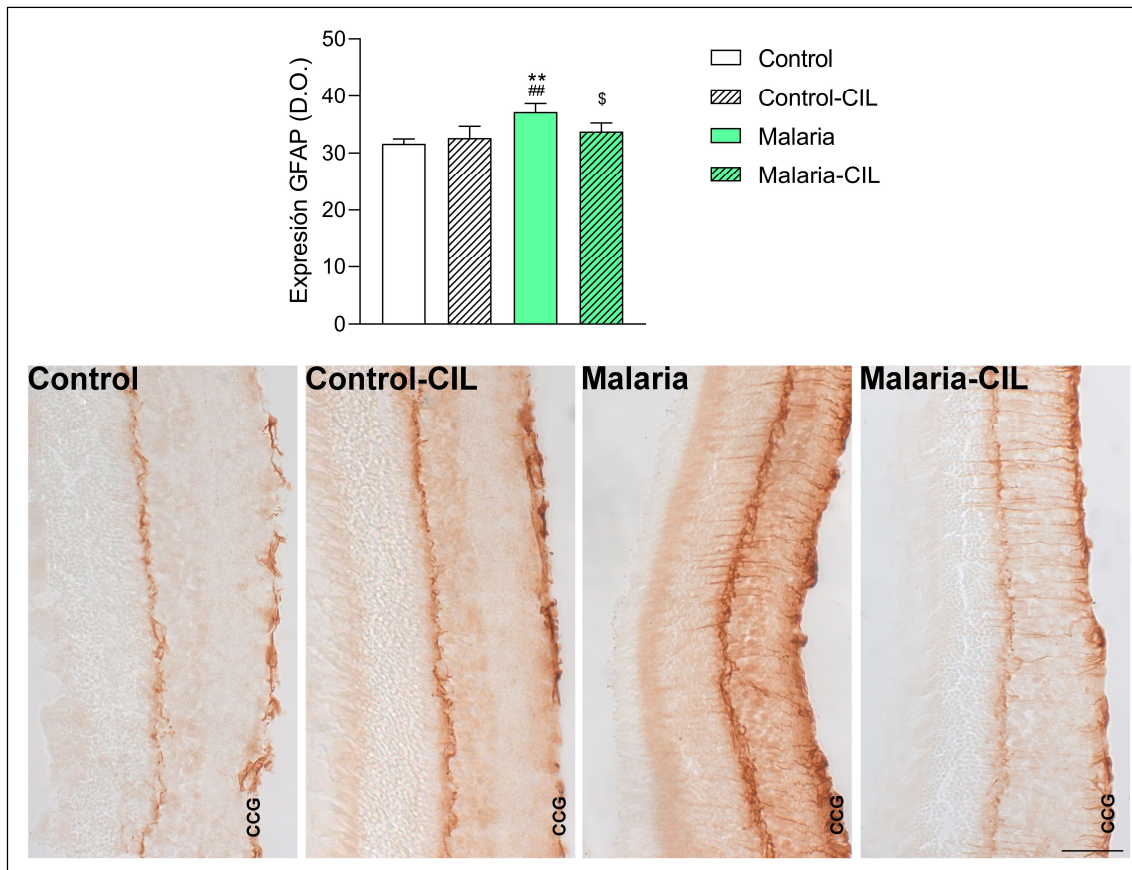


Figura 65. Expresión del marcador GFAP en la retina completa en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media \pm la desviación estándar (D.E.) de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de dos vías, Test de Tukey: ** $p < 0,01$ vs. Control; ## $p < 0,01$ vs. Control-CIL; \$ $p < 0,05$ vs. Malaria. (n=4 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (20x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el análisis detallado de las diferentes áreas retinianas (**Fig.66**) se observa que la inoculación del parásito incrementa la expresión de GFAP en la mayor parte de las áreas de estudio: este aumento resultó estadísticamente significativo en el área Central-Central (Malaria vs. Control, $p=0,010$) y en el área Temporal-Superior (Malaria vs. Control, $p=0,003$); y se encontró un efecto general de la malaria en el resto de las áreas, excepto en las áreas Nasal-Central y Nasal-Inferior (ver análisis estadísticos en la **Tabla 22**). La CIL, *per se*, solo provocó un efecto residual en el área Temporal-Superior donde se vio ligeramente incrementada la expresión de GFAP (Control-CIL vs. Control, $p < 0,05$), y un efecto más general en el área Central-Inferior donde se vio una disminución de este marcador macroglial tras la administración de CIL. En este caso, aunque la combinación de compuestos no alcanza a revertir el efecto observado, sí que lo atenúa parcialmente presentando, este grupo MAL-CIL, datos de activación de GFAP similares a los del grupo de Control.

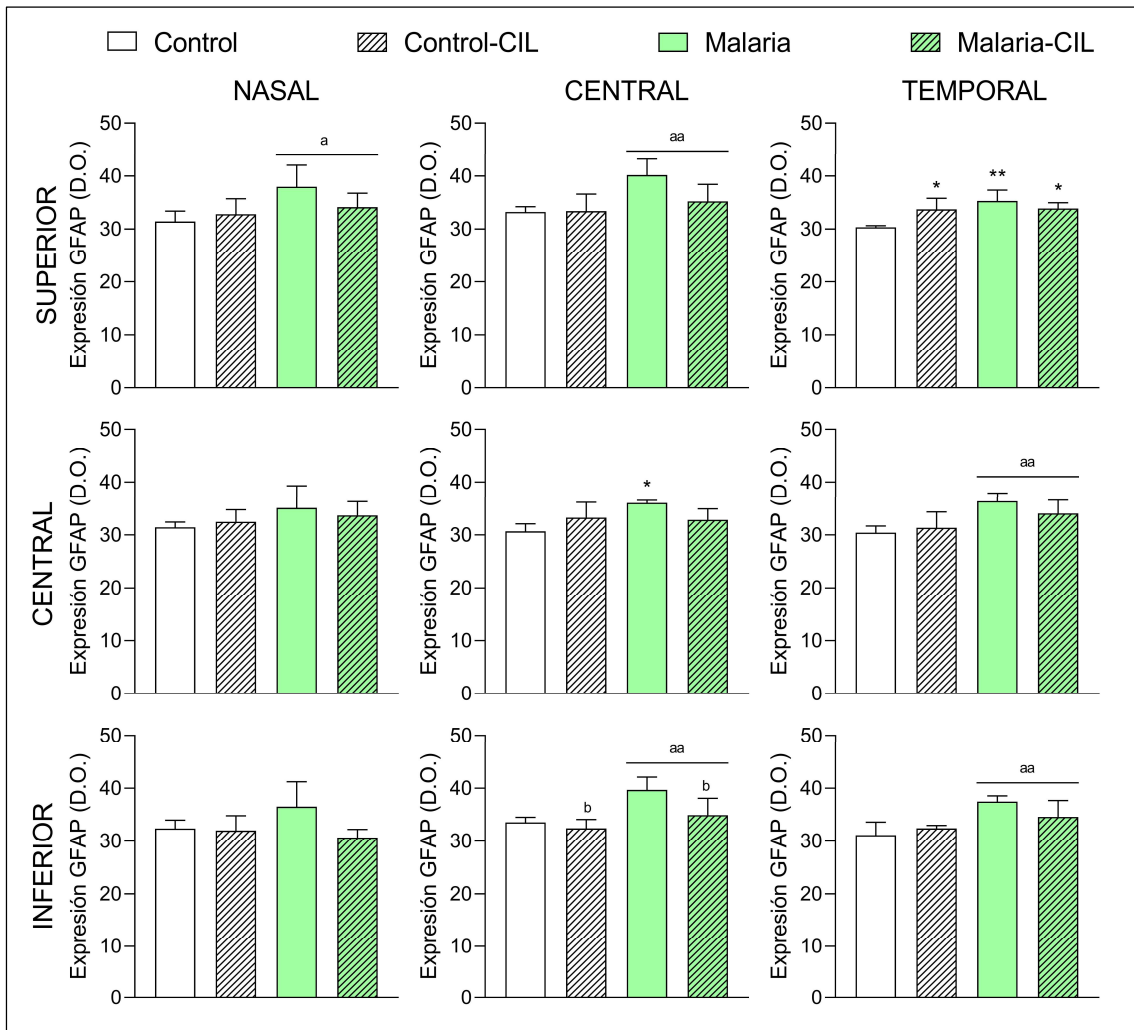


Figura 66. Expresión del marcador GFAP en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.); de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01 efecto general de la Malaria; ^bp<0,05 efecto general de la CIL; *p<0,05, **p<0,01 vs. Control. (n=4 animales por grupo experimental)

Tabla 22. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	MAL	,12)=6,89; p=0,022	F(1,12)=10,22; p=0,008	F(1,12)=10,92; p=0,006
	CIL	F(1,12)=0,70; ns	F(1,12)=2,96; ns	F(1,12)=1,61; ns
	MAL x CIL	F(1,12)=3,03; ns	F(1,12)=3,48; ns	F(1,12)=9,47; p=0,010
CENTRAL	MAL	F(1,12)=3,11; ns	F(1,12)=6,42; p=0,026	F(1,12)=15,31; p=0,002
	CIL	F(1,12)=0,02; ns	F(1,12)=0,10; ns	F(1,12)=0,41; ns
	MAL x CIL	F(1,12)=0,78; ns	F(1,12)=8,66; p=0,012	F(1,12)=2,14; ns
INFERIOR	MAL		F(1,12)=14,90; p=0,002	F(1,12)=16,90; p=0,001
	CIL	$\chi^2(3)=4,79$; ns	F(1,12)=7,02; p=0,021	F(1,12)=0,63; ns
	MAL x CIL		F(1,12)=2,64; ns	F(1,12)=4,05; ns

Tratamientos: MAL, malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: χ^2 , estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.66).

Tras evaluar la expresión de GFAP en las diferentes capas de la retina (**Fig.67A**) hemos observado variaciones en todas ellas, excepto en la CPI, aunque se observó una tendencia (no significativa) de aumento ($p=0,079$; efecto general de la malaria). La administración del parásito indujo un incremento significativo de la expresión en la CCG (Malaria vs. Control, $p=0,002$), en la CNE (Malaria vs. Control, $p<0,001$) y en el SE (Malaria vs. Control, $p=0,030$); junto con un aumento observado por un efecto general de la malaria en la CNI y en la CPE (revisar **Tabla 23** para ver los resultados del análisis). La CIL *per se* no tuvo efectos sobre la expresión del marcador en las diferentes capas, pero demostró una gran eficacia previniendo y/o revirtiendo el aumento observado en las capas más afectadas: CCG (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,017$), CNE (Malaria-CIL vs. Malaria, $p<0,001$) y SE (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,023$).

Posteriormente, realizamos un segundo análisis donde hemos querido cuantificar la progresión del daño agrupando las capas internas (Retina Interna: CCG, CPI y CNI) y las externas (Retina Externa: CPE, CNE, SE) (**Fig.67B**), observando en ambos casos un incremento estadísticamente significativo. En el caso de la retina interna se observó un efecto general de la malaria (ver **Tabla 23**); mientras que, en el caso de la retina externa, se observó un marcado aumento en los animales del grupo inoculado (Malaria vs. Control, $p=0,002$). No se observaron efectos *per se* de la CIL, sin embargo, hubo una tendencia de atenuación del aumento de expresión de GFAP en los animales doblemente tratados (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,05$).

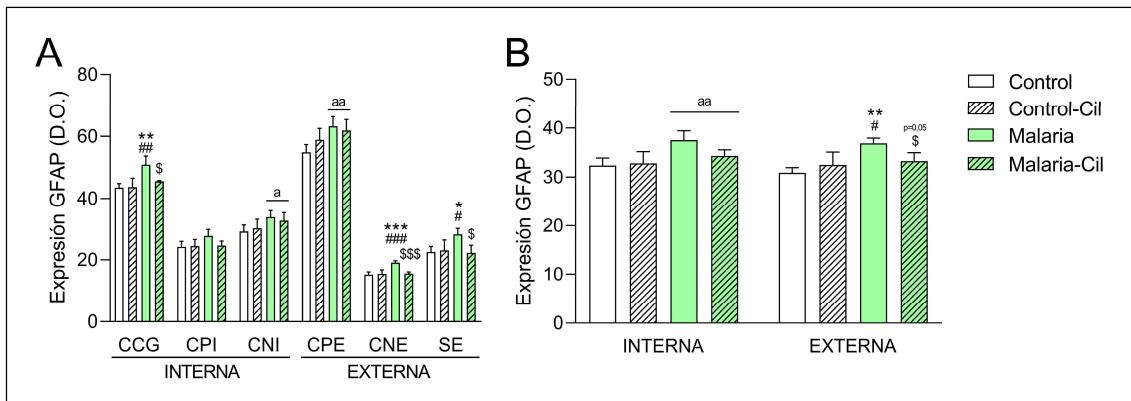


Figura 67. Expresión del marcador GFAP en las capas de la retina (A) y en la retina interna y externa (B) en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.); de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^ap<0,05, ^{aa}p<0,01 efecto general de la malaria; ^{*}p<0,05, ^{**}p<0,01, ^{***}p<0,001 vs. Control; [#]p<0,05; ^{##}p<0,01; ^{###}p<0,001 vs. Control-CIL; ^{\$}p<0,05; ^{\$\$\$}p<0,001 vs. Malaria. (n=4 animales por grupo experimental)

Tabla 23. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de GFAP en la retina interna, retina externa y en las diferentes capas retinianas en un modelo animal de malaria.

GFAP ⁺		INTERNA	CCG	CPI	CNI
RETINA INTERNA	MAL	F(1,12)=13,33; p=0,003	F(1,12)=19,00; p<0,001	F(1,12)=3,67; p=0,079	F(1,12)=8,40; p=0,013
	CIL	F(1,12)=2,26; ns	F(1,12)=6,21; p=0,028	F(1,12)=2,29; ns	F(1,12)=0,00; ns
MAL x CIL		F(1,12)=4,06; ns	F(1,12)=6,66; p=0,024	F(1,12)=3,20; ns	F(1,12)=0,77; ns
		EXTERNA	CPE	CNE	SE
RETINA EXTERNA	MAL	F(1,12)=14,98; p=0,002	F(1,12)=12,32; p=0,004	F(1,12)=20,22; p<0,001	F(1,12)=3,98; p=0,069
	CIL	F(1,12)=1,34; ns	F(1,12)=0,71; ns	F(1,12)=13,97; p=0,003	F(1,12)=4,92; p=0,047
MAL x CIL		F(1,12)=8,87; p=0,012	F(1,12)=2,68; ns	F(1,12)=18,69; p<0,001	F(1,12)=6,83; p=0,023

Tratamientos: MAL, malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad; p, p-valor; ns, no significativo. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. p, p-valor; ns, no significativo (resultados mostrados en Fig.67).

Resumen:

La inoculación del parásito produjo un aumento en la expresión de GFAP en la retina completa, esto es, una activación macroglial tanto en astrocitos como en células de Müller, que fue más marcada en las regiones Central y Temporal, y que estuvo presente en todas las capas de la retina a excepción de la CPI. La administración de CIL atenuó la activación macroglial, principalmente en las zonas más afectadas, observándose una mayor eficacia en las capas más afectadas por el parásito (CCG, CNE y SE).

2.2.3. Análisis de las células microgliales de la retina (células Iba1⁺)

El análisis del número de células Iba1⁺ en la retina completa (**Fig.68**) reveló diferencias estadísticamente significativas [$\chi^2(3)=13,90$; p=0,003], observándose un marcado incremento en el número de células Iba1⁺ en los animales inoculados con Malaria (vs. Control, p=0,002). No se observaron otras diferencias significativas entre los grupos,

destacando que el número de células Iba1⁺ no difería entre el grupo doblemente tratado y el grupo control (Malaria-CIL vs. Control, ns). En las microfotografías (**Fig.68**), en el grupo Malaria, se observa un mayor número de células microgliales con un mayor grado de activación, un mayor número de ramificaciones. Mientras que en los otros grupos experimentales la presencia de células microgliales disminuye, y las presentes muestra un menor marcaje y un menor número de ramificaciones.

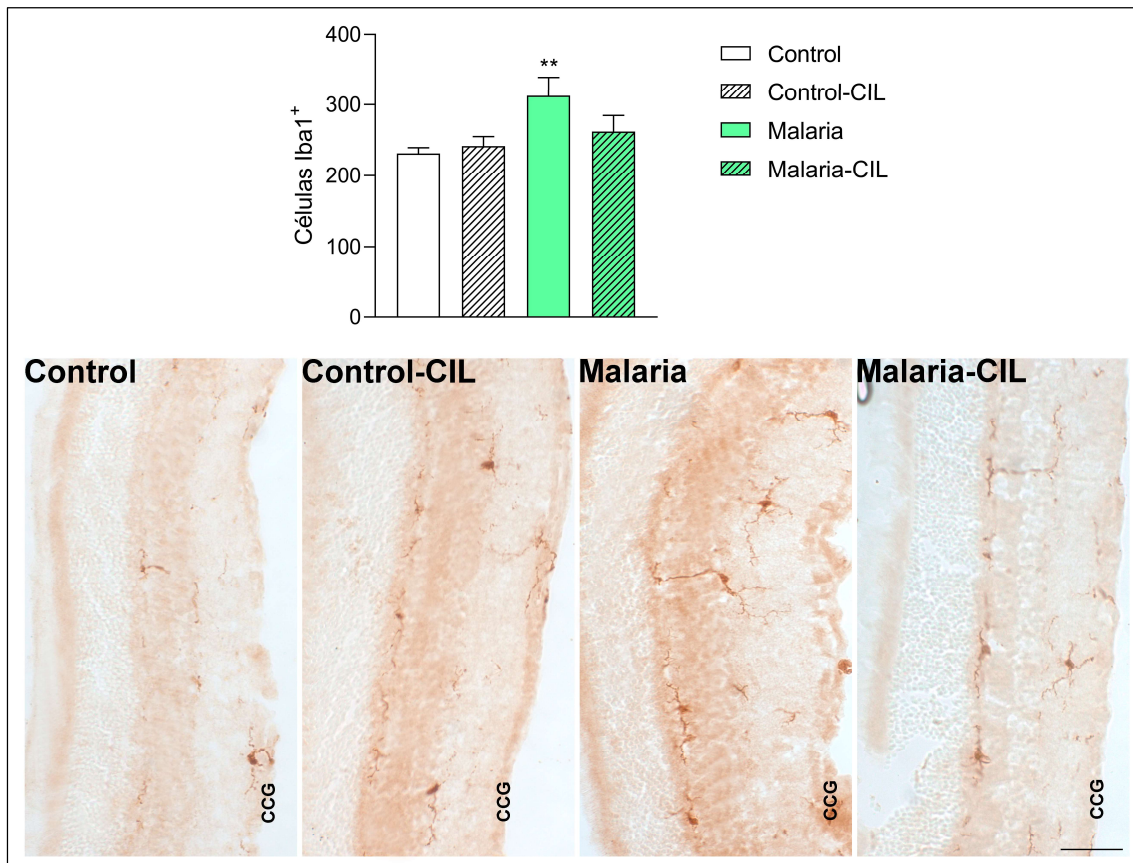


Figura 68. Expresión de células Iba1⁺ en la retina completa en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior se muestra, en un histograma, la media ± la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: **p<0,01 vs. Control. (n=5 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (20x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 µm.

El análisis del número de células microgliales en las diferentes áreas retinianas mostró diferencias significativas en casi todas las áreas estudiadas (**Fig.69**). La inoculación del parásito produjo un marcado aumento en el número de células Iba1⁺ en todas las áreas de la región central (Malaria vs. Control, p<0,001), y un incremento algo menor en la región Temporal-Inferior (Malaria vs. Control, p=0,036); se observó además un efecto general de la malaria, que incrementó el número de células microgliales, en las áreas Nasal-Superior, Nasal-Inferior y Temporal-Central (ver **Tabla 24** para los análisis estadísticos). La

administración de CIL, *per se*, no provocó cambios, pero la administración de CIL en los animales inoculados con el parásito bloqueó y/o atenuó el incremento en el número de células Iba1+, en concreto en las áreas Central-Central, Temporal-Superior y Temporal-Inferior (Malaria-CIL vs. Malaria, $p < 0,05$), y Central-Superior y Central-Inferior (Malaria-CIL vs. Control, ns).

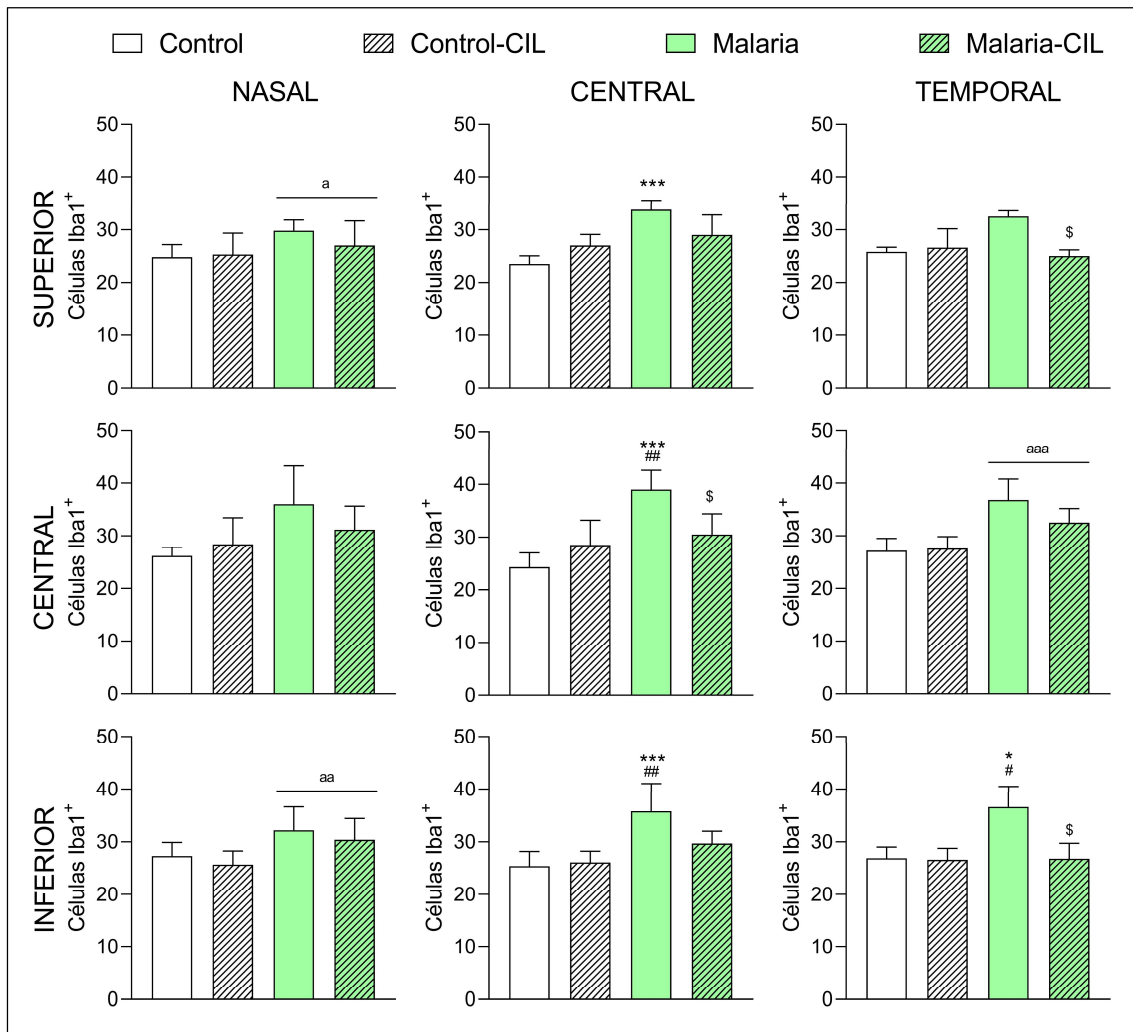


Figura 69. Expresión de células Iba1+ en las áreas de la retina en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey/Kruskal-Wallis, comparaciones con la corrección de Bonferroni: ^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,01$, ^{aaa} $p < 0,001$ efecto general de la Malaria; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. Control-CIL; \$ $p < 0,05$ vs. Malaria. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 24. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas áreas de la retina en un modelo animal de malaria

		NASAL	CENTRAL	TEMPORAL
SUPERIOR	MAL	(1,16)=4,63; p=0,047		
	CIL	F(1,16)=0,55; ns	X ² (3)=15,16; p=0,002	X ² (3)=11,31; p=0,010
	MAL x CIL	F(1,16)=1,12; ns		
CENTRAL	MAL		F(1,16)=23,71; p<0,001	F(1,16)=31,43; p<0,001
	CIL	X ² (3)=7,55; p=0,056	F(1,16)=1,57; ns	F(1,16)=2,27; ns
	MAL x CIL		F(1,16)=13,71; p=0,002	F(1,16)=3,30; ns
INFERIOR	MAL	(1,16)=9,38; p=0,007	F(1,16)=24,12; p<0,001	
	CIL	F(1,16)=1,18; ns	F(1,16)=2,53; ns	X ² (3)=11,12; p=0,011
	MAL x CIL	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=4,84; p=0,043	

Tratamientos: MAL, malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: X², estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.69).

El análisis del patrón de distribución de las células microgliales en las diferentes capas de la retina (**Fig.70A; Tabla 25**) reveló diferencias estadísticamente significativas en todas las capas analizadas, excepto en la CNE-SE. Los animales inoculados con el parásito mostraron un número mayor de células Iba1⁺ en las capas más internas de la retina (CCG y CPI, Malaria vs. Control, p<0,001 en ambos casos), así como en las capas CNI y CPE (efecto general de la Malaria, ver **Tabla 25**), en la CNE-SE donde también se observó una mayor presencia de células microgliales, aunque la diferencia no alcanzara la significación estadística. CIL *per se* apenas tuvo efectos, sólo se observó un efecto general del fármaco, que disminuyó el número de células microgliales en la CNI. Sin embargo, CIL demostró una gran eficacia a la hora de prevenir y/o revertir el aumento microglial observado en la CCG (Malaria-CIL vs. Malaria, p<0,034) y en la CPI (Malaria-CIL vs. Malaria, p<0,007). En los animales inoculados con Malaria, el tratamiento con CIL redujo el número de células microgliales respecto a los sólo tratados con el parásito (Malaria-CIL vs. Malaria). De forma similar, se observó un efecto general de la Malaria sobre los morfotipos microgliales analizados (**Fig.70B**): la administración del parásito redujo la proporción de morfotipos RD e incrementó el porcentaje de morfotipos activados VT (consultar **Tabla 25**); en ausencia de efectos de CIL sobre este parámetro.

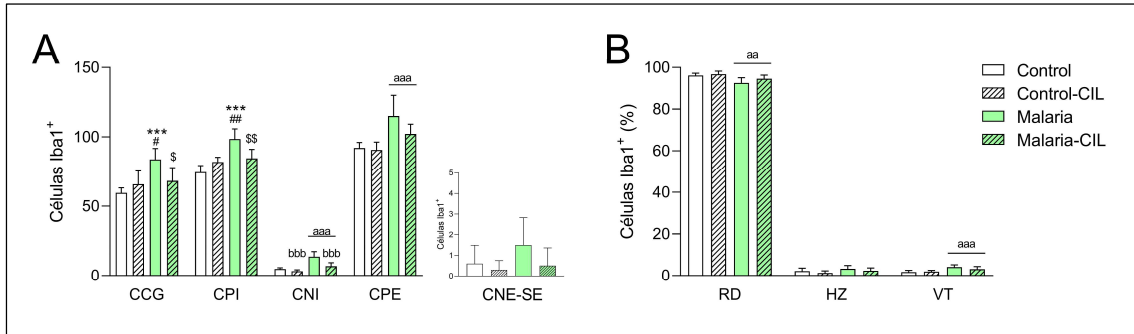


Figura 70. Expresión de células Iba1⁺ en las capas de la retina (A) y evaluación de su morfología (B) en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar (D.E.) del número de células marcadas (A) y del porcentaje de cada morfotipo (B): RD, radial; HZ, horizontal; VT, vertical. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^{aa}p<0,01, ^{aaa}p<0,001 efecto general de la Malaria; ^{bbb}p<0,001 efecto general de la CIL; ^{***}p<0,001 vs. Control; [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 vs. Control-CIL; ^{\$}p<0,05, ^{\$\$}p<0,01 vs. Malaria. (n=5 animales por grupo experimental)

Tabla 25. Principales resultados estadísticos del análisis de la expresión de células Iba1⁺ en las distintas capas de la retina y del porcentaje de la evaluación de los morfotipos en un modelo animal de malaria

	Células Iba1 ⁺	CCG	CPI	CNI	CPE	CNE-SE
CAPAS	MAL	F(1,16)=13,67; p=0,002	F(1,16)=27,56; p<0,001	F(1,16)=51,85; p<0,001	F(1,16)=20,80; p<0,001	
	CIL	F(1,16)=1,71; ns	F(1,16)=1,63; ns	F(1,16)=21,80; p<0,001	F(1,16)=3,05; ns	X ² (3)=3,67; ns
	MAL x CIL	F(1,16)=9,18; p=0,008	F(1,16)=17,54; p<0,001	F(1,16)=1,38; ns	F(1,16)=1,80; ns	
MORFOTIPOS		RD	HZ	VT		
	MAL	F(1,16)=13,47; p=0,002	F(1,16)=3,11; ns	F(1,16)=17,93; p<0,001		
	CIL	F(1,16)=2,77; ns	F(1,16)=2,43; ns	F(1,16)=0,75; ns		
	MAL x CIL	F(1,16)=0,69; ns	F(1,16)=0,00; ns	F(1,16)=2,14; ns		

Tratamientos: MAL, malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. Análisis no paramétricos: Kruskal-Wallis: X², estadístico chi-cuadrado, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron comparaciones a posteriori con la corrección de Bonferroni. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.70).

Resumen:

La inoculación del parásito produjo un marcado aumento en el número de células microgliales en la retina completa, incremento que fue mayor en las áreas más centrales, y en las capas más internas (CCG y CPI) de la misma; además indujo una activación de las células microgliales incrementando la presencia del morfotipo migratorio VT, frente al RD. La administración de CIL logró prevenir y/o revertir el aumento en el número de células microgliales, mayoritariamente en las áreas y capas más afectadas, aunque lo logró modificar el cambio al morfotipo activado VT. CIL *per se* no mostró ningún efecto en estos parámetros.

2.3. ESTUDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Al igual que en el modelo animal de sepsis, en este modelo se evaluó también la posible implicación de los receptores NLRP3 y TLR4 mediante un estudio de colocalización por inmunofluorescencia. De forma similar, se analizaron los grupos experimentales inoculados con el parásito en los que se había descrito un mayor daño neuronal y glial.

Se detectó la expresión del receptor citosólico NLRP3 en las células CGRs-células Brn3a⁺ (**Fig.71**); pero no se observó la coexpresión de este marcador con las células GFAP⁺ ni con las células Iba1⁺. En las microfotografías observamos en rojo las CGRs, perfectamente alineadas en la capa que les corresponde, y en verde observamos la expresión del NLRP3; tras fusionar las imágenes observamos las células que coexpresan ambos marcadores (Brn3a⁺/NLRP3⁺) en color amarillo. Estos resultados muestran que las CGRs expresan este receptor, que además se detecta en la CNI, indicando su posible expresión en otros tipos celulares presentes en esa capa.

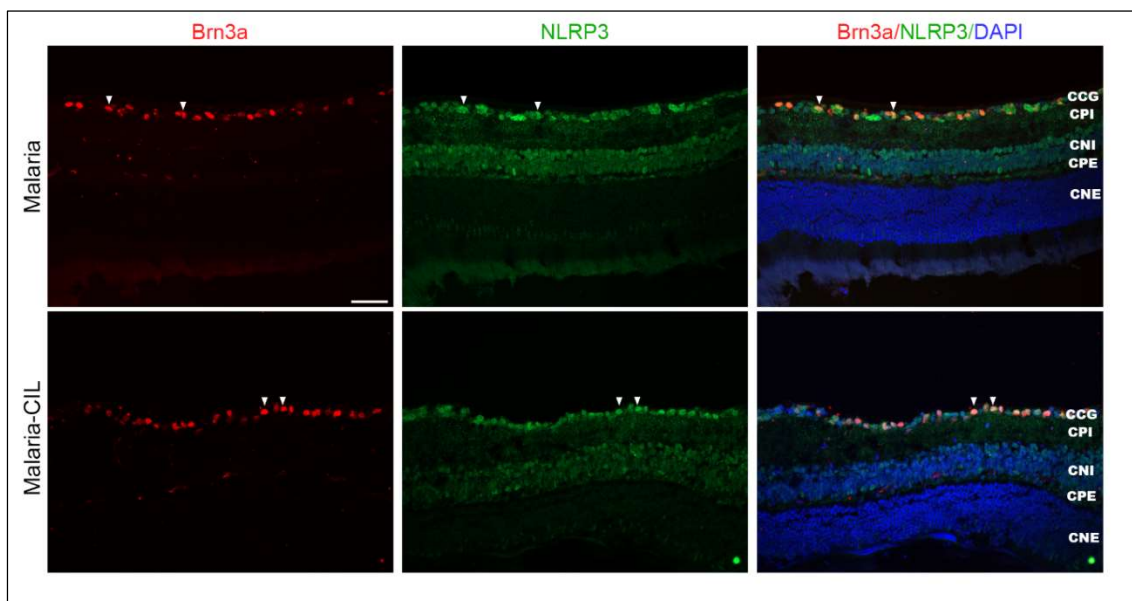


Figura 71. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 en las células Brn3a⁺ en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En la lámina se muestran microfotografías representativas con marcaje individual de cada marcador Brn3a (rojo) y NLRP3 (verde), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: Malaria y Malaria-CIL. Con flechas se indican algunas células inmunopositivas para los dos marcadores (Brn3a⁺/NLRP3⁺). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. 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 μ m.

El estudio del receptor TLR4 mostro que, en este caso, son las células GFAP⁺ las que expresaban el receptor (**Fig.72**), sin observar su coexpresión por parte de las CGRs o de las células microgliales. En las microfotografías podemos ver a las células macrogliales, astrocitos y prolongaciones vítreas de las Müller, en color verde, mientras que el TLR4 aparece en color rojo. La combinación de ambas imágenes nos indica en color amarillo dónde se produce la coexpresión de ambos marcadores (GFAP⁺/TLR4⁺). En este caso, la colocalización parece restringirse a la capa de fibras y a la CCG, lo que indica que son los astrocitos y las prolongaciones vítreas de las Müller las que expresan este receptor.

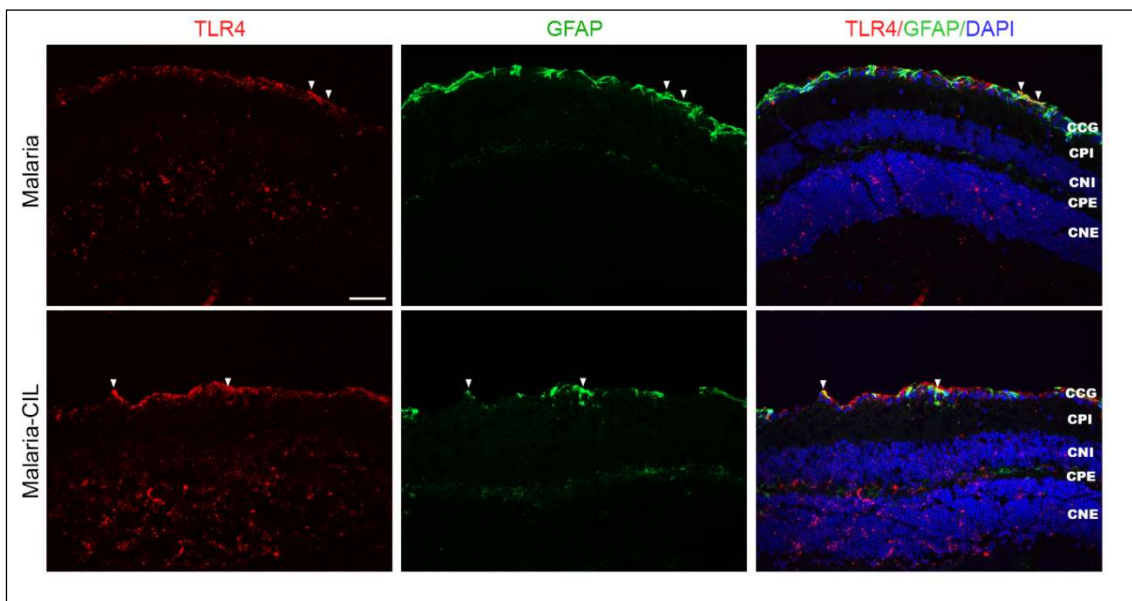


Figura 72. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de TLR4 en las células GFAP⁺ en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En la lámina se muestran microfotografías representativas con marcaje individual de cada marcador TLR4 (rojo) y GFAP (verde), y su combinación (amarillo) en los grupos experimentales: Malaria y Malaria-CIL. Con flechas se indican algunas células inmunopositivas para los dos marcadores (TLR4⁺/GFAP⁺). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. TLR4, receptor de 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 μ m.

En conclusión, en la retina de ratones C57BL/6J inoculados con *P. berghei* se observa la coexpresión del receptor NLRP3 en las CGRs, y la expresión del receptor TLR4 en las células macrogliales, principalmente en astrocitos y en las prolongaciones vítreas de las células de Müller. En estos estudios de colocalización no se han observado diferencias en la expresión de estos marcadores tras la administración de CIL (**Tabla 26**).

Tabla 26. Resultados de la colocalización de los receptores NLRP3 y TLR4 con diferentes poblaciones celulares en las retinas de un modelo animal de malaria

Marcadores	Brn3a	GFAP	Iba1
NLRP3	SI	NO	NO
TLR4	NO	SI	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 malaria en ratones C57BL/6J inducido por la inoculación de *P. berghei*.

Resumen:

Los estudios de colocalización por inmunofluorescencia demuestran que las CGRs-células Brn3a⁺ expresan NLRP3 y que algunas células GFAP⁺ expresan el receptor TLR4. La expresión de TLR4 se observó principalmente en la CCG, lo que sugiere su presencia en astrocitos y en las prolongaciones vítreas de las células de Müller.

2.4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS NÚCLEOS DE RELEVO DE LA VÍA VISUAL

2.4.1. Análisis de las células neuronales (células NeuN⁺)

Para evaluar el estado neuronal, se llevó a cabo una cuantificación del marcador NeuN en los diferentes núcleos de la vía visual analizados (**Fig.73**). El análisis de la expresión del marcador en el CS reveló un efecto general de la Malaria [$F(1,18)=14,30$; $p=0,001$] en ausencia de efectos del fármaco [$F(1,18)=0,03$; ns], aunque sí se detectó una interacción significativa entre ambos factores [$F(1,18)=6,18$; $p=0,023$]. Los análisis post-hoc revelaron que los animales Malaria tenían una menor expresión de NeuN en este núcleo respecto a los animales Control (Malaria vs. Control, $p=0,001$). CIL no mostró ningún efecto, y en los animales Malaria-CIL no se observó ningún efecto, y no difirieron de los animales Control (Malaria-CIL vs. Control; ns).

En el NGLd encontramos resultados similares (**Fig.73**). Encontramos un efecto general de la malaria [$F(1,19)=12,28$; $p=0,002$], en ausencia de efectos de la CIL [$F(1,19)=0,24$; ns], pero en presencia de una interacción significativa entre los factores [$F(1,19)=9,52$; $p=0,006$]. Las comparaciones a posteriori mostraron una menor expresión de Neu N en los animales Malaria frente a los del grupo Control (Malaria vs. Control, $p<0,001$). CIL no afectó a la expresión de NeuN en este núcleo, y el grupo doble tratado no presentó tampoco cambios en la expresión de NeuN, que mostraron niveles similares a los del grupo Control (Malaria-CIL vs. Control; ns).

En V1 (**Fig.73**) el análisis estadístico reveló un efecto general del parásito [$F(1,19)=50,30$; $p<0,001$], en ausencia de efectos de la CIL [$F(1,19)=0,01$; ns], y una interacción estadísticamente significativa entre factores [$F(1,19)=13,30$; $p=0,002$]. Las comparaciones a posteriori mostraron una menor expresión de NeuN en los animales Malaria respecto a los animales Control (Malaria vs. Control y Malaria vs. Control-CIL, $p<0,001$). La administración de CIL *per se* no tuvo ningún efecto; sin embargo, los animales doblemente tratados a pesar de que también sufrieron una reducción significativa del marcaje (Malaria-CIL vs Control, $p<0,001$), se pudo apreciar una tendencia a la atenuación de la pérdida de expresión (Malaria-CIL vs. Malaria; $p=0,059$).

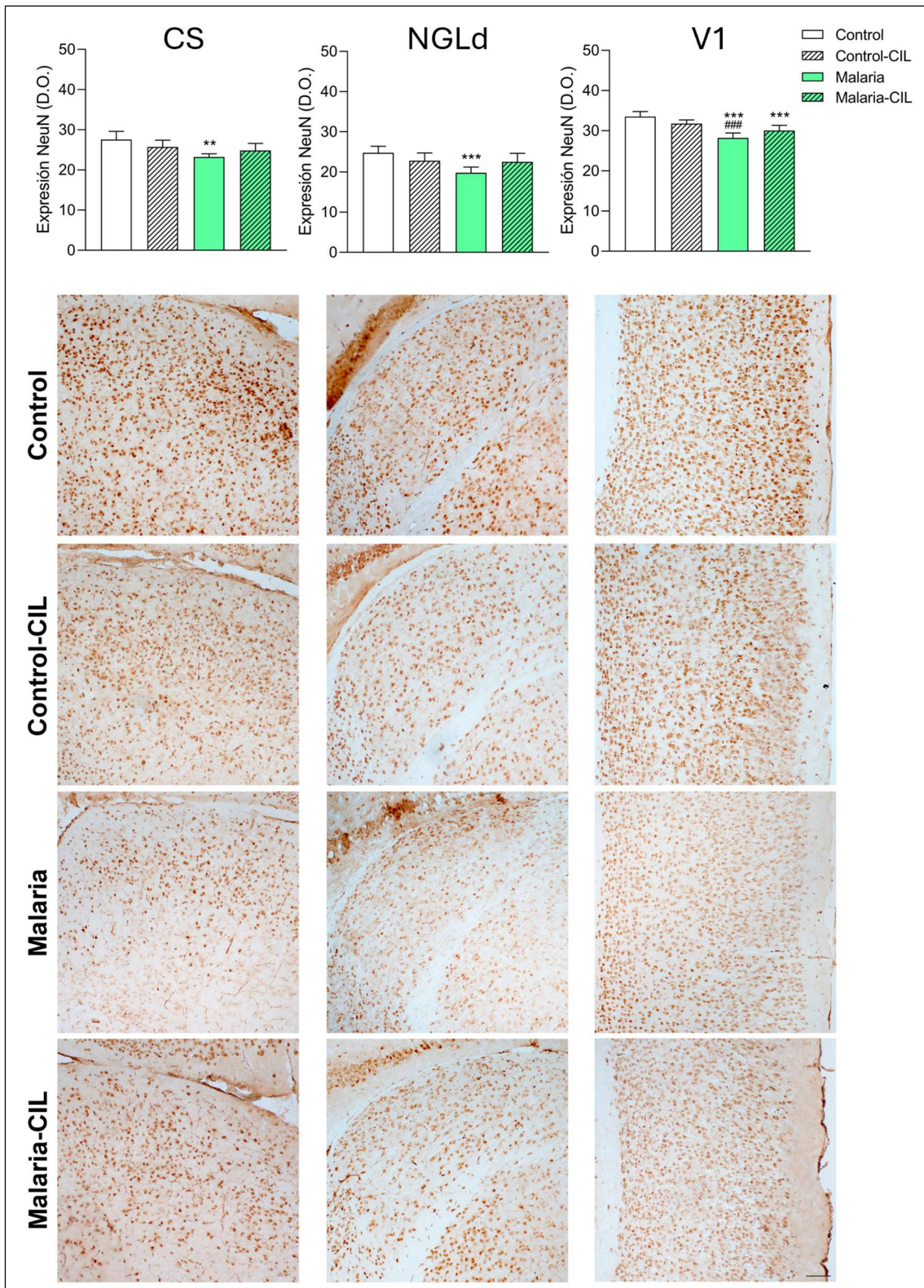


Figura 73. Expresión de células NeuN⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.) obtenida en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control; ### $p < 0,001$ vs. Control-CIL. (n=5-6 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el análisis del patrón de daño en V1 (**Fig.74**) observamos diferencias estadísticamente significativas tanto en la V1 externa [MAL: $F(1,19)=32,54$; $p<0,001$; CIL: $F(1,19)=0,19$; ns; MAL x CIL: $F(1,19)=7,86$; $p=0,011$] como en la V1 interna [$F(1,19)=17,18$; $p<0,001$; CIL: $F(1,19)=0,04$; ns; MAL x CIL: $F(1,19)=4,99$; $p=0,038$]. La inoculación del parásito indujo una reducción de NeuN tanto en la corteza externa como en la interna (Malaria vs. Control, $p<0,001$; en ambos casos), y, en ausencia de efectos de la CIL *per se*, en los grupos con el doble tratamiento se observó una atenuación del daño, esto es, una menor reducción del marcador NeuN (V1 externa: Malaria-CIL vs. Control, $p=0,006$; V1 interna: Malaria-CIL vs. Control, $p<0,05$).

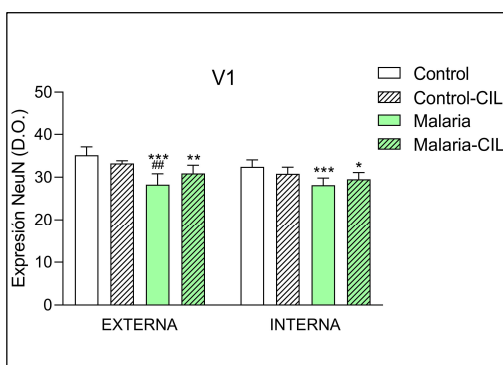


Figura 74. Expresión de células NeuN⁺ en la V1 en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.). ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^a $p<0,05$ efecto general de la Malaria; ^{*} $p<0,05$, ^{**} $p<0,01$, ^{***} $p<0,001$ vs. Control; [#] $p<0,05$, ^{##} $p<0,01$ vs. Control-CIL; [§] $p<0,05$ vs. Malaria. (n=5-6 animales por grupo experimental)

Resumen:

La inoculación del parásito indujo una disminución del marcador NeuN en los tres núcleos de estudio (CS, NGLd y V1). La mera aplicación de CIL no indujo cambio sobre la expresión del marcador, pero sí fue capaz de evitar la pérdida de expresión en los animales inoculados con el parásito en el CS, en el NGLd, y en V1, tanto en la corteza externa como interna.

2.4.2. Análisis de las células macrogliales (células GFAP⁺)

El análisis de la expresión de GFAP (**Fig.75**) mostró, en el CS, un efecto general de la inoculación del parásito [$F(1,19)=120,43$; $p<0,001$], en ausencia de efectos de la CIL [$F(1,19)=0,34$; ns], pero en presencia de una interacción significativa [$F(1,19)=49,07$; $p<0,001$]. Las comparaciones a posteriori mostraron una mayor expresión de GFAP en los animales tratados con el parásito (Malaria vs. Control y Control-CIL, $p<0,001$), CIL también incremento la expresión del marcador (Control-CIL vs. Control, $p=0,001$), y, en el grupo Malaria-CIL, aunque también se observó un incremento en la expresión de GFAP (Malaria-CIL vs. Control, $p<0,001$), este incremento fue menor que el inducido en el grupo Malaria (Malaria-CIL vs. Malaria, $p<0,001$).

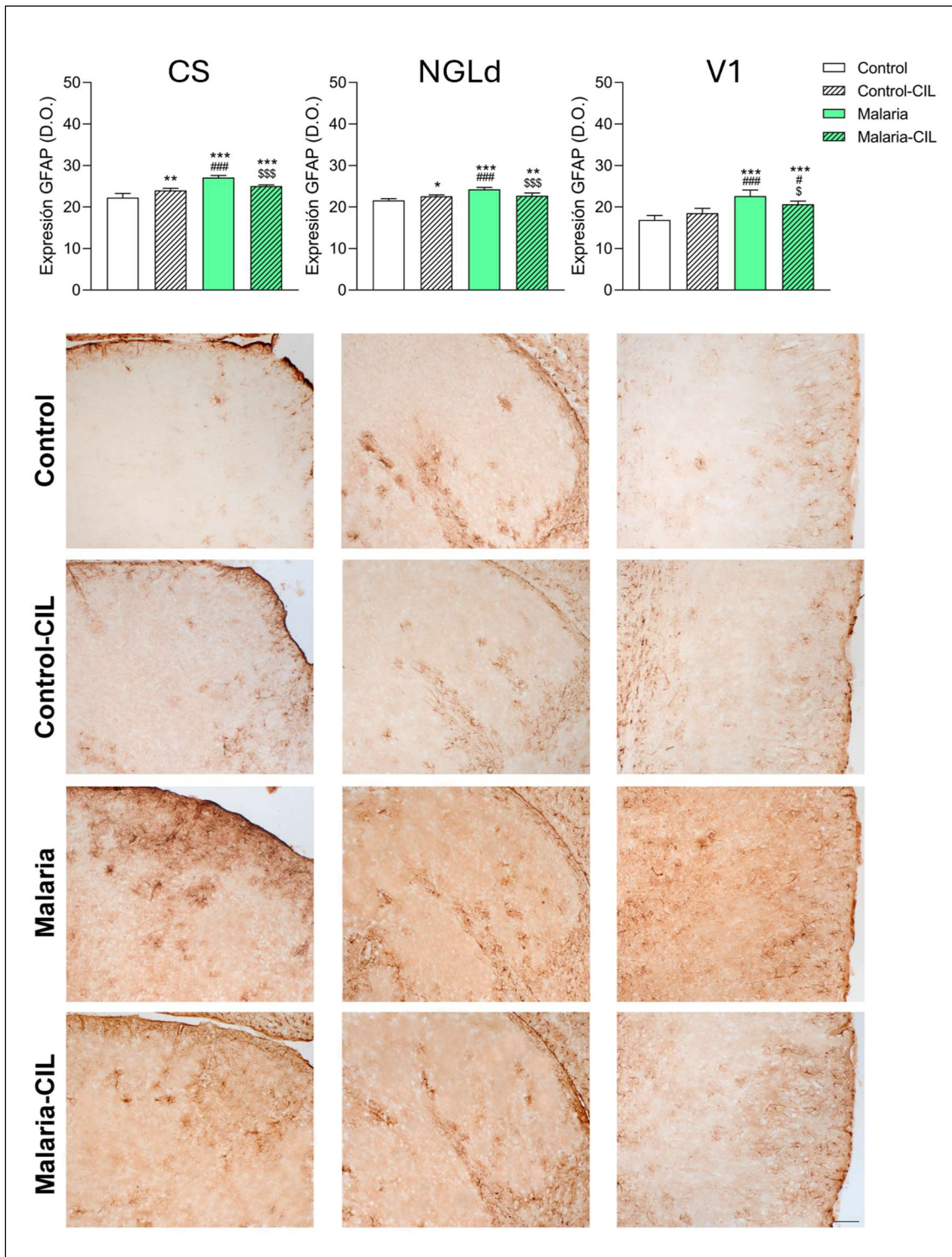


Figura 75. Expresión de células GFAP⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10^6 glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), de la densidad óptica (D.O.) obtenida en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. Control-CIL; \$ $p < 0,05$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. Malaria. (n=5-6 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el NGLd, el análisis de los resultados reveló un efecto general de la Malaria [$F(1,19)=46,80$; $p<0,001$] en ausencia de efectos del fármaco [$F(1,19)=1,40$; ns], pero sí de una interacción significativa entre los factores [$F(1,19)=38,69$; $p<0,001$]. La administración del parásito indujo un aumento de la expresión de GFAP (Malaria vs. Control, $p<0,001$), CIL aumentó ligeramente los niveles de expresión de GFAP (Control-CIL vs. Control, $p=0,012$), y los animales doblemente tratados, que también mostraron un aumento en la expresión de GFAP (Malaria-CIL vs. Control, $p=0,003$), mostraron un incremento significativamente menor que los animales Malaria (Malaria-CIL vs. Malaria, $p<0,001$).

En V1 la expresión de GFAP también se vio afectada significativamente por el factor Malaria [$F(1,19)=68,36$; $p<0,001$], en ausencia de efectos del fármaco [$F(1,19)=0,10$; ns], pero en presencia de una interacción significativa entre los factores [$F(1,19)=13,68$; $p=0,002$]. Los análisis *post-hoc* revelaron una mayor expresión en los niveles de GFAP en el grupo Malaria (Malaria vs. Control, $p<0,001$) y en el grupo con el doble tratamiento (Malaria-CIL vs. Control, $p<0,001$), sin embargo, en este último, el incremento fue significativamente menor que en el grupo de Malaria (Malaria-CIL vs. Malaria, $p=0,040$). La administración de CIL *per se* no modificó la expresión de GFAP en V1.

Resumen:

La inoculación del parásito indujo un marcado incremento en la expresión de GFAP, esto es, una activación microglial en los tres núcleos de la vía visual estudiados (CS, NGLd y V1). La administración de CIL *per se* provocó un incremento de la expresión de este marcador en el CS y en el NGLd, pero la combinación de los tratamientos logró atenuar la activación microglial previamente descrita.

2.4.3. Análisis de las células microgliales (células Iba1⁺)

El análisis de la cuantificación de las células Iba1⁺ (**Fig. 76**) mostró, en el CS, un efecto general de la inoculación del parásito [$F(1,19)=17,31$; $p<0,001$] y del fármaco CIL [$F(1,19)=6,40$; $p=0,020$], en ausencia de una interacción significativa entre los factores [$F(1,19)=0,03$; ns]. Tanto el parásito de la malaria como CIL redujeron el número de células microgliales en el CS. En el NGLd, no se observó ningún efecto asociado a la inoculación del parásito [$F(1,19)=2,92$; ns], pero sí se observó un efecto general del fármaco [$F(1,19)=13,92$; $p=0,001$], en ausencia de una interacción significativa [$F(1,19)=0,58$; ns]. La CIL indujo un ligero aumento en el número de células microgliales en el NGLd. Por el contrario, en V1, no se observaron diferencias entre los grupos en el número total de células Iba1⁺ [MAL: $F(1,16)=0,58$; ns; CIL: $F(1,16)=0,09$; ns; MAL x CIL: $F(1,16)=1,23$; ns].

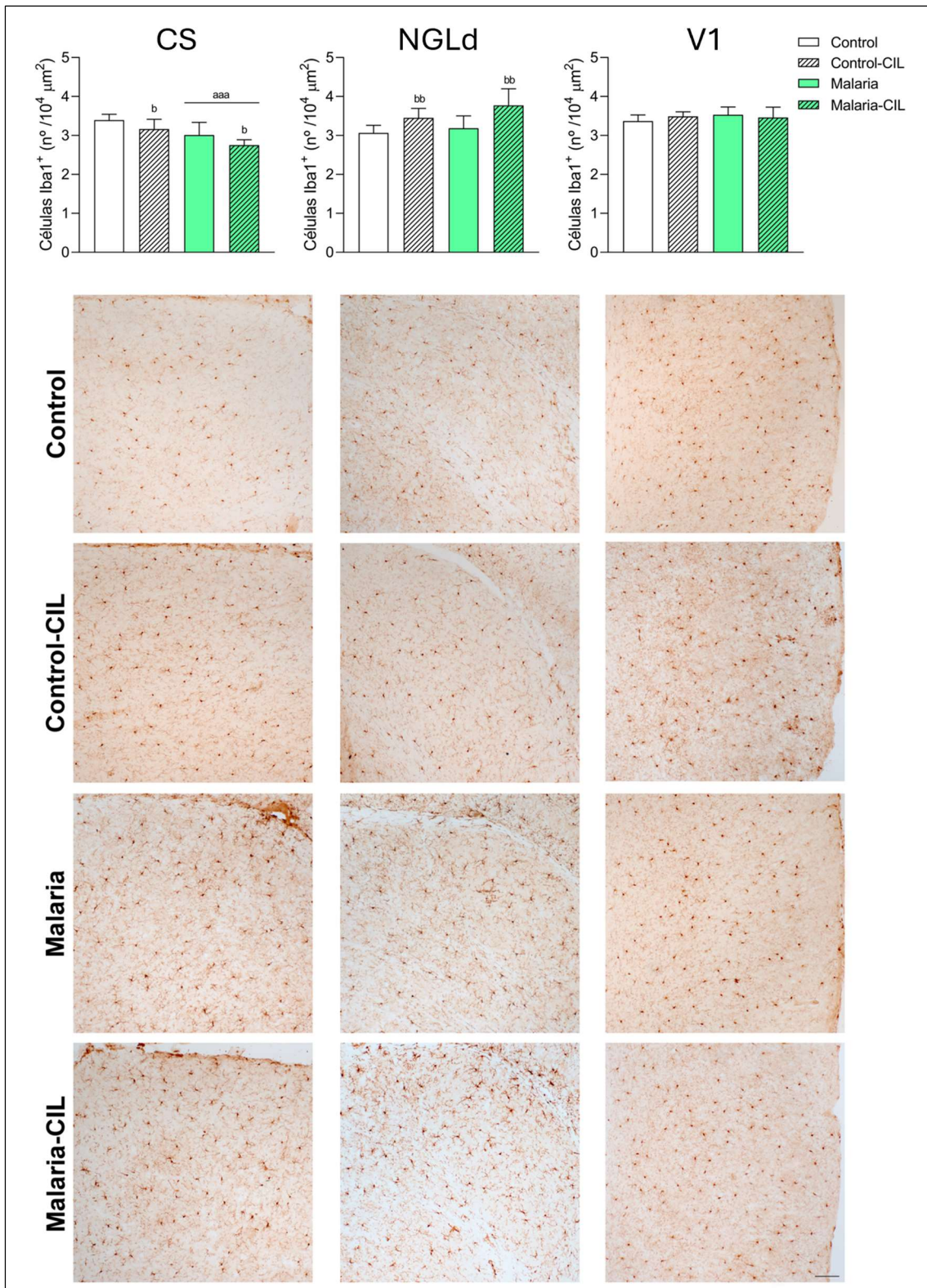


Figura 76. Expresión de células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. En el panel superior, los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar (D.E.), del número de células obtenido en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^{aaa}p<0,001 efecto general de la Malaria; ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 efecto general de la CIL. (n=5-6 animales por grupo experimental). En el panel inferior se muestran microfotografías (10x) representativas de cada uno de los grupos experimentales. Barra de aumentos: 50 μ m.

En el análisis por morfotipos observamos efectos similares en las tres regiones (**Fig.77**). En el CS se observó un efecto general del parásito [$F(1,19)=57,27$; $p<0,001$] y de la CIL [$F(1,19)=27,74$; $p<0,001$], en ausencia de efectos de la interacción entre factores [$F(1,19)=0,58$; ns]. Tanto la inoculación del parásito como la administración periférica de CIL produjeron una disminución de los morfotipos basales/residentes, junto con un aumento de los morfotipos reactivos; la inoculación del parásito indujo una disminución en el porcentaje de microglía de morfotipo I, incrementando la presencia de los morfotipos III y IV; mientras que la CIL *per se* redujo la presencia de microglía de morfotipo I en aras de incrementar el morfotipo IV.

Encontramos resultados similares en el NGLd, donde se encontró un efecto general del factor malaria [$F(1,19)=58,95$; $p<0,001$] y del factor CIL [$F(1,19)=7,61$; $p=0,013$], en ausencia de efectos de la interacción entre factores [$F(1,19)=0,10$; ns]. Tanto la inoculación del parásito como la administración de CIL incrementaron la presencia de morfotipos reactivos a expensas de reducir los niveles de microglía basal o residente. La inoculación del parásito disminuyó la presencia de los morfotipos I (Malaria vs. Control, $p=0,031$) y II (Malaria vs. Control, $p=0,002$), incrementando la presencia de morfotipos reactivos III y IV (Efecto general; consultar **Tabla 27**). Por otro lado, la administración de CIL redujo la presencia del morfotipo II (Control-CIL vs. Control, $p=0,006$), incrementando la presencia del morfotipo III (Efecto general; consultar **Tabla 27**).

En la V1 observamos un efecto general de la inoculación del parásito [$F(1,16)=23,65$; $p<0,001$] y del fármaco [$F(1,16)=10,46$; $p=0,005$] en ausencia de efectos de la interacción entre factores [$F(1,16)=0,07$; ns]. Tanto el parásito como la administración de CIL redujeron la presencia de los morfotipos basales o residentes, incrementando la presencia de los morfotipos reactivos. En el grupo de Malaria se observó una reducción del morfotipo basal II (Malaria vs. Control, $p=0,028$), y un incremento en los morfotipos reactivos III y IV (Efecto general, ver **Tabla 27**); mientras que CIL aumentó el porcentaje del morfotipo IV (Efecto general, ver **Tabla 27**). En este modelo animal de malaria no se observó la presencia de células de microglía de morfotipo V en ninguno de los núcleos de la vía visual analizados.

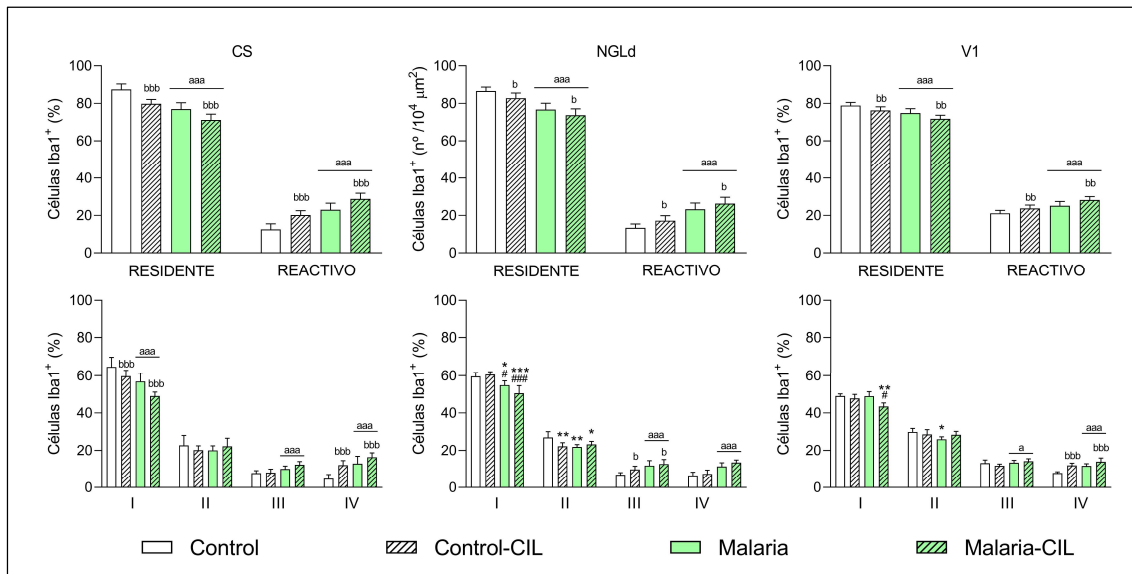


Figura 77. Morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria. Ratones hembra C57BL/6J fueron inoculados con *Plasmodium berghei* (10⁶ glóbulos rojos infectados, GRI, i.p.) y, de manera inmediata, recibieron una dosis de cilastatina (CIL, 150 mg/kg, i.p.), la cual se administró diariamente hasta el día 5 postinfección (d5), completando un total de 6 inyecciones. Uno de los grupos control recibió el mismo número y dosis de CIL. Los animales se sacrificaron el d6 tras la inoculación del parásito para la obtención de los tejidos. Grupos experimentales: Control, Control-CIL, Malaria y Malaria-CIL. Los histogramas muestran la media ± la desviación estándar (D.E.), del porcentaje de los morfotipos residentes (I-II) o reactivos (III-V) en cada núcleo: CS, colículo superior; NGLd, núcleo geniculado lateral dorsal; V1, corteza visual primaria. ANOVA de 2 vías, Test de Tukey: ^ap<0,05, ^{aaa}p<0,001 efecto general de la Malaria; ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01, ^{bbb}p<0,001 efecto general de la CIL; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Control; #p<0,05, ###p<0,001 vs. Control-CIL. (n=5-6 animales por grupo experimental)

Tabla 27. Principales resultados estadísticos del análisis de los morfotipos de las células Iba1⁺ en los núcleos de relevo de la vía visual en un modelo animal de malaria

Células Iba1 ⁺		MF I	MF II	MF III	MF IV	MF V
CS	MAL	F(1,19)=31,74; p<0,001	F(1,19)=0,40; ns	F(1,19)=23,37; p<0,001	F(1,19)=28,28; p<0,001	-
	CIL	F(1,19)=15,25; p<0,001	F(1,19)=0,02; ns	F(1,19)=3,36; ns	F(1,19)=21,21; p<0,001	-
	MAL x CIL	F(1,19)=0,76; ns	F(1,19)=2,16; ns	F(1,19)=2,16; ns	F(1,19)=2,83; ns	-
NGLd	MAL	F(1,19)=42,32; p<0,001	F(1,19)=5,58; p=0,029	F(1,19)=21,14; p<0,001	F(1,19)=53,95; p<0,001	-
	CIL	F(1,19)=2,14; ns	F(1,19)=3,96; p=0,061	F(1,19)=4,81; p=0,041	F(1,19)=4,05; p=0,059	-
	MAL x CIL	F(1,19)=5,34; p=0,032	F(1,19)=12,05; p=0,003	F(1,19)=1,54; ns	F(1,19)=0,82; ns	-
CV	MAL	F(1,16)=6,40; p=0,022	F(1,16)=5,32; p=0,035	F(1,16)=5,26; p=0,036	F(1,16)=22,23; p<0,001	-
	CIL	F(1,16)=14,83; p=0,001	F(1,16)=0,37; ns	F(1,16)=0,26; ns	F(1,16)=25,79; p<0,001	-
	MAL x CIL	F(1,16)=5,98; p=0,026	F(1,16)=4,64; p=0,047	F(1,16)=3,67; ns	F(1,16)=2,11; ns	-

Tratamiento: MAL, Malaria; CIL, cilastatina. Análisis paramétricos: ANOVA de 2 vías; F, estadístico F de Fisher-Snedecor, indicando entre paréntesis los grados de libertad. En caso de interacción significativa se realizaron los análisis post-hoc con el test de Tukey. p, p-valor; ns, no significativo. (resultados mostrados en Fig.77).

Resumen:

La inoculación del parásito *P. berghei* indujo una disminución en el número de células Iba1⁺ sólo en el CS; y produjo una activación microglial en los tres núcleos de la vía visual analizados. En este caso CIL no resultó eficaz en la atenuación de la activación microglial en los núcleos de relevo de la vía visual, pero, *per se*, produjo alteraciones tanto en el número de células de microglía como en el grado de activación de las mismas.

DISCUSIÓN



1. DISCUSIÓN: MODELO ANIMAL DE SEPSIS

Los resultados obtenidos demuestran que el LPS induce daño neuronal y neuroinflamación tanto en la retina como en los núcleos cerebrales evaluados; y proporciona las primeras evidencias de que la CIL podría ser una posible terapia farmacológica para prevenir y/o revertir estos efectos.

En este modelo animal hemos encontrado una marcada disminución del peso corporal (**Fig.44**) junto con una alteración de la función renal (**Fig.45**) a corto plazo (24 h). En estudios previos se ha observado una pérdida de peso similar a la misma dosis (Semmler *et al.*, 2007; Bian *et al.*, 2013) e incluso a dosis menores (Sachot *et al.*, 2004; Bossù *et al.*, 2012; Norden *et al.*, 2016; Rameshrad *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020). Esta pérdida de peso podría deberse a una reducción en la ingesta de alimentos y/o agua, tal y como ha sido sugerido previamente (Sachot *et al.*, 2004; Rameshrad *et al.*, 2016; Kirk *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019), que podría también estar asociada a la menor actividad motora o letargo inducido por el tratamiento con LPS (Bossù *et al.*, 2012; Skelly *et al.*, 2013; Norden *et al.*, 2016; Kirk *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020). Otros autores han relacionado la pérdida de peso con la diarrea que presentaban sus animales (Huang *et al.*, 2020), que en los nuestros no hemos observado, o incluso con la pérdida de tejido muscular (para revisión ver Holecek, 2012).

Respecto a la función renal, hemos detectado niveles incrementados de creatinina sérica y diuresis, en ausencia de cambios significativos en NUS. Estudios similares describen también un aumento en los niveles de creatinina sérica, así como en los de NUS (Chunzhi *et al.*, 2016; Khajevand-Khazaei *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2023). El aumento de creatinina sérica se relaciona con una alteración de la función renal (Peerapornratana *et al.*, 2019) que también ha sido descrita a nivel histológico tanto en el glomérulo como en el túbulo renal, tras la administración de LPS (Chunzhi *et al.*, 2016; Khajevand-Khazaei *et al.*, 2019; B. Li *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2023). En cuanto a la diuresis existe cierta controversia en la literatura: unos autores indican que aumenta (Olesen *et al.*, 2009); mientras que otros no han visto alteraciones (Lv *et al.*, 2023), o incluso han indicado una disminución (Nakano *et al.*, 2015, 2020). Estas discrepancias podrían relacionarse con los diferentes métodos de cuantificación del volumen urinario y/o con diferencias en el modelo animal empleado. La pérdida de peso que presentan nuestros animales podría, por tanto, estar relacionada con el daño renal (determinado por el aumento de creatinina, así como por el aumento de la diuresis), lo cual en conjunto puede conllevar una ligera deshidratación de los animales que afectaría a su peso.

En el estudio piloto realizado *in vivo* en la retina mediante TCO detectamos un incremento en su grosor, en las zonas más próximas al disco óptico (**Fig.46**), lo cual puede ser indicativo de un posible edema. Mediante la misma técnica, otros investigadores (**Tabla 4**) han descrito un efecto similar tras la administración de dosis menores de LPS bien a corto plazo (24 h), tanto en un modelo similar de administración intraperitoneal (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024) como en otro de administración intravítrea (Wu *et al.*, 2023); o bien a tiempos más largos, con dosis repetidas de administración intravenosa (Kokona *et al.*, 2018; Tsioti *et al.*, 2023). Este edema podría relacionarse con un aumento en el diámetro de los vasos retinianos, que hemos observado en las imágenes de TCO (datos no mostrados), y que coinciden con datos previos del estudio de Kokona y cols. (2018).

Los análisis inmunohistoquímicos de la retina demostraron que el LPS reduce el marcaje de Brn3a de las CGRs, principalmente en el área NI (**Fig.47 y Fig.48**); aumenta los niveles de expresión de GFAP (**Fig.49**); e incrementa el número de células microgliales, promoviendo además la activación microglial hacia un morfotipo horizontal migratorio (**Fig.52 y Fig.54**).

En línea con estos resultados, Rodríguez-Ramírez y cols. (2024) encontraron una disminución del marcador Brn3a en las CGRs similar, aunque a tiempos más largos (desde los 3 días) al empleado en nuestro modelo. Otros estudios en los que el LPS se inyectó en el NO (Aranda *et al.*, 2015) o de forma intravítrea (Livne-Bar *et al.*, 2024) demostraron que también había una reducción de células Brn3a⁺ pero a tiempos muchos más largos (21 días), aunque esta tendencia pareció ser ya evidente a tiempos menores. Es posible que si llevásemos nuestro modelo a tiempos más largos tras el tratamiento con LPS esta pérdida se mantuviese e incluso aumentase, como se ha observado en los estudios antes descritos. La reducción en el marcaje de Brn3a puede estar relacionada con una pérdida de funcionalidad de las CGRs o una pérdida de su viabilidad (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009); de hecho, la alteración funcional podría llegar a producir la muerte de las CGR. Otros autores han demostrado, en modelos de administración de LPS intravítreo, la muerte de las CGR mediante un incremento de células TUNEL⁺ (Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). La pérdida de CGRs de la retina está relacionada con la pérdida parcial o completa de la visión, debido a la disminución de la trasmisión de las señales visuales al cerebro, y podría relacionarse con los déficits visuales descritos en la sepsis (Iwashyna *et al.*, 2012; Boerma, 2017; Łatkowska *et al.*, 2024). En la presente Tesis no podemos discernir si la reducción observada en el número de células Brn3a⁺ sea debido a una disminución de la funcionalidad de las CGR, o a que estas células estén en proceso apoptótico, en cuyo caso, al extender la caracterización de este modelo encontraríamos un número mucho menor.

En relación con las poblaciones macrogliales, astrocitos y células de Müller, se observa un incremento de la expresión de GFAP en toda la retina (**Fig.49**). El análisis detallado en cada una de las 9 áreas sigue demostrando esta activación general macroglial (**Fig.50**), aunque es algo mayor en las regiones nasales y centrales, las más próximas al disco óptico. Otros autores han obtenido resultados similares tras la administración intraperitoneal de la endotoxina a corto (Kurihara *et al.*, 2006) y a largo plazo (Noailles *et al.*, 2018). Al profundizar más en el análisis por capas de la retina observamos, en nuestro modelo, que esta activación macroglial, tanto de las células de Müller como de los astrocitos, se extiende a lo largo de todas las capas de la retina alcanzando incluso la CNE (**Fig.51A**), es decir, llegando hasta la retina externa. Resultados similares se han obtenido en otros modelos de administración sistémica en un periodo corto de tiempo (24-48 h) (Lin *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018); así como en uno que administran una baja dosis de LPS de forma intravítrea (Livne-Bar *et al.*, 2024). La progresión del daño a través de las capas sugiere que, cuando este alcanza la CNE, el nivel de daño es considerablemente elevado (Martínez-López *et al.*, 2024) y las células de Müller se encuentran en un estado de activación muy elevado, lo cual, como luego se discutirá, favorece la activación y migración de las células microgliales.

Tras la administración de LPS, el número de células Iba1⁺ aumentó de forma generalizada en toda la retina (**Fig.52 y Fig.53**), fundamentalmente en la CCG y en la CPI (**Fig.54A**) y se acompañó de una activación microglial determinada por el incremento del morfotipo migratorio HZ (**Fig.54B**). En el análisis detallado de cada área de la retina hemos encontrado un mayor número celular en áreas periNO, como NI y CI, y también en las regiones temporales (**Fig.53**). Un aumento similar en el número de células microgliales ha sido demostrado previamente por diversos autores en modelos tras la administración de LPS (ver **Tabla 4**). Sin embargo, otros autores empleando la administración sistémica de dosis muy bajas de LPS (Jang *et al.*, 2007; Noailles *et al.*, 2018) no han observado aumento del número de células microgliales ni cambios en su patrón de distribución; pero sí han detectado una activación microglial. Esta activación microglial ha sido también demostrada por otros autores en estudios *in vitro*, donde la estimulación con LPS de células microgliales de la retina inducía una morfología ameboide, un incremento en la expresión de Iba1, así como un aumento en la expresión génica y liberación de citoquinas proinflamatorias (Wang *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Esta microgliosis también ha sido demostrada en modelos *in vivo*, bien por la demostración de la adquisición de un morfotipo ameboide (Wang *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2020; Tsioti *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024), por el aumento en el marcaje de Iba1 (Wang *et al.*,

2011; Lin *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018), o por un incremento de los mediadores proinflamatorios en la retina (Kokona *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024). Kokona y cols. (2018), tras la administración intravenosa de dosis repetidas de LPS, observaron, además del aumento del número de células microgliales, una migración de estas a través de las capas hacia la CNE. En nuestro modelo, que es a corto plazo (24 h), detectamos un aumento de las células en las capas más internas de la retina, así como del morfotipo migratorio HZ, el cual migra dentro de la misma capa de la retina en la que se encuentra; mientras que solo encontramos un ligero incremento de células microgliales en la CNE (**Fig.54A**). Es posible que, si prolongásemos nuestro estudio a tiempos más largos sí que pueda incrementarse el número de células de morfotipo VT que migren a través de la retina, hacia las capas más externas. Respecto al estudio por áreas que hemos realizado, otros autores también han encontrado un aumento de células microgliales en zonas similares a las nuestras. Rodríguez-Ramírez y cols. (2024) demostraron que el incremento se apreciaba en la zona cercana al disco óptico. El daño que se ha producido en la retina y que ha generado tanto pérdida de CGR como activación de células macrogliales, podría estar atrayendo a más células de microglía hacia la retina y una de sus vías de entrada es el NO. En la cabeza del NO, en situación fisiológica, hay células microgliales quiescentes próximas a las paredes vasculares de la zona, y está demostrado que en daños severos estas células se activan y adquieren un morfotipo migrante que puede alcanzar la retina (Provis *et al.*, 1996; Reichenbach & Bringmann, 2020). En otros diseños experimentales de administración sistémica, el LPS indujo, al igual que en nuestro estudio, una mayor presencia de células Iba1⁺ en las capas más internas de la retina a las 24h (Lin *et al.*, 2018) y a las 48 h (Ren *et al.*, 2018), pero también describen su presencia en el cuerpo ciliar justificando su entrada a la retina por esta zona (Lin *et al.*, 2018). Es posible que el aumento que hemos encontrado en nuestro modelo en las áreas de la región temporal sea por el mismo motivo. En resumen, en nuestro modelo no podemos descartar, que el aumento de células Iba1⁺ observado sea por proliferación de las presentes en la retina en las capas más internas, por migración celular desde zonas cercanas a la retina como el disco óptico o el margen ciliar; o incluso por la entrada y diferenciación de células inmunes periféricas.

Wang *et al.*, (2011) demostraron la existencia de una comunicación bidireccional entre las células microgliales y las células de Müller retinianas en condiciones patológicas. En este artículo analizaron *in vitro* los efectos del LPS sobre las poblaciones microgliales y las células de Müller. Observaron que las células microgliales tras ser estimuladas con LPS producían una activación de las células de Müller, al liberar citoquinas proinflamatorias (IL-

1 β , IL-6) y nitritos, además de aumentar la expresión de moléculas quimioatrayentes (MCP-1) y adhesivas (ICAM1, VCAM1); lo que facilita la atracción y el desplazamiento de las células microgliales a través de la superficie de las células de Müller. A su vez, las células de Müller activadas inducen una mayor activación de las células de microglía las cuales secretan al medio más mediadores proinflamatorios, además de observarse un aumento de la proliferación microglial. La coactivación Müller-microglía permite, además de aumentar el ambiente proinflamatorio y una mayor activación de ambos tipos celulares, que se produzca la atracción de las células microgliales hacia las células de Müller, y las empleen como un andamio por el que desplazarse tanto dentro de una misma capa (morfofoto HZ) por las prolongaciones laterales de las células de Müller; como entre las distintas capas de la retina (morfofoto VT) empleando para ello las prolongaciones vítrea y ventricular de las células de Müller. En nuestro modelo, al ser a corto plazo (24 h) no hemos observado incremento significativo del morfofoto migratorio VT; sin embargo, si hemos descrito un aumento muy ligero de células en la CNE. El análisis del modelo en estadios posteriores tras la inyección de LPS, permitiría analizar si se produce un mayor aumento del morfofoto VT, así como un avance de las células microgliales de las capas más internas hacia las más externas. Al ser un proceso de coactivación bidireccional, existe controversia en la literatura sobre quien detecta primero el daño en la retina. Algunos autores indican que podría iniciarse por las células de Müller (de Hoz *et al.*, 2016) mientras que otros atribuyen el inicio a las células de microglía (Langmann, 2007; Wang & Wong, 2014). La estrecha relación de las células de Müller con los vasos sanguíneos, así como su localización radial, en todas las capas de la retina, les permitiría detectar rápidamente alteraciones en cualquiera de las áreas y capas de la retina (de Hoz *et al.*, 2016). En nuestro modelo, hemos visto tanto activación macroglial como microglial, por lo que no podemos discernir quien ha detectado primero el daño solo con el estudio morfológico.

El análisis de los posibles mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones que hemos encontrado en la retina, demostró que existe una coexpresión del TLR4 con las células GFAP⁺ y no con las células microgliales (**Fig.56**). La colocalización la hemos observado, principalmente en la CFNO-CCG, sugiriendo su presencia en los astrocitos y/o las prolongaciones vítreas de las células de Müller. Este resultado podría indicar que es la macroglía quien está detectando la endotoxina en primer lugar, pues TLR4 al activarse en las células macrogliales induce el inicio de una respuesta inflamatoria en las mismas (Kumar & Shamsuddin, 2012; He *et al.*, 2013). En los cultivos de células Müller humanas, los diferentes receptores tipo *Toll*, incluido el TLR4, son capaces de detectar diferentes tipos de estímulos nocivos lo que conlleva a su activación y a iniciar una fuerte respuesta

inmune (Kumar & Shamsuddin, 2012). En nuestro modelo, la activación de las células de Müller en la zona de las prolongaciones vítreas a través del TLR4, podría justificar el aumento de expresión de GFAP observado y explicaría que este aumento haya sido en la zona más interna de la retina. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, no hemos encontrado una coexpresión del TLR4 en las células microgliales, pero otros autores si han demostrado en modelos, *in vivo* e *in vitro*, que la administración de LPS activa las células microgliales a través de la vía TLR4/NF- κ B, aumentando la liberación de citoquinas proinflamatorias y la apoptosis celular (Han *et al.*, 2020). Estos autores proponen que la activación del TLR4, que observan en las células endoteliales de la BHR por el LPS, produciría un aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios que conducirían a la activación de las células microgliales, y la expresión de moléculas de adhesión como ICAM1 lo que facilitaría la adhesión y la entrada de células inmunes periféricas a la retina (Tsioti *et al.*, 2023). Sin embargo, este aumento en el ambiente proinflamatorio descrito también podría conllevar a la activación de las células macrogliales, como la descrita en nuestro caso, especialmente cuando son las células macrogliales las que están en estrecho contacto con los vasos sanguíneos al formar parte directa de la BHR.

No podemos establecer si el LPS actúa directa o indirectamente sobre las poblaciones celulares de la retina, pues existe en la literatura cierta controversia sobre si atraviesa o no la BHR y/o la BHE (Varatharaj & Galea, 2017). Lo que sí está aceptado es que su administración produce una disrupción de la BHR (Li *et al.*, 2014; Kokona *et al.*, 2018) o una alteración de su función (Daikohara *et al.*, 2022), lo que permitiría la entrada tanto de células inmunes periféricas como de mediadores inflamatorios sistémicos; esto provocaría la activación de las células gliales y el aumento en retina de citoquinas proinflamatorias (Li *et al.*, 2014; Kokona *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024). A su vez, la activación de las células gliales contribuye al aumento de la permeabilidad de la BHR, ya que fundamentalmente los astrocitos y las células de Müller liberan grandes cantidades de VEGF en condiciones patológicas, que al aumentar la permeabilidad vascular incrementarían el reclutamiento e infiltración de células inmunes periféricas (revisar: de Hoz *et al.*, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2020). Por otra parte, la activación de las células microgliales produce la liberación de IL-1 β , TNF α , EROs y nitritos lo que también contribuiría a aumentar la permeabilidad de la barrera, pues disminuye la expresión de proteínas de unión, y produciría la muerte de los pericitos de la misma (Rathnasamy *et al.*, 2019).

Otras de las consecuencias de la administración del LPS es la formación de edema debido a alteraciones vasculares, tal y como hemos observado en nuestro estudio, y ha

sido previamente descrito por otros autores (Kokona *et al.*, 2018; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024). La formación de edema en modelos de administración de LPS también ha sido relacionada con la activación y proliferación microglial, en especial en zonas próximas a vasos sanguíneos (Kokona *et al.*, 2018; Tsioti *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2024). De hecho, la inhibición de la activación microglial, o una reducción en su número son capaces de producir una mejoría de las alteraciones vasculares descritas, lo que reduciría el grosor de la retina y, por ende, el edema (Kokona *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2023; Rodríguez -Ramírez *et al.*, 2024). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, donde hemos observado un incremento en la activación glial fundamentalmente en las áreas adyacentes al NO, lo cual podría estar debilitando la BHR e inducir la formación del edema que demostramos con la TCO. Además, es precisamente en estas zonas periNO, donde observamos la mayor afectación a las CGRs, posiblemente causado por la excesiva activación glial y la ruptura de la BHR.

En este punto es importante recordar que en nuestro modelo hemos observado un daño neuronal debido a la reducción del número de células Brn3a⁺, que puede relacionarse, como ya hemos discutido, con una pérdida de funcionalidad o una pérdida de viabilidad de las mismas. Las alteraciones neuronales y gliales observadas hicieron necesaria la búsqueda del posible mecanismo molecular subyacente. Considerando los estudios previos del grupo, decidimos analizar si el inflammasoma mediado por NLRP3 se encontraba implicado. En los animales tratados con LPS demostramos una coexpresión del receptor NLRP3 en las CGRs (**Fig.55**). Esta vía del inflammasoma mediado por NLRP3 ha sido propuesta cómo posible vía de neurodegeneración de las CGRs (Zhang *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022), como se ha observado en modelos de isquemia-reperfusión (Guan *et al.*, 2020), retinopatía diabética (Li *et al.*, 2020; McCurry *et al.*, 2024) o glaucoma (Pronin *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). En el estudio de Rodríguez-Ramírez y cols. (2024), aunque no analizaron este receptor, sí describieron que su inhibición evitaba notablemente la pérdida de CGRs. NLRP3 se encuentra presente en situación basal en diversas áreas de la retina, como en el epitelio pigmentario, las células de macroglía y las células de microglía (Pronin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Coyle *et al.*, 2021; McCurry *et al.*, 2024), pero hasta donde sabemos, no han sido descritas en las CGR. El hecho que, en nuestro estudio, tras la administración de LPS las CGRs aumenten la expresión de NLRP3 respecto a los controles (**Fig.A1, Anexo I**) podría ser indicativo de una activación de esta vía del inflammasoma, posiblemente tanto por la acción directa de la toxina como por la llegada de la inflamación sistémica al SNC. En cualquiera de las dos situaciones podrían activarse, en un primer lugar, las células gliales debido al aumento de la expresión de TLR4 respecto a

los controles (**Fig.A1, Anexo I**), quienes, a su vez, activarían la vía del inflammasoma en las CGRs. Si esta hipótesis fuera cierta, la disminución en el marcaje de Brn3a⁺ observada en los animales de los grupos tratados con LPS podría ser indicativo de una pérdida de funcionalidad que, en último término, podría incluso llevar a la muerte piroptótica de las CGRs.

Los resultados obtenidos no sólo son comparables con modelos donde han empleado el LPS, sino que también coinciden con numerosos estudios en modelos animales centrados en diversas retinopatías: glaucoma (Fernández-Albarral *et al.*, 2021a; Martínez-López *et al.*, 2024), retinopatía diabética (Lobanovskaya *et al.*, 2018; Gorbatyuk *et al.*, 2022) y de retinitis pigmentosa (García-Ayuso *et al.*, 2015). Esto sugiere que nuestro modelo podría ser una herramienta valiosa para la investigación de mecanismos inflamatorios generales asociados tanto con patologías inducidas por LPS como con patologías que cursen con activación glial. Además, de ser útil para la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos que permitan prevenir o reducir la gliosis reactiva observada en estas patologías retinianas, ya que la inhibición de esta situación inflamatoria previene la apoptosis neuronal y evita la pérdida de las funciones homeostáticas de las células gliales (Ganesh & Chintala, 2011).

Los efectos de la administración sistémica de LPS sobre los núcleos de la vía visual apenas han sido analizados en la literatura. Sin embargo, han sido muchos los estudios que han analizado sus efectos en otras regiones cerebrales (ver **Tabla 3**). En los núcleos de relevo de la vía visual analizados en el presente trabajo, la administración de LPS indujo una marcada reducción del marcador NeuN en los tres núcleos (**Fig.57**); un aumento de la expresión de GFAP en el CS y en la V1 (**Fig.59**); y una activación de las células microgliales, evidenciada por el cambio de morfotipo, en todos los núcleos, en especial en la V1 (**Fig.61**), sin afectar al número de células (**Fig.60**).

La disminución de la expresión de NeuN en los tres núcleos analizados, concuerda con los observados en otras áreas. En el estudio de Semmler y cols. (2008), Con el mismo modelo, encontraron una disminución del marcaje de NeuN en la corteza y el hipocampo; pero no en el tálamo o el cerebelo; también en el en el hipocampo y en la corteza prefrontal, a largo plazo se observa una pérdida de neuronas, que no se observa en la corteza parietal (Semmler *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2019); la administración de dosis repetidas induce a largo una disminución de neuronas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc), pero no en el hipocampo o en la corteza motora (Milde *et al.*, 2021). Los estudios anteriores, demuestran la variabilidad de la afectación neuronal por la administración de LPS en función de la región analizada, lo que demuestra que, aunque LPS ejerce un daño en el SNC, hay una

distinta vulnerabilidad de las regiones cerebrales al mismo. En nuestro estudio, aunque observamos pérdida de marcaje en los tres núcleos estudiados, no están afectados por igual, pues la V1 es la que presenta algo más de pérdida, pudiendo ser más vulnerable a los efectos de la endotoxina que las otras. Aunque no podemos descartar que, dado que a V1 llegan aferencias procedentes tanto de CS como del NGLd, los efectos que LPS ha producido en los anteriores núcleos podrían sumarse y la disminución que observamos en V1 en la expresión de NeuN se deba, tanto al efecto del tratamiento de forma directa sobre ella, como a recibir menos aferencias de los otros núcleos de relevo. De manera similar a lo discutido respecto al marcaje de Brn3a, no podemos dilucidar si la pérdida de expresión de NeuN está relacionada con una pérdida de su funcionalidad o con la muerte neuronal. Aunque, en muchas patologías la pérdida completa del marcaje de NeuN o la disminución en su expresión han sido tradicionalmente asociadas con la muerte celular, estudios más recientes sugieren que esta relación no es necesariamente directa. En estos trabajos, se ha planteado que la disminución o ausencia del marcaje de NeuN puede reflejar una pérdida temporal de funcionalidad neuronal sin comprometer la viabilidad celular (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; Duan *et al.*, 2016).

Al igual que en la retina, tras evaluar el estado de las neuronas hemos analizado los cambios producidos en las poblaciones gliales, ya que se ha demostrado que, entre las alteraciones producidas durante la sepsis en el resto del SNC, uno de los más característicos es la activación de las células microgliales y los astrocitos (Hoogland *et al.*, 2015; Shulyatnikova & Verkhatsky, 2020). En nuestro modelo, la administración de LPS indujo un marcado aumento de la expresión de GFAP en el CS y en la V1, sin observar cambios en el NGLd (**Fig.59**). Otros autores con el mismo modelo demuestran un aumento de células GFAP⁺ a las 24 h, pero no antes, en la corteza, el hipocampo o el estriado (Semmler *et al.*, 2005); e incluso hay un trabajo que, con dosis menores demuestran un aumento de la expresión del marcador a las 24 h en diferentes áreas cerebrales (Banks *et al.*, 2015; Brandi *et al.*, 2022). Aunque existe algo de controversia en la literatura, pues otros estudios realizados a las 24 h de la administración de LPS con dosis similares a las nuestras, no han evidenciado el aumento de células GFAP⁺ en el cerebelo o el mesencéfalo (Semmler *et al.*, 2005), ni en el tálamo, la corteza, el hipocampo o el cerebelo (Semmler *et al.*, 2008). Lo mismo ocurre en aquellos trabajos que utilizan dosis menores, no hay aumento del marcaje de GFAP en el hipocampo, la corteza (Norden *et al.*, 2016), la región talámica o la corteza visual (Brandi *et al.*, 2022). Respecto a la diferente afectación macrogliar en los núcleos que hemos analizado, los resultados son coincidentes de forma parcial con los de Brandi y cols. (2022): no se observan cambios en el marcaje de un núcleo

talámico, el NGLd; pero ellos no observan el aumento en V1 que nosotros sí observamos. En resumen, en los diferentes modelos animales de tratamiento con LPS, existen discrepancias sobre la activación de los astrocitos cuando se analiza mediante la expresión de GFAP, mostrando nuevamente una vulnerabilidad diferencial a la endotoxina, lo que coincide también con nuestros hallazgos. Sin embargo, no podemos descartar que exista una ligera activación macroglial, pero que aún no es posible detectarla mediante un aumento en el marcaje con GFAP. Por ejemplo, en el estudio de Norden y cols. (2016) a pesar de no observar un incremento en el marcaje de GFAP sí que se observó un incremento en la expresión génica del marcador a las 24 h; además en los astrocitos aislados de los animales se observó una mayor expresión de IL-6 y IL-1 β a las 2 h y un aumento de IL-1 β , TNF α y MCP-1 a las 24 h, indicando la activación de este grupo celular. Nuestros resultados han demostrado una afectación neuronal en los tres núcleos analizados, pero sólo activación glial detectable con el marcador empleado en CS y V1, por lo que es posible que en el NGLd aún estemos en niveles bajos de activación macroglial y que en tiempos posteriores pudiera ya ser evidente, al ir progresando el daño tanto en retina como en CS de los cuales recibe aferencias.

En el caso de las células microgliales de la vía visual, hemos evaluado dos parámetros: el número total de células y el estado de activación mediante el estudio de los diferentes morfotipos. La administración de LPS prácticamente no indujo cambios en la densidad celular (**Fig.60**), pero provocó una activación microglial, incrementando el porcentaje de los morfotipos reactivos en todas las áreas (**Fig.61**), aunque de manera más marcada en la V1. De nuevo encontramos discrepancias en la literatura en relación al incremento de células microgliales: algunos autores han encontrado, a las 24 h del tratamiento con LPS, un mayor número de células microgliales en cerebelo a la misma dosis que nuestro modelo (Semmler *et al.*, 2005), o incluso a dosis menores en regiones tales como el tálamo y la corteza visual (Brandi *et al.*, 2022; Jung *et al.*, 2022); sin embargo, estos mismo autores no observan cambios en el número de células de microglía en otras áreas cerebrales (corteza, hipocampo y estriado; Semmler *et al.*, 2005). En nuestro modelo, aunque no hayamos detectado un aumento en la población microglial, sí que demostramos su activación al analizar el morfotipo en los tres núcleos visuales (**Fig.61**): hay una disminución en los morfotipos basales (morfotipos I-II) y un incremento de los reactivos (morfotipos III-IV-V), sobre todo en la V1. Nuestros hallazgos son consistentes con múltiples estudios donde han observado un cambio de un morfotipo ramificado hacia un morfotipo ameboide tras la administración de LPS (Qin *et al.*, 2007; Masson *et al.*, 2015; Norden *et al.*, 2016; Brandi *et al.*, 2022). La activación glial puede estar determinada, entre otros, por la hiperplasia y/o la

hipertrofia o modificación morfológica, en nuestro caso, aunque no haya aumento del número de células, si lo hay de su grado de activación, lo cual es indicativo también de un mayor estado inflamatorio, que acompaña a las alteraciones neuronales descritas. V1 es de nuevo el área cerebral más afectada y, como se ha discutido antes, es posible que se deba al daño directo por LPS y/o por la inflamación sistémica que el mismo produce y cuyos mediadores pueden llegar vía el circulatorio al SNC; pero también a que recibe aferencias del CS y del NGLd entre otros, lo cual hace que las alteraciones en esas estructuras también afecten a lo que recibe V1. Estos cambios morfológicos demuestran una activación microglial en respuesta al LPS y, como otros autores han descrito, va acompañada del aumento de mediadores proinflamatorios y del estrés oxidativo (ver **Tabla 3**).

La endotoxina afecta la BHE (para revisión ver: Danielski *et al.*, 2018; Catarina *et al.*, 2021), pues se ha demostrado que la administración sistémica de LPS es capaz de dañar las proteínas de unión (Huang *et al.*, 2020) y aumentar la permeabilidad de la BHE (Banks *et al.*, 2015; Towner *et al.*, 2018). De nuevo, no podemos descartar que la acción del LPS sea directa sobre las poblaciones celulares analizadas en los distintos núcleos de relevo de la vía visual; o que la inflamación periférica inducida y la alteración de la BHE provoquen la extravasación del LPS y de los moduladores inflamatorios periféricos que ha producido. Al igual que discutimos en retina, la activación macro y microglial que hemos demostrado va a potenciar aún más el estado inflamatorio contribuyendo a aumentar el daño local. Este punto nos lleva de nuevo a plantear la necesidad de analizar las vías moleculares específicas implicadas en los efectos observados en los núcleos de la vía visual tras la administración de LPS. Aunque aún no se ha completado el mismo, dado que se han observado efectos similares a los descritos en la retina, suponemos que el inflammasoma mediado por NLRP3 podría también estar involucrado.

La pérdida de visión puede producirse por muchas etiologías diferentes (traumatismos, tumores, problemas vasculares, inflamación...) que afecten a alguna de las estructuras implicadas en la vía visual, desde la retina hasta la corteza cerebral (Sefton *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2021; Augustine *et al.*, 2023). Modelos animales de glaucoma (Sapienza *et al.*, 2016) o de traumatismo encefálico (Evanson *et al.*, 2018; Atapour *et al.*, 2021; Frankowski *et al.*, 2021), han demostrado que el daño neuronal y la activación macro- y microglial producida en algún punto de la vía visual se puede propagar anterógrada o retrógradamente a través de esta. Un ejemplo claro de esta traslación del daño se observa en el estudio de Aranda y cols. (2015) dónde la administración directa de LPS en el NO, indujo una rápida activación de las células microgliales (24 h) y tardía de las macrogliales (21 días),

induciendo finalmente una pérdida de neuronas Brn3a⁺ en la retina a los 21 días y alteraciones en el CS y el NGLd a los 7 días. Estos trabajos ponen de manifiesto que cualquier alteración en alguno de los puntos de la vía visual se puede trasladar anterógrada o retrógradamente. Por lo tanto, nuestros efectos pueden estar causados no sólo por la inflamación periférica o el efecto directo del LPS sobre nuestras poblaciones de estudio; sino que el daño producido en la retina o en los núcleos cerebrales se esté transmitiendo a lo largo de la vía visual potenciando el daño observado.

2. DISCUSIÓN: MODELO ANIMAL DE MALARIA

Los resultados obtenidos han demostrado que la inoculación del parásito *P. berghei* induce daño neuronal y activación glial a lo largo de la vía visual, e incrementa las evidencias de que la CIL sea eficaz en el tratamiento de las alteraciones producidas.

En el modelo animal de malaria realizado mediante la inoculación del parásito *P. berghei* ANKA en ratones C57BL6J hembra, hemos observado un incremento gradual de la parasitemia hasta conseguir aproximadamente un 9% el día 6 postinfección; una marcada reducción en la concentración de hemoglobina en sangre y un ligero aumento de los niveles de creatinina sérica (**Fig.62**). La evolución de la parasitemia con una dosis de 10⁶ GRI demuestra que se produce un pequeño aumento el día 4 (alrededor del 2,5%), que incrementa hasta alcanzar unos valores del 9% el día 6 (**Fig.62A**). Estudios previos en modelos murinos con la misma dosis y especie de parásito (Zhu *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017; Paquet-Durand *et al.*, 2019; Mukherjee *et al.*, 2022), obtienen niveles de parasitemia similares o incluso algo menores a día 5-7 post infección. Aunque la parasitemia obtenida con el modelo no haya sido extremadamente elevada, modelos que han empleado la misma cepa de parásito y la misma o menor dosis de inoculación, han observado síntomas característicos de la enfermedad, como ataxia, convulsiones parálisis y/o coma, durante el mismo periodo de evaluación (Medana *et al.*, 1996, 1997b, 2000; Clark *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2017; Strangward *et al.*, 2017), junto con un menor valor en la escala rápida de coma y comportamiento murino (Carroll *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2013; Strangward *et al.*, 2018; Oelschlegel *et al.*, 2024); también has descrito alteraciones similares a las observadas en pacientes con MC, como edema y hemorragias (Strangward *et al.*, 2017, 2018); y con RM, cómo zonas de blanqueamiento, hemorragias, edema y dilatación vascular (Neill *et al.*, 1993; Paquet-Durand *et al.*, 2019). Estos datos sugieren que, incluso con una parasitemia no excesivamente alta, la inoculación de la cepa *P. berghei* ANKA es un modelo útil para el estudio de las complicaciones en el SNC asociadas a la MC y la RM. Además de la

parasitemia es necesario evaluar el nivel de afectación a nivel sanguíneo, con el fin de asegurar la presencia de alteraciones asociadas a la inoculación del parásito. En este sentido encontramos una marcada reducción en la concentración de hemoglobina en sangre 6 días tras la inoculación de *P. berghei* (**Fig.62B**); y observamos una correlación lineal inversa entre estos valores y los niveles de parasitemia a día 6 (**Fig.62C**), lo cual indica que a mayor concentración del parásito menor concentración de Hb, y, por tanto, mayor severidad de la patología. Otros autores han demostrado la disminución de esta proteína con carga del parásito similar a la nuestra (Lopes *et al.*, 2016; Lakkavaram *et al.*, 2020; Mogaka *et al.*, 2023); sin embargo, hay cierta controversia al respecto ya que otros estudios no han encontrado cambios en los niveles de Hb o en el número de glóbulos rojos a pesar de haber observado un aumento en la parasitemia (Zhu *et al.*, 2015).

Nuestros datos muestran también una afectación renal, en los animales inoculados con el parásito (grupo Malaria) se observó un incremento en los niveles de creatinina sérica (**Fig.62D**). Otros autores, también han observado un incremento de la creatinina sérica tras la administración de *P. berghei* ANKA a la misma concentración que la aquí empleada (Abreu *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Mogaka *et al.*, 2023), demostrando la presencia de FRA asociado a la malaria (Katsoulis *et al.*, 2021). En nuestro estudio el aumento de creatinina observado no ha sido tan pronunciado como en otros estudios (Abreu *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Mogaka *et al.*, 2023), ya que, aunque empleamos la misma dosis, y los daños son evaluados a tiempos similares, los niveles de parasitemia alcanzados fueron menores que los obtenidos en dichos estudios (15-20%). Por lo que, aunque empezamos a observar efectos a nivel sanguíneo, es posible que se necesite una mayor carga parasitaria para inducir un daño renal más marcado.

Existen varios estudios que valoran las alteraciones en la retina mediante técnicas de imagen y de funcionalidad *in vivo*, y otros que analizan los efectos sobre la circulación y la oclusión de los vasos sanguíneos (ver **Tabla 9**); sin embargo, son pocos los estudios que hayan caracterizado las alteraciones en las CGRs y en las poblaciones gliales. En la retina de los animales del grupo Malaria, pudimos observar una disminución del marcador Brn3a en la retina completa, principalmente en el área CI (**Fig.63 y Fig.64**); un aumento de la expresión de GFAP en casi todas las áreas (**Fig.65 y Fig.66**); y un aumento general del número de células microgliales, siendo más marcado en la región central (**Fig.68 y Fig.69**); además, de inducir su activación, demostrada por el aumento del morfotipo migratorio VT (**Fig.70B**).

La disminución generalizada del marcador Brn3a en las CGRs (**Fig.63**) puede ser indicativa tanto de una menor funcionalidad celular como de muerte neuronal. En un

trabajo realizado en un modelo similar al nuestro, observaron un incremento de células TUNEL⁺ en la CCG, en la CNI y en la CNE (Paquet-Durand *et al.*, 2019) que sugería la presencia de un proceso apoptótico en las CGRs, y en otras poblaciones celulares retinianas. En nuestro estudio, es posible que mediante el uso de algún marcador de muerte celular podamos discriminar si a nuestras CGRs les ocurre lo mismo y el parásito induce su destrucción, o si se trata, por el contrario, de un estado de “disfuncionalidad” transitoria. Al igual que en el modelo de sepsis, en este estudio no todas las áreas de la retina mostraron el mismo grado de afectación. En este caso, en el modelo animal de malaria, la mayor pérdida de CGRs-Brn3a⁺ se concentró en el área CI (**Fig.64**), lo que podría estar relacionado con una mayor acumulación de GRI, ya que se ha descrito una mayor afectación en las zonas donde se acumula el parásito (Paquet-Durand *et al.*, 2019). Además, el área CI se localiza en las proximidades del disco óptico, zona de mayor irrigación de la retina, a través de la cual se produciría la entrada del patógeno, de sus productos bioactivos o de los mediadores inflamatorios periféricos.

Al igual que nosotros, otros autores con el mismo modelo han evidenciado una alteración de la distribución de los astrocitos y una activación macroglial (Medana *et al.*, 1996; Paquet-Durand *et al.*, 2019). En el análisis detallado por áreas (**Fig.66**), no hemos detectado grandes diferencias entre ellas, por lo que no podemos establecer un patrón de daño espacial específico; mientras que, en el estudio por capas, el aumento de expresión de GFAP fue más pronunciado en la CCG y en las capas más externas CNE-SE (**Fig.67**). Este aumento de expresión en la CCG sugiere una activación tanto astrocítica como un incremento de marcaje de las prolongaciones vítreas de las células de Müller; mientras que el aumento en el resto de las capas se debe a la activación de las células de Müller, como puede observarse en las microfotografías tomadas (**Fig.65**). Es importante destacar la afectación de las capas más externas de la retina llegando hasta el SE, lo cual no se observó en el modelo de sepsis. Como ya se discutió con anterioridad, la afectación de la activación macroglial, hasta capas de la retina externa, es indicativo de un mayor daño, por lo que este modelo parece más agresivo que el de LPS. La activación macroglial que hemos obtenido en las capas más externas podría estar vinculada con alteraciones en los fotorreceptores, lo cual estaría en línea con los resultados obtenidos por Paquet-Durand y cols. (2019), quienes observaron un aumento de células en estado apoptótico en la CNE, sugiriendo la muerte de los fotorreceptores.

En cuanto a las células microgliales, hemos detectado un incremento del número de células Iba1⁺ en toda la retina (**Fig.68**), en especial en la región central (**Fig.69**). Los resultados son coincidentes con los de Medana y cols. (1997a y 2000), quienes observaron

un aumento de células microgliales a los 7 días de la inoculación del parásito, principalmente alrededor del disco óptico; junto con una activación microglial evidenciada por el aumento del morfotipo ameboide. El aumento de células microgliales en la región central podría explicarse por una entrada de las mismas a través del NO. Además, al igual que en el modelo de sepsis, se ha observado un marcado incremento del número de células en las capas más internas de la retina (CCG-CPI; **Fig.70A**), lo cual podría explicarse o bien por la entrada directa de estas células desde el margen ciliar, o bien por su entrada a través del humor vítreo estableciéndose en las capas más internas.

Nuestros resultados, también han mostrado una activación microglial caracterizada por la adquisición del morfotipo migratorio VT (**Fig.70B**), migratorio entre diversas capas de la retina, posiblemente relacionado con su interacción con las células de Müller (Wang *et al.*, 2011) y su migración hacia capas más externas, explicando así el incremento en la CNI y en la CPE. En este modelo se observa esta activación del morfotipo VT, migratorio entre capas, probablemente por la duración del modelo, que es más prologando; mientras que en el modelo de sepsis solo se observó el incremento del morfotipo HZ, migratorio dentro de una misma capa, debido, posiblemente, a que se trata de un modelo más agudo (24h), de corta duración.

La gran activación macro y microglial, indica un estado inflamatorio que afecta desde la retina interna hasta la externa; de nuevo apoya la existencia de la interacción directa entre las células de Müller y las células de microglía, tanto para retroalimentar de forma positiva la activación de ambas, como para favorecer la migración de las células microgliales sobre el andamiaje retiniano que constituyen las células de Müller. Es este caso, en el modelo de malaria, la migración de las células microgliales ocurriría, a lo largo de toda la longitud de la célula de Müller, desde la prolongación vítrea hacia la ventricular, tal y como demuestra la presencia de microglía de morfotipo VT. En este caso, al evaluar las alteraciones gliales en un único punto temporal, no hemos podido discernir qué población es la que primero detecta el daño en la retina. Sin embargo, en nuestro estudio, hemos observado en las células GFAP⁺ (**Fig.72**) un aumento en la expresión de TLR4 respecto a los controles (**Fig.A1, Anexo I**), lo que podría indicar que fuera la macroglía quien detecta al parásito, o alguno de sus subproductos, activándose en primer lugar. Otros autores incluso han observado la presencia del parásito intracelularmente en las células de Müller, proponiendo que fueran éstas las que introdujeran el parásito en la retina e iniciasen el proceso de inflamación (Paquet-Durand *et al.*, 2019). Por otro lado, nuestros resultados de inmunofluorescencia revelaron también un aumento en la expresión del complejo inflamatorio NLRP3 en las células Brn3a⁺ (**Fig.71**) respecto a los controles

(Fig.A1, Anexo I); resultado similar al observado en el modelo de sepsis. Estos datos sugieren, nuevamente, la hipótesis que planteamos, que podrían ser las células microgliales las que respondan al daño, bien al parásito o bien a la inflamación periférica inducida por el parásito, a través de la vía del TLR4; aumentando así el ambiente inflamatorio en la retina, activando tanto a las células microgliales como la vía del inflamasoma mediado por NLRP3 en las CGRs, mecanismo que podría llevar a la muerte de estas células, quizás por un proceso de piroptosis, aunque son aún necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

La activación astrocítica y de las células de Müller (Medana *et al.*, 1996; Paquet-Durand *et al.*, 2019) conlleva la disrupción de la BHR, produciendo edema y hemorragias en el SNC (Neill *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1996; Paquet-Durand *et al.*, 2019). En estos modelos, además, se ha observado un aumento en la adhesión de monocitos a los vasos retinianos y el aumento de expresión de moléculas de adhesión como VCAM1 e ICAM1 (Ma *et al.*, 1996). En pacientes también se ha descrito una activación glial, alteración de la BHR, y una alteración de las moléculas de adhesión (Barrera *et al.*, 2018). La reducción del flujo sanguíneo y la consecuente hipoxia producen alteraciones en la retina causando inflamación, aumento del estrés oxidativo y la muerte celular de los tipos neuronales retinianos, resultando en deterioro visual y ceguera (revisar Osborne *et al.*, 2004). En este sentido, son varios los modelos que han relacionado la hipoxia con el daño neuronal o la pérdida de funcionalidad. En los modelos murinos de *P. berghei* se ha observado una oclusión mecánica de los capilares retinianos por células sanguíneas parasitadas y no parasitadas (Neill *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1996; Paquet-Durand *et al.*, 2019); así como la presencia del parásito dentro de las propias capas de la retina (Paquet-Durand *et al.*, 2019). En el modelo desarrollado por Paquet-Durand y cols. (2019) observaron procesos de neurodegeneración principalmente en las áreas periféricas, en las zonas donde se vio una mayor oclusión vascular, esto es, en las regiones que habían sufrido hipoxia. En el estudio de Oliveira y cols. (2017), estos procesos de neurodegeneración se relacionaron con las zonas en las que se encontró un deterioro electrofisiológico en la retina, junto con un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en cuanto a la activación microglial podrían implicar una disrupción de la BHR, lo cual explicarían el gran daño inflamatorio detectado, y la hipoxia podría ser otro de los factores implicados en el daño, que también contribuiría al daño neuronal encontrado.

Son escasos los modelos que analizan los efectos de la administración del parásito en la retina, siendo el presente trabajo, hasta donde sabemos, uno de los primeros en analizar las consecuencias que tiene en las distintas poblaciones celulares retinianas con tanta

profundidad. Es necesario seguir investigando más a fondo la retina en modelos de malaria, ya que, se ha observado que los síntomas en la retina (Neill *et al.*, 1993; Paquet-Durand *et al.*, 2019) y la activación glial (Medana *et al.*, 1996, 1997a) aparecen incluso antes que se desarrolle la MC. Si se considera la retina como una ventana al resto del SNC (López-Cuenca *et al.*, 2021), su análisis, mediante técnicas no invasivas como la TCO, podría emplearse como un biomarcador temprano de la malaria; de esta forma se podría detectar la presencia del daño en etapas muy tempranas, e iniciar el tratamiento adecuado en los pacientes antes de que aparezca una sintomatología clínica más grave que podría conllevar secuelas permanentes, o incluso la muerte.

Son escasos los estudios que han analizado los efectos de la malaria en la vía visual. Saggiu y cols. (2011) demostraron, mediante resonancia magnética, en un modelo animal de malaria similar al nuestro (inoculación de *P. berghei*, 10⁶ GRI i.p.), una gran afectación de diferentes componentes del sistema visual, como los nervios y tractos ópticos, el quiasma óptico y la región talámica; estas alteraciones podrían ser la causa del deterioro visual causado por el parásito, como la pérdida de agudeza visual previamente descrita (Lackner *et al.*, 2006). Nuestro estudio es uno de los primeros que profundiza en la afectación neuronal y glial en algunos de los núcleos de relevo principales de la vía visual, y, hemos demostrado que la administración del parásito (*P. berghei*, 10⁶ GRI i.p.), en tan solo 6 días, induce una marcada alteración de las poblaciones analizadas, produciendo una disminución del marcador NeuN (**Fig.73**), un incremento de la expresión de GFAP (**Fig.75**), y un aumento del porcentaje de morfotipos microgliales reactivos en los tres núcleos de estudio (**Fig.77**). Es importante destacar que, al igual que en el modelo de sepsis, los núcleos de relevo de la vía visual han sido escasamente analizados por otros investigadores (ver **Tabla 8**).

La disminución de la expresión de NeuN, ha sido descrita por otros investigadores en otras áreas del SNC. La inoculación de dosis similares de la misma cepa del parásito provoca una reducción en el número total de células NeuN en la corteza (Ataide *et al.*, 2020); en el cerebelo y en la corteza, aunque con niveles algo mayores de parasitemia (15%) (Sarkar *et al.*, 2017), así como una disminución de neuronas en la corteza y el estriado, junto con una alteración de su morfología, incluso a dosis menores (Clark y cols. (2005) (ver **Tabla 8**). La existencia de un daño neuronal, por tanto, parece ser común a las distintas áreas del SNC y podría estar relacionada con la afectación funcional descrita en la MC. De hecho, esta muerte neuronal se relaciona con el deterioro neuromotor descrito, la reducción de la locomoción, la pérdida de reflejos, la aparición de ataxia, convulsiones y coma (Clark *et al.*, 2005; Ataide *et al.*, 2020). En esta línea, nuestros resultados sobre las

pérdidas neuronales detectadas en toda la vía visual analizarían proporcionarían un mecanismo explicativo al deterioro visual descrito en algunos casos de malaria.

Respecto a la activación astrocítica hemos detectado un incremento del marcaje de GFAP en los tres núcleos de relevo de la vía visual analizados (**Fig.75**). Son escasos los trabajos que han estudiado la activación macroglial en los diferentes núcleos de la vía visual. Sin embargo, en otros estudios sí han analizado otras áreas del SNC en modelos animales similares. Estos autores han descrito un aumento en la expresión de GFAP, en la corteza, el hipocampo y el cerebelo, entre otras regiones, junto con una hipertrofia en estas células, sugiriendo una activación astrocitaria, así como una mayor expresión de marcadores proinflamatorios, como TNF α y IL-1 β , lo que contribuiría a incrementar la inflamación local (Medana *et al.* 1997b; Sarkar *et al.*, 2017; Oelschlegel *et al.*, 2024).

En cuanto a las células microgliales, en nuestro modelo de malaria, no hemos detectado grandes cambios en su número, salvo una ligera disminución en el CS (**Fig.76**); aunque sí se ha descrito un incremento en la presencia de morfotipos reactivos, fundamentalmente III y IV, en los tres núcleos analizados a expensas de una reducción en el porcentaje de microglia basal o residente (**Fig.77**); en este modelo no hemos observado la presencia de microglia de morfotipo V, considerado el más activo. Es posible que, en este modelo, nos encontremos aún en etapas iniciales de la activación microglial, de forma que sólo se observe la modificación de morfotipos, pero aún no exista una proliferación celular suficiente que nos permita ver un aumento en el número de células microgliales. En un estudio previo, con un modelo similar, encontraron un incremento en la expresión de genes relacionados con la división y proliferación celular (d5), y un incremento posterior en el número de células microgliales (d7) (Capuccini *et al.*, 2016). La discrepancia con nuestros resultados podría deberse al nivel de parasitemia alcanzado (15-20%, frente a nuestro 9%), a pesar de que la carga de parásito inoculado por esos autores fue algo menor. Otros autores con dosis similares (Medana *et al.*, 1997b) o ligeramente menores (Desruisseaux *et al.*, 2008) del parásito han encontrado una marcada activación microglial en diferentes regiones cerebrales evidenciada en algunos casos por el aumento del tamaño de las mismas, hipertrofia, y en otros por el aumento de expresión de marcadores de activación (Capuccini *et al.*, 2016; Sarkar *et al.*, 2017; Oelschlegel *et al.*, 2024). Esta activación microglial produce un aumento de la expresión de mediadores proinflamatorios por estas células, que son posteriormente liberados al medio e incrementan el estado proinflamatorio local (Medana *et al.*, 1997b; Capuccini *et al.*, 2016).

La inoculación del parásito *P. berghei*, a concentraciones similares a la empleada en nuestro estudio (Ataide *et al.*, 2020; Oelschlegel *et al.*, 2024) o a concentraciones menores

(Strangward *et al.*, 2017, 2018) induce una acumulación temprana de GRI que precede al desarrollo de los síntomas característicos de la MC; y que conlleva el desarrollo de una hipoxia cerebral dependiente de la carga parasitaria (Park *et al.*, 2019). En este contexto, Oelschlegel y cols. (2024) observaron una acumulación de los GRI en las venas de drenaje del cerebro, que redujo el flujo sanguíneo cerebral, y provocó la posterior ruptura de la BHE, que se vio acompañada de edema y hemorragias en la corteza visual y el CS, entre otras regiones. Otros autores también han descrito alteraciones en la BHE e incremento del edema cerebral, asociado a un parénquima desorganizado, oclusión capilar, áreas hemorrágicas e infiltración celular (Ataide *et al.*, 2020); o, con dosis menores, una oclusión mecánica de los capilares por GRI y un incremento de células inmunes periféricas en la microvasculatura cerebral (Strangward *et al.*, 2017, 2018). En los diferentes modelos de malaria la disrupción de la BHE parece ser un factor común, por lo que, en nuestro modelo, sería esperable observar una ruptura similar, que, junto con la marcada activación glial observada, contribuiría aún más a generar un entorno inflamatorio, que podría exacerbar el daño neuronal en los núcleos analizados.

Las citoquinas y quimioquinas pro y antiinflamatorias juegan un papel muy importante en el reclutamiento y adhesión de células inmunes durante la MC que conllevan a un peor pronóstico de la enfermedad (revisar: Idro *et al.*, 2010; Dunst *et al.*, 2017). En varios modelos la inoculación del parásito, al igual que ocurría en el modelo de sepsis, produce un aumento de las citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF α), y un aumento de la permeabilidad de la BHE; lo que se ha relacionado con la aparición de los síntomas característicos de la MC (parálisis y coma) y la posterior muerte del animal (Miranda *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2015; Mukherjee *et al.*, 2022). Además, en estos estudios se ha observado una desregulación de citoquinas, aumento de las proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF α) y una reducción de las reguladoras (IL-2 e IL-10) en el hipocampo y la corteza prefrontal, lo que se relaciona con la pérdida de memoria a corto plazo (Miranda *et al.*, 2013); y un aumento de las quimioquinas y moléculas de adhesión lo que explicaría el incremento de células inmunes periféricas en el cerebro (Potter *et al.*, 2006; Desruisseaux *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2015; Oelschlegel *et al.*, 2024).

Una vez discutidos los resultados obtenidos, una visión global de los mismos demuestra que pueden ser varias las causas y mecanismos que produzcan el daño neuronal observado. Como se ha descrito, los procesos de neuroinflamación juegan un papel crucial, que se ven además fuertemente influenciados por la ruptura de la BHE, que podría exacerbar la neuroinflamación observada acelerando los procesos de daño y muerte neuronal. En el caso de la parasitemia, la acumulación de GRI en regiones

determinadas genera focos hipóxicos que resultan también críticos en la progresión del daño. La activación microglial, junto con las hemorragias y la adhesión de células periféricas inflamatorias en la vasculatura, podrían mediar en el aumento de la liberación de mediadores proinflamatorios que finalmente causarían la neurodegeneración y posterior apoptosis neuronal (Desruisseaux *et al.*, 2008). Existen además una gran variedad de mecanismos moleculares descritos en relación con el daño neuronal. El papel de las caspasas en la muerte neuronal es innegable, pero algunos autores proponen la participación de la caspasa-3 (Oelschlegel *et al.*, 2024), de la caspasa-8 (Sarkar *et al.*, 2017), o incluso de otros mecanismos ya que parece que la caspasa-3 no esté presente en las neuronas (Strangward *et al.*, 2017). Se le ha otorgado un papel central al inflammasoma mediado por NLRP3 ya que, en cultivos *in vitro* de células microgliales, la administración de hemozoína, un bioproducto del parásito, incrementa la producción de moléculas neurotóxicas como citoquinas (IL-1 β , IL-6, TNF α), nitritos y EROs; que, junto con el incremento en la expresión del receptor NLRP3 y la caspasa-1 podrían ser los responsables del posterior daño (Velagapudi *et al.*, 2019). No existe aún un consenso sobre los mecanismos implicados en la activación glial y la muerte neuronal en estos modelos de malaria, y serán necesarios estudios adicionales que analicen tanto vías apoptóticas como inflamatorias para clarificar la temporalidad y progresión del daño observado en esta patología.

En conclusión, nuestros resultados han demostrado la activación glial y el daño neuronal tras la inoculación de *P. berghei* en tres núcleos de relevo de la vía visual poco explorados hasta la fecha, coincidiendo con lo observado en otras regiones en estudios previos; sin embargo, es necesario continuar investigando las vías involucradas en estos procesos.

3. ANÁLISIS DEL POTENCIAL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA CILASTATINA

El tratamiento con CIL en los dos modelos animales empleados mostró un efecto protector frente al daño renal, acorde a nuestros estudios previos, y, por primera vez, demostramos un prometedor efecto neuroprotector y antiinflamatorio en la vía visual en estas patologías.

La administración de CIL atenuó la pérdida de peso y el daño renal observado en los animales tratados con LPS (**Fig.44 y Fig.45**) y, aunque no siempre se observó una reversión del daño inducido por el LPS, si se observó una reducción en la severidad del mismo

(Fig.44B y Fig.45B-D). En el modelo de malaria, aunque no fue capaz de corregir los niveles de parasitemia y hemoglobina, sí logró atenuar el daño renal descrito (Fig.62). En estudios previos, la administración de CIL ha demostrado de forma consistente propiedades nefroprotectoras surgiendo este fármaco como un posible abordaje terapéutico muy prometedor en el tratamiento del fracaso renal (ver **Tabla 10**). La eficacia del fármaco parece depender de la severidad del daño, de la dosis y de la pauta de administración empleada. Así, en un modelo animal de sepsis inducido por CLP, en el que el fracaso renal fue mucho mayor, la administración de CIL a la misma dosis, pero durante 3 días, logró revertir completamente el daño (González-Nicolás, 2022). Se obtuvieron resultados similares en un modelo animal de toxicidad inducida por la administración de cisplatino, en el que la administración repetida de CIL también logró una reversión del fracaso renal (Martín-Sánchez, 2024). La eficacia de la administración de CIL en el FRA inducido por la inoculación del parásito (modelo animal de malaria) fue algo mayor que en el caso de la administración de LPS (modelo animal de sepsis). Una posible explicación de estas diferencias puede deberse a que en el modelo de LPS se administró una dosis única, mientras que en el de malaria se realizó una administración repetida. Por lo que quizás la mayor duración del tratamiento consigue mejores efectos para la corrección del daño renal.

En nuestro estudio *in vivo* mediante TCO, la administración de CIL no fue capaz de revertir el edema encontrado tras la administración de LPS (Fig.46). Sin embargo, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, CIL sí logró revertir el edema encontrado tras la administración del quimioterápico cisplatino en ratas *Wistar* tras un periodo de administración de la CIL de 5 días, tiempo suficiente para que el fármaco fuera capaz de resolver el edema ocasionado (Martín-Sánchez, 2024). Este resultado refuerza la necesidad de prolongar el tratamiento con CIL para poder ver su eficacia terapéutica.

La administración de CIL logró revertir el daño neuronal en la retina en los dos modelos principalmente en las áreas más afectadas (Fig.48 y Fig.64), aquellas en las que se detectó una mayor disminución en el número de células Brn3a⁺, próximas al NO. En los otros tres núcleos de relevo de la vía visual analizados, en el modelo de sepsis, CIL logró atenuar o revertir el daño causado por LPS (Fig.57); mientras que en el modelo de malaria sólo consiguió atenuar el daño (Fig.73). El papel neuroprotector de CIL, en los diferentes núcleos de relevo de la vía visual, hasta donde sabemos, es la primera vez que ha sido descrito. Es importante destacar que, en ambos modelos y con los dos marcadores neuronales empleados (Brn3a y NeuN), la reducción observada podría deberse a una disminución transitoria de la funcionalidad y no sólo la pérdida de las neuronas (Nadal-

Nicolás *et al.*, 2009; Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). El hecho de que el tratamiento con CIL demuestre una menor reducción del marcador correspondiente, podría indicar que estuviera protegiendo a las neuronas del daño y evitase una pérdida de su funcionalidad; o bien que estuviera produciendo una recuperación de las neuronas “disfuncionales”. En ambos casos CIL evitaría que la progresión del daño ocasionara su muerte.

La administración de CIL demostró notables propiedades antiinflamatorias a lo largo de la vía visual en ambos modelos. CIL revierte el aumento en el marcaje de GFAP, es decir, impide la activación microglial tanto en el modelo de sepsis como en el de malaria. En el caso de la retina el principal efecto de CIL se observa, nuevamente, en zonas próximas al disco óptico (**Fig.50 y Fig.66**), y es evidente en los tres núcleos de relevo analizados (**Fig.59 y Fig.75**). CIL atenuó el aumento en el número de células Iba1⁺ sólo en la retina y en especial en las zonas próximas al NO, en ambos modelos (**Fig.52 y Fig.68**). Al analizar el efecto de CIL sobre el grado de activación de las células microgliales se observó una atenuación y/o reversión únicamente en el modelo de sepsis, en toda la vía visual (**Fig.54B y Fig.61**).

Nuestro grupo de investigación, en un modelo experimental de glaucoma en la retina (Martínez-López *et al.* 2024) ya ha demostrado las propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias de CIL. En dicho estudio los efectos protectores encontrados fueron también más marcados en las zonas más cercanas al disco óptico, lo cual podría explicar que la eficacia de CIL se concentrase, mayoritariamente, en las áreas más próximas a la entrada de la irrigación; bien porque actúe de forma directa en el tejido atenuando la inflamación local, o bien porque disminuya la inflamación sistémica inducida por ambas patologías, por lo que llegarían menos factores estimulantes que generasen la inflamación local. En la misma línea, en un estudio más reciente describimos las acciones antiinflamatorias de CIL, en un modelo de toxicidad inducida por cisplatino, en uno de los núcleos de relevo de la vía visual (CS) (Martín-Sánchez, 2024). Estos estudios nos permiten señalar que la eficacia de la CIL no depende únicamente de la dosis y pauta de administración empleada, sino, muy posiblemente, del daño generado en los modelos. En la presente Tesis Doctoral, CIL se administró a una dosis de 150 mg/kg, i.p., en una dosis única concomitante al daño (modelo animal de sepsis) y a dosis repetidas, 6 dosis, tras la inoculación del parásito y durante los 5 días posteriores (modelo de malaria). En otros modelos CIL se ha administrado también como fármaco preventivo, resultando igualmente eficaz (Martínez-López *et al.* 2024). Consideramos, sin embargo, que, en estas patologías (y modelos animales), la pauta de administración empleada presenta ventajas clínicas por su mayor valor traslacional. Sería necesario determinar la ventana terapéutica de la

administración de CIL, así como valorar otros posibles factores que pudieran interferir en su eficacia. Además, en el caso del tratamiento de la malaria, la administración de CIL resultaría aún más beneficiosa ya que se han descrito efectos retinotóxicos para algunos antimaláricos, como el artesunato (Lu *et al.*, 2023), por lo que la administración de CIL tendría un gran valor como coadyuvante de estos tratamientos. Los efectos antiinflamatorios de CIL parecen ser más marcados cuando hay una inflamación evidente, allá donde se observa un incremento tanto en el número de células de microglía como en su activación, CIL ejerce su acción antiinflamatoria; mientras que no parece tener efectos en los núcleos en los que no observamos dicha activación microglial. Esto podría explicar la ausencia de efectos de CIL en nuestro modelo de malaria en relación con la activación microglial.

En nuestro estudio la administración de CIL, *per se*, presenta algunos efectos, aunque son leves y, en cualquier caso, de menor magnitud que los beneficios observados por la combinación de los tratamientos farmacológicos. Por ejemplo, el aumento en la expresión de Brn3a⁺ en la retina podría indicar una mejor funcionalidad de las CGRs. A pesar de los posibles efectos de la CIL, su futura traslación a la clínica estaría avalada por los resultados obtenidos en un ensayo clínico previo (NCT03595189), así como por su extenso uso en combinación con el imipenem (Clissold *et al.*, 1987).

Una vez demostrado el posible potencial neuroprotector y antiinflamatorio de CIL planteamos como posible mecanismo de acción el inflamasoma mediado por TLR4 y NLRP3, pues había sido propuesto anteriormente como mecanismo de acción en la nefroprotección asociada a CIL. La administración de CIL induce una reducción en la expresión de TLR4 y NLRP3 a nivel renal, disminuyendo los efectos inflamatorios, el estrés oxidativo y los mecanismos de apoptosis asociados al daño renal inducido (González-Nicolás, 2022). Varios modelos de nefrotoxicidad, tanto *in vitro* e *in vivo*, demuestran que CIL, tras su unión a la enzima DHP-I, reduce la fluidez de la membrana plasmática, bloqueando la internalización de Fas, y de otros receptores, incluidos los TLRs (Pérez *et al.*, 2004; Camaño *et al.*, 2010; González-Nicolás, 2022). En este estudio hemos descrito, en la retina de ambos modelos, la presencia de TLR4 en las células GFAP⁺ (astrocitos y/o pies vítreos de las células de Müller), y la expresión de NLRP3, en las CGRs. Sin embargo, en esta primera aproximación, no hemos cuantificado la expresión de estas proteínas, por lo que no podemos saber si la administración de CIL modifica su expresión en estos modelos. Es posible que CIL actúe en el SNC como se ha descrito en el sistema renal; así, al disminuir la fluidez de la membrana plasmática, estaría evitando que TLR4 se active ante la presencia de DAMPs y PAMPs, por lo que podría reducir la activación microglial, disminuyendo la

inflamación local, lo cual contribuiría a evitar la activación de la vía del inflamasoma mediado por NLRP3 presente en las CGR y explicaría su papel antiinflamatorio y neuroprotector.

Otros modelos animales de sepsis y de malaria han descrito la inducción de un FRA, que está mediado tanto por la inflamación local a nivel renal, como por el incremento en los marcadores de inflamación periférica detectados en el suero (modelos de LPS: Chunzhi *et al.*, 2016; Khajevand-Khazaei *et al.*, 2019; modelos de *P. berghei* ANKA: Silva *et al.*, 2018; Simião *et al.*, 2024). La administración de CIL demostró ser capaz de bloquear tanto la inflamación local como la sistémica en modelos de FRA de distinta etiología (González-Nicolás, 2022). En nuestro estudio, la eficacia antiinflamatoria y neuroprotectora de CIL podría deberse a la atenuación del inflamasoma periférico debido a la disminución del daño renal; pero esto no excluye que CIL pueda ejercer una acción directa sobre el SNC, como ya se ha discutido.

Estudios recientes indican que DHP-I/DPEP1 está presente en diversos tejidos, como pulmón, hígado y riñón, donde además media procesos de adhesión leucocitaria en células endoteliales (Choudhury *et al.*, 2019; Lau *et al.*, 2022); pero no se detectó ni en cerebro ni en bazo (Choudhury *et al.*, 2019). Sin embargo, otros estudios sí muestran la expresión de DHP-I/DPEP1 en neuronas y células gliales, así como en células endoteliales en la médula espinal (Álvarez-Tosco *et al.*, 2024). Esta discrepancia podría deberse a diferencias en el método de identificación empleado, los autores que no lo detectan emplean un anticuerpo específico (Choudhury *et al.*, 2019; Lau *et al.*, 2022); mientras que los que sí lo detectan utilizan un antisuero generado frente DPEP1-C recombinante humano (Álvarez-Tosco *et al.*, 2024). En nuestro laboratorio, empleando este mismo antisuero, logramos identificar DPEP1 en la retina, específicamente en las CGRs (células Brn3a⁺) y, en algunos casos, también en las células gliales (datos no publicados). La confirmación de la presencia de esta enzima en la retina apoyaría la acción local y directa de CIL en las poblaciones neuronales y gliales que fueron dañadas por los tratamientos empleados; sin descartar que también ejerza una acción indirecta al mediar la disminución de la inflamación periférica.

En el SNC se ha descrito la presencia de otras posibles dianas de la CIL, como son los OATs y la megalina (revisar: Marzolo & Fartán, 2011; Nigam *et al.*, 2015). Los OATs se expresan mayoritariamente en los epitelios de barrera donde parece estar involucrado en el intercambio de aniones y fármacos entre la sangre y el humor vítreo; mientras que en el plexo coroideo y en el endotelio capilar vascular (BHE) podría estar mediando el intercambio de sustratos entre el líquido cefalorraquídeo y la sangre (consultar: Nigam *et*

et al., 2015). En el caso de la megalina, este receptor se ha encontrado en las CGRs (Fitzgerald *et al.*, 2007), en el EPR (Storm *et al.*, 2019) así como en el plexo coroideo y los capilares vasculares (Chun *et al.*, 1999), regulando el transporte de proteínas y nutrientes (revisar: Marzolo & Fartán, 2011). Estudios previos demuestran que, a nivel renal, los efectos nefroprotectores de CIL están mediados por OATs (Huo *et al.*, 2019, 2020) y megalina (Hori *et al.*, 2017; Jado *et al.*, 2020). CIL bloquea ambos transportadores, por lo que evita la entrada y acumulación de los fármacos nefrotóxicos, mejorando la supervivencia celular y evitando así la pérdida de función renal (Huo *et al.*, 2019; Jado *et al.*, 2020). Por lo que, no podemos aún dilucidar si los efectos de CIL que observamos en nuestro estudio se deben solo al bloqueo de DHP-I, o también al bloqueo de OATs y megalina.

En las dos patologías estudiadas se han descrito, como ya se ha indicado, alteraciones en diversas regiones del SNC responsables de que los pacientes presentes deterioro cognitivo, así como en algunos casos alteraciones en la función visual (Iwashyna *et al.*, 2012; Maude *et al.*, 2014; Verma & Krishna 2015; Nanfack *et al.*, 2017; Łatkowska *et al.*, 2024). En el presente trabajo de Tesis Doctoral nos hemos centrado en el análisis de la vía visual como primer abordaje para caracterizar el posible efecto protector de CIL en todo el SNC.

Nuestros hallazgos muestran que la administración de CIL disminuye la activación glial y atenúa el daño neuronal, evidenciando su capacidad antiinflamatoria y neuroprotectora, al menos en dos modelos animales de patología sistémica. Aunque es necesario profundizar en los mecanismos moleculares por los que CIL ejerce estas acciones, su traslación a la clínica podría ser relativamente rápida. Su empleo en humanos es una realidad, aunque sea en combinación con el imipenem. La seguridad de CIL ya se ha demostrado en un ensayo clínico (NCT03595189). Y el presente trabajo proporciona evidencias de que puede ser un fármaco muy prometedor para el tratamiento de alteraciones retinianas y cerebrales de múltiple etiología.

4. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en el análisis inmunohistoquímico de cuatro de las poblaciones celulares de la retina: CGRs, astrocitos y células de Müller, y células microgliales. Sin embargo, no hemos llevado a cabo ni la valoración de otras poblaciones celulares presentes en ella, ni la evaluación funcional del sistema visual. Tanto en el modelo de sepsis como en el modelo de malaria sería de gran interés valorar la función visual en los animales. En roedores, la función visual puede evaluarse de

numerosas formas, utilizando diversas tareas conductuales como la prueba del agua visual o el test optomotor. Sería también necesario realizar registros funcionales de la retina, mediante la realización de electroretinografía (ERG) y/o el registro de potenciales evocados visuales (PEV) (para más información consultar Leinonen & Tanila, 2018).

A pesar del papel crucial que juega la inflamación en las dos patologías estudiadas, tanto en la sepsis (Rittirsch *et al.*, 2008; Cecconi *et al.*, 2018) como en la malaria (Clark *et al.*, 2006; 2008), en el presente estudio no hemos podido abordar la caracterización de la respuesta inflamatoria. Habría sido de gran interés analizar dicha respuesta, por ejemplo, mediante la valoración de diversas citoquinas pro y antiinflamatorias, tanto a nivel periférico (en sangre) como a nivel local (en la retina y en los núcleos cerebrales de interés). En la actualidad, hay una cierta aceptación del hecho de que, en el caso de las enfermedades infecciosas en general, no es el organismo invasor lo que causa la enfermedad, sino la respuesta desenfrenada del organismo a éste, es decir, la “tormenta de citoquinas” (Clark *et al.*, 2008). Por ello, habría sido de gran interés valorar y cuantificar las principales citoquinas implicadas en la respuesta ante nuestros patógenos (LPS y *P. berghei*), así como la progresión temporal y regional de la misma.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha mencionado, en repetidas ocasiones, el papel crucial que podría jugar la ruptura de la BHE y/o la BHR en el daño generado en los modelos animales en estudio. En el caso del LPS, se ha descrito que la endotoxina podría afectar a la BHE (para revisión ver: Danielski *et al.*, 2018; Catarina *et al.*, 2021), al igual que en el caso de la malaria, donde la acumulación de los GRI podría desencadenar su alteración y posterior ruptura (Nishanth & Schlüter, 2019; Ataide *et al.*, 2020; Oelschlegel *et al.*, 2024). Sería necesario, en estudios futuros, evaluar la integridad de la BHE y la BHR mediante marcadores de permeabilidad vascular, como el azul de Evans, fluoresceína, o conjugados albúmina-flúor Alexa (Ahishali & Kaya, 2020), o mediante el estudio de marcadores de uniones estrechas, como la ocludina (Sugiyama *et al.*, 2023). Estas valoraciones nos permitirían avanzar en el conocimiento de la progresión y direccionalidad del daño observado, es decir, nos permitirían dilucidar si el daño de los patógenos es directo sobre el SNC, o si, por el contrario, la mayor parte de este procede de la respuesta inflamatoria sistémica que irrumpe en el SNC, a través de una BHE funcional o estructuralmente deficiente.

En el presente estudio se han seleccionado dos patologías, la sepsis y la malaria, que, aunque estén causadas por agentes infecciosos diferentes (bacterias mayoritariamente en la sepsis y parásitos del género *Plasmodium* en la malaria), presentan como mecanismo común una respuesta inflamatoria desregulada, que puede llevar a la disfunción

multiorgánica. En este trabajo, y dada la experiencia de nuestro grupo de investigación, se ha evaluado el daño a nivel del SNC, y a nivel renal. En estudios futuros será necesario ampliar nuestros estudios a otros sistemas, mediante colaboraciones con otros grupos de investigación, que nos permitan analizar el daño en el sistema cardiovascular, hepático, o pulmonar, entre otros, en los que se han descrito daños importantes en situaciones de sepsis y malaria, y en los que el tratamiento con CIL quizás también podría ser de interés. Será además necesario extender los estudios a otros posibles mecanismos fisiopatológicos comunes a ambas patologías, tales como la disfunción mitocondrial o el estrés oxidativo, que también podrían estar implicados en la eficacia terapéutica de la CIL.

En el estudio nos hemos centrado en la caracterización del daño neuronal y glial a lo largo de la vía visual en dos modelos animales. Los estudios realizados se han llevado a cabo mediante análisis inmunohistoquímicos, y se ha realizado una primera aproximación mediante inmunofluorescencia de la implicación del inflammasoma mediado por TLR4 y NLRP3 en el daño observado, al menos a nivel de la retina. Es necesario cuantificar los cambios en la expresión de estos marcadores en los diferentes grupos experimentales con el fin de demostrar la implicación de esta vía tanto en el daño inducido como en el mecanismo de acción de la CIL, por lo que se deberán realizar estudios moleculares adicionales. Será necesario además completar la caracterización de esta vía mediante la valoración de otros marcadores moleculares de la misma, como MyD88 (molécula adaptadora con dominio de muerte de mieloides 88, del inglés, *Myeloid differentiation primary response 88*), NF- κ B, ASC (proteína tipo speck asociada a la apoptosis que contiene CARD, del inglés, *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), o IL-1 β (Zhang *et al.*, 2021), así como un análisis de las caspasas implicadas con el fin de dilucidar los mecanismos de neurodegeneración y muerte implicados en este proceso.

Es importante también destacar que, en los modelos animales empleados, se ha encontrado una considerable variabilidad interindividual, tanto tras la administración de LPS, como tras la inoculación del parásito *P. berghei*, en los parámetros fisiopatológicos evaluados (peso corporal, función renal, parasitemia...). Esto podría deberse a una diferente susceptibilidad individual a los agentes patógenos, que podría, en cierta medida paliarse mediante la evaluación de parámetros adicionales de daño, como, por ejemplo, la medida de los niveles séricos de LPS o de la temperatura corporal, en el caso del modelo de LPS (Buras *et al.*, 2005; Virzi *et al.*, 2022); o la valoración de la parasitemia y los niveles de hemoglobina en sangre en el modelo de malaria. En este último caso sí se registraron estos valores, pero no siempre se han podido realizar estudios pareados considerando la severidad del daño. En este sentido, sería de gran interés analizar la presencia del parásito

en el parénquima, ya sea por técnicas de imagen no invasivas como por histología, con el fin de poder correlacionar la presencia del parásito con el daño observado en cada uno de los niveles de la vía visual. No obstante, cabe destacar que los resultados de los análisis inmunohistológicos y la solidez de la sistémica empleada en su estudio, han sido bastante consistentes en relación con la activación glial y al daño neuronal observado, y así se han descrito y discutido.

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el daño neuronal y glial en el sistema visual en dos modelos animales de fracaso multiorgánico, y hemos demostrado la eficacia de la administración de la CIL en ambos. Cabe destacar que los modelos empleados difieren en la especie modelo empleada, siendo el modelo de sepsis un modelo de administración sistémica de LPS en rata y el modelo de malaria un modelo murino de inoculación i.p. del parásito *P. berghei*. Haber demostrado las propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias de la CIL en dos especies animales distintas, refuerza su eficacia y potencial traslación a la clínica. Sin embargo, no podemos descartar que algunas de las diferencias encontradas en los modelos empleados se deban a efectos específicos de especie. A pesar de ser muy conscientes de la relevancia social y clínica de incluir el sexo como variable biológica en la investigación preclínica con modelos animales (Beery & Zucker, 2011) en la presente Tesis Doctoral no hemos podido considerar ambos sexos en los dos modelos animales planteados. En el modelo de sepsis, se decidió realizar el estudio en animales macho ya que la literatura indicaba una mayor incidencia de la sepsis en hombres que en mujeres (Lakbar *et al.*, 2023); mientras que, en el modelo de malaria, aunque los datos epidemiológicos no eran claros en relación al posible dimorfismo sexual, algunos autores han observado que en países subdesarrollados las mujeres presentan un mayor riesgo de infección (Jenkins *et al.*, 2015; Quaresima *et al.*, 2021); y, además, gran parte de los estudios hechos en roedores se habían realizado en ratones hembra (ver **Tabla 8**). Los resultados del presente trabajo, a pesar del sesgo de género, demuestran que la administración de CIL es efectiva en ambos sexos, reforzando el potencial terapéutico de este fármaco. No obstante, será necesario estudiar la influencia de las hormonas sexuales en los efectos de las patologías, donde las hembras (al menos en el modelo animal de sepsis) parecen estar más protegidas; los posibles dimorfismos sexuales en cuanto a la presencia y funcionalidad de las diferentes células gliales, ya que se han descrito importantes dimorfismos sexuales tanto para la microglía (Lenz & McCarthy, 2015), como para los astrocitos (Gozlan *et al.*, 2024); y profundizar, en un futuro, en los mecanismos celulares y moleculares de las acciones neuroprotectoras y antiinflamatorias de la CIL en animales de ambos sexos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS



CONCLUSIONES

MODELO ANIMAL DE SEPSIS:

1. Una única dosis de LPS provocó una reducción del peso corporal y daño renal. CIL consiguió atenuar las alteraciones producidas.
2. El estudio piloto mediante TCO mostró que la administración de LPS aumentó el grosor de la retina en las zonas próximas al NO, sugiriendo la presencia de un edema. CIL no logró mitigar este efecto.
3. LPS redujo las CGRs-Brn3a⁺ e indujo una marcada activación glial en la retina, fundamentalmente en las áreas próximas al NO. CIL demostró efectos neuroprotectores y antiinflamatorios, principalmente en las áreas de mayor daño.
4. NLRP3 colocalizó con las CGRs y TLR4 con las células microgliales en la retina de los grupos tratados con LPS.
5. LPS redujo la expresión de NeuN, indujo una activación microglial en el CS y la V1, y una activación microglial de forma más notable en la V1. CIL demostró efectos neuroprotectores y antiinflamatorios, principalmente en los núcleos más afectados.

MODELO ANIMAL DE MALARIA:

1. La inoculación del parásito *Plasmodium berghei* indujo parasitemia, una marcada reducción de los niveles de hemoglobina en sangre y daño renal. CIL solo logró atenuar el daño renal.
2. La inoculación del parásito redujo las CGRs-Brn3a⁺ e indujo un aumento de células microgliales, fundamentalmente en las áreas próximas al NO; y una activación microglial generalizada. CIL demostró efectos neuroprotectores y antiinflamatorios en la retina.
3. NLRP3 colocalizó con las CGRs y TLR4 con las células microgliales en la retina de los grupos inoculados con el parásito.
4. La inoculación del parásito redujo la expresión de NeuN e indujo una activación glial en todos los núcleos de relevo de la vía visual. CIL demostró efectos neuroprotectores y bloqueó la activación microglial.

CONCLUSIONS

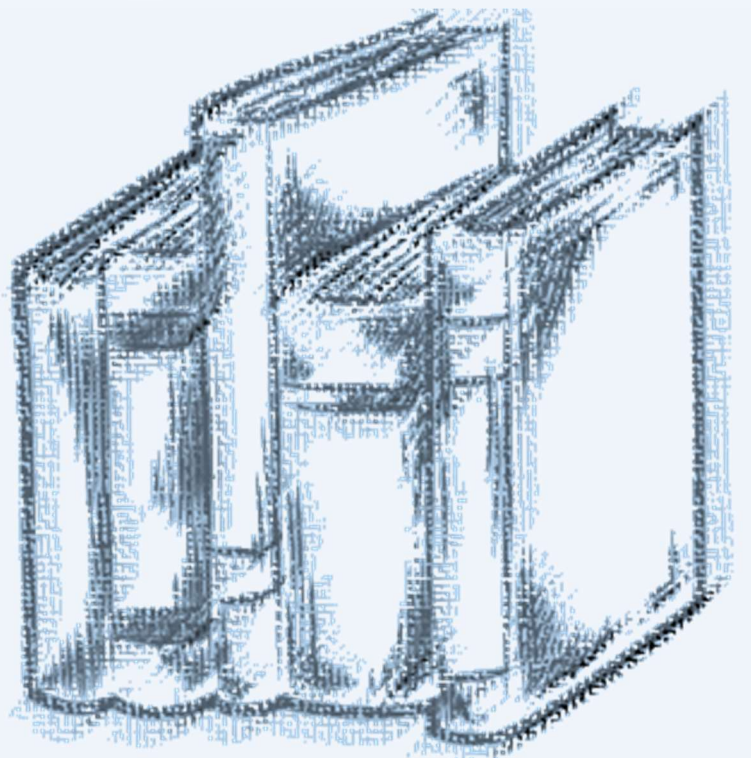
ANIMAL MODEL OF SEPSIS:

1. A single dose of LPS caused a reduction in body weight and renal damage. CIL managed to mitigate these alterations.
2. The preliminary study using OCT showed that LPS administration increased retinal thickness in areas near the ON, suggesting the presence of oedema. CIL was unable to mitigate this effect.
3. LPS reduced the number of RGCs-Brn3a⁺ and induced a marked glial activation in the retina, especially in areas near the ON. CIL demonstrated neuroprotective and anti-inflammatory effects, mainly in the areas of greatest damage.
4. NLRP3 colocalized with RGCs, and TLR4 with macroglial cells in the retina of LPS-treated groups.
5. LPS reduced NeuN expression, induced macroglial activation in the SC and V1, and a more pronounced microglial activation in V1. CIL showed neuroprotective and anti-inflammatory effects, primarily in the most affected nuclei.

ANIMAL MODEL OF MALARIA:

1. *Plasmodium berghei* inoculation induced parasitemia, a marked reduction in blood haemoglobin levels, and renal damage. CIL could only attenuate the renal damage.
2. Parasite inoculation reduced RGCs-Brn3a⁺ and increased microglial cells, especially in areas near to the ON, along with a generalized macroglial activation. CIL demonstrated neuroprotective and anti-inflammatory effects in the retina.
3. NLRP3 colocalized with RGCs, and TLR4 with macroglial cells in the retina of parasite-inoculated groups.
4. Parasite inoculation reduced NeuN expression and induced glial activation in all relay nuclei of the visual pathway studied. CIL demonstrated neuroprotective effects and was able to inhibit the induced macroglial activation.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, T. P., Silva, L. S., Takiya, C. M., Souza, M. C., Henriques, M. G., Pinheiro, A. A. S., & Caruso-Neves, C. (2014). Mice rescued from severe malaria are protected against renal injury during a second kidney insult. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093634>
- Adachi, H., Katayama, T., Inuzuka, C., Oikawa, S., Tsujimoto, M., & Nakazato, H. (1990). Identification of membrane anchoring site of human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 15341–15345.
- Ahishali, B., & Kaya, M. (2020). *Evaluation of Blood-Brain Barrier Integrity Using Vascular Permeability Markers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, Albumin-Alexa Fluor Conjugates, and Horseradish Peroxidase* (pp. 87–103). https://doi.org/10.1007/7651_2020_316
- Álvarez-Tosco, K., González-Fernández, R., González-Nicolás, M. Á., Martín-Ramírez, R., Morales, M., Gutiérrez, R., Díaz-Flores, L., Arnau, M. R., Machín, F., Ávila, J., Lázaro, A., & Martín-Vasallo, P. (2024). Dorsal root ganglion inflammation by oxaliplatin toxicity: DPEP1 as possible target for peripheral neuropathy prevention. *BMC Neuroscience*, 25(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12868-024-00891-y>
- Andonegui, G., Zelinski, E. L., Schubert, C. L., Knight, D., Craig, L. A., Winston, B. W., Spanswick, S. C., Petri, B., Jenne, C. N., Sutherland, J. C., Nguyen, R., Jayawardena, N., Kelly, M. M., Doig, C. J., Sutherland, R. J., & Kubes, P. (2018). Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. *JCI Insight*, 3(9). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99364>
- Aranda, M. L., Dorfman, D., Sande, P. H., & Rosenstein, R. E. (2015). Experimental optic neuritis induced by the microinjection of lipopolysaccharide into the optic nerve. *Experimental Neurology*, 266, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.01.010>
- 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), 750. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80853-6>
- Arora, J., Mendelson, A. A., & Fox-Robichaud, A. (2023). Sepsis: network pathophysiology and implications for early diagnosis. In *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (Vol. 324, Issue 5, pp. R613–R624). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00003.2023>
- Arora, N., Anbalagan, L. C., & Pannu, A. K. (2021). Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? *Risk Management and Healthcare Policy*, Volume 14, 1033–1039. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S219294>
- Assali, A., Gaspar, P., & Rebsam, A. (2014). Activity dependent mechanisms of visual map formation - From retinal waves to molecular regulators. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 35, pp. 136–146). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.008>
- Ataide, B. J. de A., Kauffmann, N., Mendes, N. de S. F., Torres, M. L. M., dos Anjos, L. M., Passos, A. da C. F., de Moraes, S. A. S., Batista, E. de J. O., Herculano, A. M., & Oliveira, K. R. H. M. (2020). Melatonin Prevents Brain Damage and Neurocognitive Impairment Induced by Plasmodium Berghei ANKA Infection in Murine Model of Cerebral Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.541624>
- Atapour, N., Worthy, K. H., & Rosa, M. G. P. (2021). Neurochemical changes in the primate lateral geniculate nucleus following lesions of striate cortex in infancy and adulthood: implications for

residual vision and blindsight. *Brain Structure and Function*, 226(9), 2763–2775. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02257-0>

Augustine, G. J., Groh, J. M., Huettel, S. A., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2023). *Neuroscience* (7.^a ed.). Sinauer Associates, un sello de Oxford University Press

Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., Cook, D. G., & Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: Roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1>

Bargi, R., Asgharzadeh, F., Beheshti, F., Hosseini, M., Sadeghnia, H. R., & Khazaei, M. (2017). The effects of thymoquinone on hippocampal cytokine level, brain oxidative stress status and memory deficits induced by lipopolysaccharide in rats. *Cytokine*, 96, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.015>

Barrera, V., MacCormick, I. J. C., Czanner, G., Hiscott, P. S., White, V. A., Craig, A. G., Beare, N. A. V., Culshaw, L. H., Zheng, Y., Biddolph, S. C., Milner, D. A., Kamiza, S., Molyneux, M. E., Taylor, T. E., & Harding, S. P. (2018). Neurovascular sequestration in paediatric *P. falciparum* malaria is visible clinically in the retina. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32208>

Beare, N. A. (2004). Prognostic Significance and Course of Retinopathy in Children With Severe Malaria. *Archives of Ophthalmology*, 122(8), 1141. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.8.1141>

Beare, N. A. V, Taylor, T. E., Harding, S. P., Lewallen, S., & Molyneux, M. E. (2006). Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 790–797.

Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>

Bensalel, J., Roberts, A., Hernandez, K., Pina, A., Prempeh, W., Babalola, B. V., Cannata, P., Lazaro, A., & Gallego-Delgado, J. (2023). Novel Experimental Mouse Model to Study Malaria-Associated Acute Kidney Injury. *Pathogens*, 12(4), 545. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040545>

Bezzina, A. D., Spiteri Bailey, J., & Bertuello, I. (2024). Type II Acute Macular Neuroretinopathy Secondary to Malaria. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*, 2024, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2024/1577127>

Bian, Y., Zhao, X., Li, M., Zeng, S., & Zhao, B. (2013). Various roles of astrocytes during recovery from repeated exposure to different doses of lipopolysaccharide. *Behavioural Brain Research*, 253, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.028>

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>

Bignami, A., Eng, L. F., Dahl, D., & Uyeda, C. T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research*, 43(2), 429–435. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90398-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90398-8)

Boerma, E. C. (2017). Retinal involvement in sepsis: from the eye of the patient to the eye of the beholder. *Critical Care*, 21(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1721-2>

Bosco, A., Steele, M. R., & Vetter, M. L. (2011). Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *Journal of Comparative Neurology*, 519(4), 599–620. <https://doi.org/10.1002/cne.22516>

- Bossù, P., Cutuli, D., Palladino, I., Caporali, P., Angelucci, F., Laricchiuta, D., Gelfo, F., De Bartolo, P., Caltagirone, C., & Petrosini, L. (2012). A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 671. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-101>
- Brandi, E., Torres-Garcia, L., Svanbergsson, A., Haikal, C., Liu, D., Li, W., & Li, J. Y. (2022). Brain region-specific microglial and astrocytic activation in response to systemic lipopolysaccharides exposure. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.910988>
- Brodeur, K. R. N., Herculano, A., & Oliveira, K. (2023). Clinical aspects of malarial retinopathy: a critical review. *Pathogens and Global Health*, 117(5), 450–461. <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2128568>
- Buras, J. A., Holzmann, B., & Sitkovsky, M. (2005). Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 10, pp. 854–865). <https://doi.org/10.1038/nrd1854>
- Cai, L., Rodgers, E., Schoenmann, N., & Raju, R. P. (2023). Advances in Rodent Experimental Models of Sepsis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24119578>
- Camano, S., Lazaro, A., Moreno-Gordaliza, E., Torres, A. M., de Lucas, C., Humanes, B., Lazaro, J. A., Milagros Gomez-Gomez, M., Bosca, L., & Tejedor, A. (2010). 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>
- Campbell, B. J., Lin, Y.-C., Davis, R. V., & Ballew, E. (1966). The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 118(2), 371–386. [https://doi.org/10.1016/S0926-6593\(66\)80046-2](https://doi.org/10.1016/S0926-6593(66)80046-2)
- Capuccini, B., Lin, J., Talavera-López, C., Khan, S. M., Sodenkamp, J., Spaccapelo, R., & Langhorne, J. (2016). Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response, during experimental cerebral malaria. *Scientific Reports*, 6(1), 39258. <https://doi.org/10.1038/srep39258>
- Carroll, R. W., Wainwright, M. S., Kim, K.-Y., Kidambi, T., Gómez, N. D., Taylor, T., & Haldar, K. (2010). A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. *PLoS ONE*, 5(10), e13124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013124>
- Catarina, A. V., Branchini, G., Bettoni, L., De Oliveira, J. R., & Nunes, F. B. (2021). Sepsis-Associated Encephalopathy: from Pathophysiology to Progress in Experimental Studies. *Molecular Neurobiology*, 58(6), 2770–2779. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02303-2>
- Caviness, V. S. (1975). Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 164(2), 247–263. <https://doi.org/10.1002/cne.901640207>
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., & Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: Importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-132>
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. In *The Lancet* (Vol. 392, Issue 10141, pp. 75–87). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)
- Celik, I., Cihangiroglu, M., Yilmaz, T., Kohle, U., & Akbulut, A. (2006). The prevalence of bacteraemia-related retinal lesions in seriously ill patients. *Journal of Infection*, 52(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.04.006>

- Chen, H., Deng, Y., Gan, X., Li, Y., Huang, W., Lu, L., Wei, L., Su, L., Luo, J., Zou, B., Hong, Y., Cao, Y., Liu, Y., & Chi, W. (2020). NLRP12 collaborates with NLRP3 and NLRC4 to promote pyroptosis inducing ganglion cell death of acute glaucoma. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00372-w>
- Chen, M., Rong, R., & Xia, X. (2022). Spotlight on pyroptosis: role in pathogenesis and therapeutic potential of ocular diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02547-2>
- 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>
- Choudhury, S. R., Babes, L., Rahn, J. J., Ahn, B.-Y., Goring, K.-A. R., King, J. C., Lau, A., Petri, B., Hao, X., Chojnacki, A. K., Thanabalasuriar, A., McAvoy, E. F., Tabariès, S., Schraeder, C., Patel, K. D., Siegel, P. M., Kopciuk, K. A., Schriemer, D. C., Muruve, D. A., ... Senger, D. L. (2019). Dipeptidase-1 Is an Adhesion Receptor for Neutrophil Recruitment in Lungs and Liver. *Cell*, 178(5), 1205-1221.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.017>
- Chun, J. T., Wang, L., Pasinetti, G. M., Finch, C. E., & Zlokovic, B. V. (1999). Glycoprotein 330/Megalin (LRP-2) Has Low Prevalence as mRNA and Protein in Brain Microvessels and Choroid Plexus. *Experimental Neurology*, 157(1), 194–201. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7052>
- Chunzhi, G., Zunfeng, L., Chengwei, Q., Xiangmei, B., & Jingui, Y. (2016). Hyperin protects against LPS-induced acute kidney injury by inhibiting TLR4 and NLRP3 signaling pathways. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 50). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Clark, C. J., Phillips, R. S., Mcmillan, R. B., Montgomery, I. O., & Stone, T. W. (2005). Differences in the neurochemical characteristics of the cortex and striatum of mice with cerebral malaria. *Parasitology*, 130(1), 23–29. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006237>
- Clark, I. A., Alleva, L. M., Budd, A. C., & Cowden, W. B. (2008). Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6(1–2), 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2007.07.002>
- Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M., & Cowden, W. B. (2006). Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal*, 5(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-85>
- Clissold, S. P., Todd, P. A., & Campoli-Richards, D. M. (1987). Imipenem/Cilastatin. *Drugs*, 33(3), 183–241. <https://doi.org/10.2165/00003495-198733030-00001>
- Coban, C., Lee, M. S. J., & Ishii, K. J. (2018). Tissue-specific immunopathology during malaria infection. *Nature Reviews Immunology*, 18(4), 266–278. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.138>
- 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>
- Courtie, E., Veenith, T., Logan, A., Denniston, A. K., & Blanch, R. J. (2020). Retinal blood flow in critical illness and systemic disease: a review. In *Annals of Intensive Care* (Vol. 10, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00768-3>
- 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), 1239. <https://doi.org/10.3390/biom11081239>

- Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., Barnwell, J. W., Turner, G., & Langhorne, J. (2012). The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002401. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002401>
- Daikohara, K., Akanuma, S., Kubo, Y., & Hosoya, K. (2022). Lipopolysaccharide-Induced Functional Alteration of P-glycoprotein in the Ex Vivo Rat Inner Blood–Retinal Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15504. <https://doi.org/10.3390/ijms232415504>
- Danielski, L. G., Giustina, A. Della, Badawy, M., Barichello, T., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., & Petronilho, F. (2018). Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0356-7>
- Danielski, L. G., Giustina, A. Della, Bonfante, S., Barichello, T., & Petronilho, F. (2020). The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. In *Inflammation* (Vol. 43, Issue 1, pp. 24–31). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01124-9>
- De Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Gallego, B. I., Trivinõ, A., & Ramírez, J. M. (2016). Retinal Macrogial Responses in Health and Disease. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2954721>
- Desruisseaux, M. S., Gulinello, M., Smith, D. N., Lee, S. C., Tsuji, M., Weiss, L. M., Spray, D. C., & Tanowitz, H. B. (2008). Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(11), 1621–1627. <https://doi.org/10.1086/587908>
- 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>
- Dräger, U. C. (1975). Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 160(3), 269–289. <https://doi.org/10.1002/cne.901600302>
- Dräger, U. C., & Olsen, J. F. (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20(3), 285–293.
- Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., & Yin, Q. (2016). Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 53, Issue 3, pp. 1637–1647). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>
- Duménieu, M., Marquèze-Pouey, B., Russier, M., & Debanne, D. (2021). Mechanisms of plasticity in subcortical visual areas. In *Cells* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10113162>
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00324>
- Edwards, M. D., White, A.-M., & Platt, B. (2002). Characterisation of rat superficial superior colliculus neurones: firing properties and sensitivity to GABA. *Neuroscience*, 110(1), 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00558-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00558-9)
- Ellis, E. M., Gauvain, G., Sivyer, B., & Murphy, G. J. (2016). Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol*, 116, 602–610. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016.-The>

- Elsakka, E. G. E., Mokhtar, M. M., Hegazy, M., Ismail, A., & Doghish, A. S. (2022). Megalin, a multi-ligand endocytic receptor, and its participation in renal function and diseases: A review. *Life Sciences*, 308, 120923. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120923>
- 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).
- Erikson, K., Liisanantti, J. H., Hautala, N., Koskenkari, J., Kamakura, R., Herzig, K. H., Syrjälä, H., & Alakokko, T. I. (2017). Retinal arterial blood flow and retinal changes in patients with sepsis: Preliminary study using fluorescein angiography. *Critical Care*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1676-3>
- Erskine, L., & Herreral, E. (2015). Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro*, 6(6). <https://doi.org/10.1177/1759091414562107>
- Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C. M., French, C., Machado, F. R., Mcintyre, L., Ostermann, M., Prescott, H. C., Schorr, C., Simpson, S., Wiersinga, W. J., Alshamsi, F., Angus, D. C., Arabi, Y., Azevedo, L., Beale, R., Beilman, G., ... Levy, M. (2021). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine*, 47(11), 1181–1247. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>
- Evanson, N. K., Guilhaume-Correa, F., Herman, J. P., & Goodman, M. D. (2018). Optic tract injury after closed head traumatic brain injury in mice: A model of indirect traumatic optic neuropathy. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197346>
- Ferlini, L., & Gaspard, N. (2023). What's new on septic encephalopathy? Ten things you need to know. In *Minerva Anestesiologica* (Vol. 89, Issue 3, pp. 217–225). Edizioni Minerva Medica. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.22.16689-7>
- 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., Martínez-López, M. A., Marco, E. M., de Hoz, R., Martín-Sánchez, B., Felipe, D. S., Salobar-García, E., López-Cuenca, I., Pinazo-Durán, M. D., Salazar, J. J., Ramírez, J. M., López-Gallardo, M., & Ramírez, A. I. (2021). Is saffron able to prevent the dysregulation of retinal cytokines induced by ocular hypertension in mice? *Journal of Clinical Medicine*, 10(21). <https://doi.org/10.3390/jcm10214801>
- 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>
- Fernández-Sánchez, L., Lax, P., Campello, L., Pinilla, I., & Cuenca, N. (2015). Astrocytes and Müller cell alterations during retinal degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(DEC). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00484>
- Fikadu, M., & Ashenafi, E. (2023). Malaria: An Overview. *Infection and Drug Resistance*, Volume 16, 3339–3347. <https://doi.org/10.2147/IDR.S405668>
- Fitzgerald, M., Nairn, P., Bartlett, C. A., Chung, R. S., West, A. K., & Beazley, L. D. (2007). Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Experimental Brain Research*, 183(2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/s00221-007-1032-y>

- 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).
- Fleischmann-Struzek, C., Mellhammar, L., Rose, N., Cassini, A., Rudd, K. E., Schlattmann, P., Allegranzi, B., & Reinhart, K. (2020). Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine*, 46(8), 1552–1562. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x>
- Frankowski, J. C., Foik, A. T., Tierno, A., Machhor, J. R., Lyon, D. C., & Hunt, R. F. (2021). Traumatic brain injury to primary visual cortex produces long-lasting circuit dysfunction. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02808-5>
- Froudarakis, E., Fahey, P. G., Reimer, J., Smirnakis, S. M., Tehovnik, E. J., & Tolias, A. S. (2019). The Visual Cortex in Context. *Annual Review of Vision Science*, 5(1), 317–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034407>
- Funahashi, Y., Park, S. H., Hebert, J. F., Eiwaz, M. B., Munhall, A. C., Groat, T., Zeng, L., Kim, J., Choi, H. S., & Hutchens, M. P. (2024). Nanotherapeutic kidney cell-specific targeting to ameliorate acute kidney injury. *Kidney International*, 106(4), 597–610. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2024.06.021>
- Galindo-Romero, C., Norte-Muñoz, M., Gallego-Ortega, A., Rodríguez-Ramírez, K. T., Lucas-Ruiz, F., González-Riquelme, M. J., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2022). The retina of the lab rat: focus on retinal ganglion cells and photoreceptors. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.994890>
- Galley, H. F. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 107, Issue 1, pp. 57–64). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bja/aer093>
- Ganesh, B. S., & Chintala, S. K. (2011). Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018305>
- Gao, Q., & Hernandez, M. S. (2021). Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction. In *Inflammation* (Vol. 44, Issue 6, pp. 2143–2150). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01501-3>
- García-Ayuso, D., Di Pierdomenico, J., Esquivá, G., Nadal-Nicolás, F. M., Pinilla, I., Cuenca, N., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2015). Inherited photoreceptor degeneration causes the death of melanopsin-positive retinal ganglion cells and increases their coexpression of brn3a. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(8), 4592–4604. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16808>
- Garrido, A., De La Serna, M., De La Fuente, M., Marco, E. M., & López-Gallardo, M. (2021). Neuronal and glial region dependent changes in female mice from a model of premature aging. *Experimental Gerontology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111224>
- Garrido-Cardenas, J. A., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*, 118(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>
- Ghazanfari, N., Mueller, S. N., & Heath, W. R. (2018). Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02016>
- Giribaldi, G., D'Alessandro, S., Prato, M., & Basilico, N. (2015). Etiopathogenesis and Pathophysiology of Malaria. In *Human and Mosquito Lysozymes* (pp. 1–18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09432-8_1

- Goffon, T. E., & Bryan Young, G. (2012). Sepsis-associated encephalopathy. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 8, Issue 10, pp. 557–566). <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.183>
- 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-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), 1585. <https://doi.org/10.3390/cells11091585>
- González-Nicolás González, M.Á. (2022). Cilastatina en la prevención y tratamiento del fracaso renal agudo parenquimatoso de origen endotóxico: sepsis y rabiomólisis.
- Gorbatyuk, O. S., Pitale, P. M., Saltykova, I. V., Dorofeeva, I. B., Zhykibayev, A. A., Athar, M., Fuchs, P. A., Samuels, B. C., & Gorbatyuk, M. S. (2022). A Novel Tree Shrew Model of Diabetic Retinopathy. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.799711>
- Gotts, J. E., & Matthay, M. A. (2016). Sepsis: Pathophysiology and clinical management. In *BMJ (Online)* (Vol. 353). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
- Gowda, D. C., & Wu, X. (2018). Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03006>
- Gozlan, E., Lewit-Cohen, Y., & Frenkel, D. (2024). Sex Differences in Astrocyte Activity. *Cells*, *13*(20), 1724. <https://doi.org/10.3390/cells13201724>
- Greiner, J., Dorovini-Zis, K., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Beare, N. A. V., Kamiza, S., & White, V. A. (2015). Correlation of hemorrhage, axonal damage, and blood-tissue barrier disruption in brain and retina of Malawian children with fatal cerebral malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00018>
- Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., & Nickerson, J. M. (2015). Introduction to the Retina. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *134*, 383–396. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.001>
- Gruss, E., Tomás, J. F., Bernis, C., Rodríguez, F., Traver, J. A., & Fernández-Rañada, J. M. (1996). Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantation*, *18*(4), 761–765.
- Gu, M., Mei, X. L., & Zhao, Y. N. (2021). Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 39, Issue 2, pp. 489–503). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00270-5>
- Guan, L., Li, C., Zhang, Y., Gong, J., Wang, G., Tian, P., & Shen, N. (2020). Puerarin ameliorates retinal ganglion cell damage induced by retinal ischemia/reperfusion through inhibiting the activation of TLR4/NLRP3 inflammasome. *Life Sciences*, *256*, 117935. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117935>
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). *NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker ABBREVIATIONS IHC-immunohistochemical analysis; NeuN-neuronal nuclear protein; shRNA-small hairpin RNA; MAP-2-microtubule-associated protein 2; GFAP-Glial Fibrillary Acidic Protein; TUNEL-Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP (2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate) Nick-End Labeling; BrdU-5-bromo-2'-deoxyuridine* (Vol. 7, Issue 2).

- Han, J., Cui, L., Yu, F., Wang, R., Yuan, H., & Hu, F. (2022). Megalin blockade with cilastatin ameliorates multiple wasp sting-induced acute kidney injury in rats. *Toxicon*, 220, 106960. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106960>
- Han, X., Chen, X., Chen, S., Luo, Q., Liu, X., He, A., He, S., Qiu, J., Chen, P., Wu, Y., Zhuang, J., Yang, M., Wu, C., Wu, N., Yang, Y., Ge, J., Zhuang, J., & Yu, K. (2020). Tetramethylpyrazine attenuates endotoxin-induced retinal inflammation by inhibiting microglial activation via the TLR4/NF- κ B signalling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110273>
- He, C., Sun, Y., Ren, X., Lin, Q., Hu, X., Huang, X., Su, S.-B., Liu, Y., & Liu, X. (2013). Angiogenesis Mediated by Toll-Like Receptor 4 in Ischemic Neural Tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2), 330–338. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300679>
- Heming, N., Mazeraud, A., Verdonk, F., Bozza, F. A., Chrétien, F., & Sharshar, T. (2017). Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. In *Critical Care* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1643-z>
- 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>
- Holecek, M. (2012). Muscle wasting in animal models of severe illness. *International Journal of Experimental Pathology*, 93(3), 157–171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00812.x>
- Hong, Y. A., Jung, S. Y., Yang, K. J., Im, D. S., Jeong, K. H., Park, C. W., & Hwang, H. S. (2020). Cilastatin Preconditioning Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury via Hypoxia Inducible Factor-1 α Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3583. <https://doi.org/10.3390/ijms21103583>
- Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2015). Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>
- 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>
- Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E., & Ferguson, T. A. (2009). The sepsis seesaw: Tilting toward immunosuppression. In *Nature Medicine* (Vol. 15, Issue 5, pp. 496–497). <https://doi.org/10.1038/nm0509-496>
- Huang, Z.-S., Xie, D.-Q., Xu, L.-J., Huang, C.-S., Zheng, M., Chen, Y.-J., & Cao, Y. (2020). Tetramethylpyrazine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Sepsis in Rats via Protecting Blood–Brain Barrier, Impairing Inflammation and Nitrous Oxide Systems. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.562084>
- Hübener, M. (2003). Mouse visual cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), 413–420. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00102-8)
- 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., Meng, Q., Wang, C., Wu, J., Wang, C., Zhu, Y., Ma, X., Sun, H., & Liu, K. (2020). Protective effect of cilastatin against diclofenac-induced nephrotoxicity through interaction with diclofenac acyl glucuronide via organic anion transporters. *British Journal of Pharmacology*, 177(9), 1933–1948. <https://doi.org/10.1111/bph.14957>
- Huo, X., Meng, Q., Wang, C., Zhu, Y., Liu, Z., Ma, X., Ma, X., Peng, J., Sun, H., & Liu, K. (2019). Cilastatin protects against imipenem-induced nephrotoxicity via inhibition of renal organic anion transporters (OATs). *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(5), 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.02.005>
- Idro, R., Marsh, K., John, C. C., & Newton, C. R. J. (2010). Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neurocognitive Outcome. *Pediatric Research*, 68(4), 267–274. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181eee738>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)
- Ito, S., & Feldheim, D. A. (2018). The mouse superior colliculus: An emerging model for studying circuit formation and function. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00010>
- Iwashyna, T. J., Netzer, G., Langa, K. M., & Cigolle, C. (2012). Spurious Inferences about Long-Term Outcomes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(8), 835–841. <https://doi.org/10.1164/rccm.201109-1660OC>
- 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), 821. <https://doi.org/10.3390/antiox9090821>
- Jang, S., Lee, J. H., Choi, K. R., Kim, D., Yoo, H. S., & Oh, S. (2007). Cytochemical alterations in the rat retina by LPS administration. *Neurochemical Research*, 32(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9215-7>
- Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis—Pathophysiology and Therapeutic Concepts. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.628302>
- Jenkins, R., Omollo, R., Ongecha, M., Sifuna, P., Othieno, C., Onger, L., Kingora, J., & Ogotu, B. (2015). Prevalence of malaria parasites in adults and its determinants in malaria endemic area of Kisumu County, Kenya. *Malaria Journal*, 14(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0781-5>
- Ji, W., Gămănuț, R., Bista, P., D'Souza, R. D., Wang, Q., & Burkhalter, A. (2015). Modularity in the Organization of Mouse Primary Visual Cortex. *Neuron*, 87(3), 632–643. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.004>
- 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>

- Jung, H., Lee, H., Kim, D., Cheong, E., Hyun, Y. M., Yu, J. W., & Um, J. W. (2022). Differential Regional Vulnerability of the Brain to Mild Neuroinflammation Induced by Systemic LPS Treatment in Mice. *Journal of Inflammation Research*, 15, 3053–3063. <https://doi.org/10.2147/JIR.S362006>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principios de neurociencia* (5.ª ed.). McGraw-Hill.
- Katsoulis, O., Georgiadou, A., & Cunningham, A. J. (2021). Immunopathology of Acute Kidney Injury in Severe Malaria. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651739>
- 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. *Visual Neuroscience*, 34, E008. <https://doi.org/10.1017/S0952523817000062>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khajevand-Khazaei, M. R., Azimi, S., Sedighnejad, L., Salari, S., Ghorbanpour, A., Baluchnejadmojarad, T., Mohseni-Moghaddam, P., Khamse, S., & Roghani, M. (2019). S-allyl cysteine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the C57BL/6 mouse strain: Involvement of oxidative stress and inflammation. *International Immunopharmacology*, 69, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.026>
- Khan, A., Okhravi, N., & Lightman, S. (2002). The eye in systemic sepsis. *Clinical Medicine*, 2(5), 444–448. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.2-5-444>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00044>
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., & Altman, D. (2010). Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 1(2), 94. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72351>
- Kirk, R. A., Kesner, R. P., Wang, L.-M., Wu, Q., Towner, R. A., Hoffman, J. M., & Morton, K. A. (2019). Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid- β plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits. *GeroScience*, 41(4), 467–481. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00089-9>
- Kokona, D., Ebnetter, A., Escher, P., & Zinkernagel, M. S. (2018). Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1373-4>
- 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. *Brain Research*, 608(2), 204–215. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91460-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91460-A)
- Kong, C., Wang, Y., & Xiao, G. (2023). Neuron populations across layer 2-6 in the mouse visual cortex exhibit different coding abilities in the awake mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1238777>
- 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. *The 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(1), 62–70. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.1.62>

- Kumar, A., & Shamsuddin, N. (2012). Retinal Muller Glia Initiate Innate Response to Infectious Stimuli via Toll-Like Receptor Signaling. *PLoS ONE*, 7(1), e29830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029830>
- Kumar, V. (2020). Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. In *International Immunopharmacology* (Vol. 89). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107087>
- Kurihara, T., Ozawa, Y., Shinoda, K., Nagai, N., Inoue, M., Oike, Y., Tsubota, K., Ishida, S., & Okano, H. (2006). Neuroprotective Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1R) Blocker, Telmisartan, via Modulating AT1R and AT2R Signaling in Retinal Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(12), 5545. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0478>
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- La Via, L., Sangiorgio, G., Stefani, S., Marino, A., Nunnari, G., Cocuzza, S., La Mantia, I., Cacopardo, B., Stracquadiano, S., Spampinato, S., Lavallo, S., & Maniaci, A. (2024). The Global Burden of Sepsis and Septic Shock. *Epidemiologia*, 5(3), 456–478. <https://doi.org/10.3390/epidemiologia5030032>
- Lackner, P., Beer, R., Heussler, V., Goebel, G., Rudzki, D., Helbok, R., Tannich, E., & Schmutzhard, E. (2006). Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 32(2), 177–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00706.x>
- Lakbar, I., Einav, S., Lalevée, N., Martin-Loeches, I., Pastene, B., & Leone, M. (2023). Interactions between Gender and Sepsis—Implications for the Future. *Microorganisms*, 11(3), 746. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030746>
- Lakhotia, M., Singh, J., Pahadiya, H. R., Kumar, H., & Choudhary, P. K. (2015). Retinal Hemorrhages in Severe Non-cerebral Plasmodium vivax Malaria in an Adult. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 9(6), OD01-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11930.6003>
- Lakkavaram, A., Lundie, R. J., Do, H., Ward, A. C., & de Koning-Ward, T. F. (2020). Acute Plasmodium berghei Mouse Infection Elicits Perturbed Erythropoiesis With Features That Overlap With Anemia of Chronic Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00702>
- Langhorne, J., Buffet, P., Galinski, M., Good, M., Harty, J., Leroy, D., Mota, M. M., Pasini, E., Renia, L., Riley, E., Stins, M., & Duffy, P. (2011). The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. *Malaria Journal*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-23>
- Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(6), 1345–1351. <https://doi.org/10.1189/jlb.0207114>
- Łątkowska, M., Gajdzis, M., Turno-Kręcicka, A., Kręcicka, J., Mimier-Janczak, M., Górczyńska, I., & Kaczmarek, R. (2024). Sudden Vision Loss as the First Sign of Sepsis—Bilateral Endogenous Endophthalmitis of Uncommon Capnocytophaga canimorsus Etiology. *Medicina*, 60(6), 896. <https://doi.org/10.3390/medicina60060896>
- Lau, A., Rahn, J. J., Chappellaz, M., Chung, H., Benediktsson, H., Bihan, D., von Mässenhausen, A., Linkermann, A., Jenne, C. N., Robbins, S. M., Senger, D. L., Lewis, I. A., Chun, J., & Muruve, D. A. (2022). Dipeptidase-1 governs renal inflammation during ischemia reperfusion injury. *Science Advances*, 8(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm0142>
- Lawrence, P. M., & Studholme, K. M. (2014). Retinofugal projections in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 522(16), 3733–3753. <https://doi.org/10.1002/cne.23635>

- Lee, K. H., Tran, A., Turan, Z., & Meister, M. (2020). The sifting of visual information in the superior colliculus. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.50678>
- Leinonen, H., & Tanila, H. (2018). Vision in laboratory rodents—Tools to measure it and implications for behavioral research. *Behavioural Brain Research*, 352, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.040>
- Lenz, K. M., & McCarthy, M. M. (2015). A Starring Role for Microglia in Brain Sex Differences. *The Neuroscientist*, 21(3), 306–321. <https://doi.org/10.1177/1073858414536468>
- Lewallen, S., Bakker, H., Taylor, T. E., Wills, B. A., Courtright, P., & Molyneux, M. E. (1996). Retinal findings predictive of outcome in cerebral malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 144–146. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90116-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90116-9)
- Lewallen, S., White, V. A., Whitten, R. O., Gardiner, J., Hoar, B., Lindley, J., Lochhead, J., McCormick, A., Wade, K., Tembo, M., Mwenechanyana, J., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2000). Clinical-histopathological correlation of the abnormal retinal vessels in cerebral malaria. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 118(7), 924–928.
- Li, B., Liu, C., Tang, K., Dong, X., Xue, L., Su, G., Zhang, W., & Jin, Y. (2019). Aquaporin-1 attenuates macrophage-mediated inflammatory responses by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Inflammation Research*, 68(12), 1035–1047. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01285-1>
- Li, W., Liu, X., Tu, Y., Ding, D., Yi, Q., Sun, X., Wang, Y., Wang, K., Zhu, M., & Mao, J. (2020). Dysfunctional Nurr1 promotes high glucose-induced Müller cell activation by up-regulating the NF- κ B/NLRP3 inflammasome axis. *Neuropeptides*, 82, 102057. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102057>
- Li, X., Gu, X., Boyce, T. M., Zheng, M., Reagan, A. M., Qi, H., Mandal, N., Cohen, A. W., Callegan, M. C., Carr, D. J. J., & Elliott, M. H. (2014). Caveolin-1 increases proinflammatory chemoattractants and blood–retinal barrier breakdown but decreases leukocyte recruitment in inflammation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(10), 6224–6234. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14613>
- Li, Y., Ji, M., & Yang, J. (2022). Current Understanding of Long-Term Cognitive Impairment After Sepsis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855006>
- Liang, F., Xiong, X. R., Zingg, B., Ji, X., 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>
- 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>
- Lin, F.-L., Ho, J.-D., Cheng, Y.-W., Chiou, G. C. Y., Yen, J.-L., Chang, H.-M., Lee, T.-H., & Hsiao, G. (2018). Theissenolactone C Exhibited Ocular Protection of Endotoxin-Induced Uveitis by Attenuating Ocular Inflammatory Responses and Glial Activation. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00326>
- Liu, X., Huang, H., Snutch, T. P., Cao, P., Wang, L., & Wang, F. (2022). The Superior Colliculus: Cell Types, Connectivity, and Behavior. *Neuroscience Bulletin*, 38(12), 1519–1540. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00858-1>

- Livne-Bar, I., Maurya, S., Gronert, K., & Sivak, J. M. (2024). Lipoxins A4 and B4 inhibit glial cell activation via CXCR3 signaling in acute retinal neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 21(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03010-0>
- Lobanovskaya, N., Jürgenson, M., Aonurm-Helm, A., & Zharkovsky, A. (2018). Alterations in the polysialylated neural cell adhesion molecule and retinal ganglion cell density in mice with diabetic retinopathy. *International Journal of Ophthalmology*, 11(10), 1608–1615. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.10.06>
- Lopes, L. N., Folha Santos, F. A., Marques Oliveira, L. C., Ferreira Araujo, M. T., Sequeira, C. G., Libonati, R. M. F., & Revoredo da Silva Ventura, A. M. (2016). An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c mice infected with Plasmodium berghei. *Microbial Pathogenesis*, 90, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.020>
- 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>
- Lu, B.-W., Liang, Y.-X., Liu, J.-F., Sun, Z.-Q., So, K.-F., & Chiu, K. (2023). Retinal safety and toxicity study of artesunate in vitro and in vivo. *Advances in Ophthalmology Practice and Research*, 3(2), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.aopr.2022.11.003>
- Lund, R. D. (1969). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 135(2), 179–207. <https://doi.org/10.1002/cne.901350205>
- Lund, R. D., Lund, J. S., & Wise, R. P. (1974). The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. *Journal of Comparative Neurology*, 158(4), 383–403. <https://doi.org/10.1002/cne.901580403>
- Lv, W., Xue, L., liang, L., Liu, D., Li, C., Liao, J., & Jin, Y. (2023). Endotoxin induced acute kidney injury modulates expression of AQP1, P53 and P21 in rat kidney, heart, lung and small intestine. *PLOS ONE*, 18(7), e0288507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288507>
- Ma, N., Hunt, N. H., Madigan, M. C., & Chan-Ling, T. (1996). Correlation between enhanced vascular permeability, up-regulation of cellular adhesion molecules and monocyte adhesion to the endothelium in the retina during the development of fatal murine cerebral malaria. *The American Journal of Pathology*, 149(5), 1745–1762.
- MacCormick, I. J. C., Beare, N. A. V., Taylor, T. E., Barrera, V., White, V. A., Hiscott, P., Molyneux, M. E., Dhillon, B., & Harding, S. P. (2014). Cerebral malaria in children: using the retina to study the brain. *Brain*, 137(8), 2119–2142. <https://doi.org/10.1093/brain/awu001>
- Markewitz, A., Hammer, C., Pfeiffer, M., Zahn, S., Drechsel, J., Reichenspurner, H., & Reichart, B. (1994). Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation*, 57(6), 865–870. <https://doi.org/10.1097/00007890-199403270-00017>
- Martersteck, E. M., Hirokawa, K. E., Everts, 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>
- Martín Sánchez B. (2024). Alteraciones neuronales y gliales asociadas al tratamiento con el quimioterápico cisplatino: abordajes terapéuticos.
- 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). <https://doi.org/10.3390/ijms25063115>
- Marzolo, M.-P., & Farfán, P. (2011). New Insights into the Roles of Megalin/LRP2 and the Regulation of its Functional Expression. *Biological Research*, 44(1), 89–105. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602011000100012>
- Masson, G. S., Nair, A. R., Dange, R. B., Silva-Soares, P. P., Michelini, L. C., & Francis, J. (2015). Toll-like receptor 4 promotes autonomic dysfunction, inflammation and microglia activation in the hypothalamic paraventricular nucleus: Role of endoplasmic reticulum stress. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122850>
- Matsushita, K., Mori, K., Saritas, T., Eiwaz, M. B., Funahashi, Y., Nickerson, M. N., Hebert, J. F., Munhall, A. C., McCormick, J. A., Yanagita, M., & Hutchens, M. P. (2021). Cilastatin Ameliorates Rhabdomyolysis-induced AKI in Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*, 32(10), 2579–2594. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020030263>
- Maude, R. J., Beare, N. A. V., Sayeed, A. A., Chang, C. C., Charunwatthana, P., Faiz, M. A., Hossain, A., Yunus, E. Bin, Hoque, M. G., Hasan, M. U., White, N. J., Day, N. P. J., & Dondorp, A. M. (2009). The spectrum of retinopathy in adults with Plasmodium falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.03.001>
- Maude, R. J., Kingston, H. W. F., Joshi, S., Mohanty, S., Mishra, S. K., White, N. J., & Dondorp, A. M. (2014). Reversibility of Retinal Microvascular Changes in Severe Falciparum Malaria. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 493–495. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0116>
- McCurry, C. M., Sunilkumar, S., Subrahmanian, S. M., Yerlikaya, E. I., Toro, A. L., VanCleave, A. M., Stevens, S. A., Barber, A. J., Sundstrom, J. M., & Dennis, M. D. (2024). NLRP3 Inflammasome Priming in the Retina of Diabetic Mice Requires REDD1-Dependent Activation of GSK3 β . *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 65(3), 34. <https://doi.org/10.1167/iovs.65.3.34>
- Medana, I. M., Chan-Ling, T., & Hunt, N. H. (1996). Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: Relationship to disruption of the blood-retinal barrier. *Glia*, 16(1), 51–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199601\)16:1<51::AID-GLIA6>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199601)16:1<51::AID-GLIA6>3.0.CO;2-E)
- Medana, I. M., Chan-Ling, T., & Hunt, N. H. (2000). Reactive Changes of Retinal Microglia during Fatal Murine Cerebral Malaria. *The American Journal of Pathology*, 156(3), 1055–1065. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64973-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64973-5)
- Medana, I. M., Hunt, N. H., & Chan-Ling, T. (1997). Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. *Glia*, 19(2), 91–103. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199702\)19:2<91::AID-GLIA1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199702)19:2<91::AID-GLIA1>3.0.CO;2-C)
- Medana, I. M., Hunt, N. H., & Chaudhri, G. (1997). Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *The American Journal of Pathology*, 150(4), 1473–1486.
- Milde, S., van Tartwijk, F. W., Vilalta, A., Hornik, T. C., Dundee, J. M., Puigdellívol, M., & Brown, G. C. (2021). Inflammatory neuronal loss in the substantia nigra induced by systemic lipopolysaccharide is prevented by knockout of the P2Y6 receptor in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02280-2>
- Miller, S. J. (2018). Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401>

- Milner, D. A. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), a025569. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Miranda, A. S., Brant, F., Rocha, N. P., Cisalpino, D., Rodrigues, D. H., Souza, D. G., Machado, F. S., Rachid, M. A., Teixeira Jr, A. L., & Campos, A. C. (2013). Further evidence for an anti-inflammatory role of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malaria Journal*, 12(1), 388. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-388>
- Mogaka, S., Mulei, I., Njoki, P., Ogila, K., Waihenya, R., Onditi, F., & Ozwara, H. (2023). Antimalarial Efficacy and Safety of Senna occidentalis (L.) Link Root Extract in Plasmodium berghei-Infected BALB/c Mice. *BioMed Research International*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8296195>
- 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., González-Nicolás, M. Á., Lázaro, A., Barbas, C., Gómez-Gómez, M. M., & López-González, Á. (2024). Untargeted metabolomics analysis of serum and urine unveils the protective effect of cilastatin on altered metabolic pathways during cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochemical Pharmacology*, 227, 116435. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116435>
- Mukherjee, S., Ray, G., Saha, B., & Kar, S. K. (2022). Oral Therapy Using a Combination of Nanotized Antimalarials and Immunomodulatory Molecules Reduces Inflammation and Prevents Parasite Induced Pathology in the Brain and Spleen of P. berghei ANKA Infected C57BL/6 Mice. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.819469>
- 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>
- Murenu, E., Gerhardt, M. J., Biel, M., & Michalakakis, S. (2022). More than meets the eye: The role of microglia in healthy and diseased retina. In *Frontiers in immunology* (Vol. 13, p. 1006897). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1006897>
- Muthuswamy, A., Chen, H., Hu, Y., Turner, O. C., & Aina, O. H. (2021). Mammalian Retinal Cell Quantification. *Toxicologic Pathology*, 49(3), 505–520. <https://doi.org/10.1177/0192623320976375>
- 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>
- Nakano, D., Doi, K., Kitamura, H., Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., & Nishiyama, A. (2015). Reduction of Tubular Flow Rate as a Mechanism of Oliguria in the Early Phase of Endotoxemia Revealed by Intravital Imaging. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(12), 3035–3044. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014060577>
- Nakano, D., Kitada, K., Wan, N., Zhang, Y., Wiig, H., Wararat, K., Yanagita, M., Lee, S., Jia, L., Titze, J. M., & Nishiyama, A. (2020). Lipopolysaccharide induces filtrate leakage from renal tubular lumina into the interstitial space via a proximal tubular Toll-like receptor 4-dependent pathway and limits sensitivity to fluid therapy in mice. *Kidney International*, 97(5), 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.11.024>
- Nandi, M., Jackson, S. K., Macrae, D., Shankar-Hari, M., Tremoleda, J. L., & Lilley, E. (2020). Rethinking animal models of sepsis - Working towards improved clinical translation whilst integrating the 3Rs. In *Clinical Science* (Vol. 134, Issue 13, pp. 1715–1734). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20200679>

- Nanfack, C. N., Bilong, Y., Kagmeni, G., Nathan, N. N., & Bella, L. A. (2017). Malarial retinopathy in adult: a case report. *Pan African Medical Journal*, 27. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.27.224.11026>
- Narayanan, R. T., Udvary, D., & Oberlaender, M. (2017). Cell type-specific structural organization of the six layers in rat barrel cortex. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00091>
- Nedeva, C., Menassa, J., & Puthalakath, H. (2019). Sepsis: Inflammation is a necessary evil. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00108>
- Neill, A. L., Chan-Ling, T., & Hunt, N. H. (1993). Comparisons between microvascular changes in cerebral and non-cerebral malaria in mice, using the retinal whole-mount technique. *Parasitology*, 107(5), 477–487. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068050>
- Nigam, S. K., Bush, K. T., Martovetsky, G., Ahn, S.-Y., Liu, H. C., Richard, E., Bhatnagar, V., & Wu, W. (2015). The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiological Reviews*, 95(1), 83–123. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2013>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Nishanth, G., & Schlüter, D. (2019). Blood–Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends in Parasitology*, 35(7), 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.010>
- Noailles, A., Maneu, V., Campello, L., Lax, P., & Cuenca, N. (2018). Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death and Disease*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0355-x>
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *GLIA*, 64(2), 300–316. <https://doi.org/10.1002/glia.22930>
- Norrby, S. R., Alestig, K., Björnegård, B., Burman, L. Å., 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(2), 300–307. <https://doi.org/10.1128/AAC.23.2.300>
- Oelschlegel, A. M., Bhattacharjee, R., Wenk, P., Harit, K., Rothkötter, H.-J., Koch, S. P., Boehm-Sturm, P., Matuschewski, K., Budinger, E., Schlüter, D., Goldschmidt, J., & Nishanth, G. (2024). Beyond the microcirculation: sequestration of infected red blood cells and reduced flow in large draining veins in experimental cerebral malaria. *Nature Communications*, 15(1), 2396. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46617-w>
- Okigawa, S., Yamaguchi, M., Ito, K. N., Takeuchi, R. F., Morimoto, N., & Osakada, F. (2021). Cell type- and layer-specific convergence in core and shell neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 529(8), 2099–2124. <https://doi.org/10.1002/cne.25075>
- Olesen, E. T. B., de Seigneux, S., Wang, G., Lutken, S. C., Frokiaer, J., Kwon, T.-H., & Nielsen, S. (2009). Rapid and segmental specific dysregulation of AQP2, S256-pAQP2 and renal sodium transporters in rats with LPS-induced endotoxaemia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(8), 2338–2349. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp011>

- Oliveira, K. R. H. M., Kauffmann, N., Leão, L. K. R., Passos, A. C. F., Rocha, F. A. F., Herculano, A. M., & Do Nascimento, J. L. M. (2017). Cerebral malaria induces electrophysiological and neurochemical impairment in mice retinal tissue: Possible effect on glutathione and glutamatergic system. *Malaria Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2083-6>
- Opal, S. M., Scannon, P. J., Vincent, J.-L., White, M., Carroll, S. F., Palardy, J. E., Parejo, N. A., Pribble, J. P., & Lemke, J. H. (1999). Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. In *The Journal of Infectious Diseases* (Vol. 180). <https://academic.oup.com/jid/article/180/5/1584/806863>
- Ortíz Adaro, A. (2006). Anatomía comparada de la corteza cerebral occipital, en dos especies de octodones. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130959>
- Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P. M., Chidlow, G., Graham, M., & Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(1), 91–147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>
- Pan, S., Lv, Z., Wang, R., Shu, H., Yuan, S., Yu, Y., & Shang, Y. (2022). Sepsis-Induced Brain Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/1328729>
- Paquet-Durand, F., Beck, S. C., Das, S., Huber, G., Le Chang, Schubert, T., Tanimoto, N., Garcia-Garrido, M., Mühlfriedel, R., Bolz, S., Hoffmann, W., Schraermeyer, U., Mordmüller, B., & Seeliger, M. W. (2019). A retinal model of cerebral malaria. *Scientific Reports*, 9(1), 3470. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39143-z>
- Park, M.-K., Ko, E.-J., Jeon, K.-Y., Kim, H., Jo, J.-O., Baek, K.-W., Kang, Y.-J., Choi, Y. H., Hong, Y., Ock, M. S., & Cha, H.-J. (2019). Induction of Angiogenesis by Malarial Infection through Hypoxia Dependent Manner. *The Korean Journal of Parasitology*, 57(2), 117–125. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.2.117>
- Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2001). Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. *Biochemical Journal*, 358(1), 209. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580209>
- Patel, S. C., Smith, S. M., Kessler, A. T., & Bhatt, A. A. (2021). Imaging of the primary visual pathway based on visual deficits. *Journal of Clinical Imaging Science*, 11(1). https://doi.org/10.25259/JCIS_12_2021
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition. Elsevier
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition. Elsevier
- Peerapornratana, S., Manrique-Caballero, C. L., Gómez, H., & Kellum, J. A. (2019). Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney International*, 96(5), 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.05.026>
- Percie du Sert, N., 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), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- 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>

- Perkins, D. J., Were, T., Davenport, G. C., Kempaiah, P., Hittner, J. B., & Ong'echa, J. M. (2011). Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1427–1442. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1427>
- Perry, V. H., & Cowey, A. (1984). Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*, 12(4), 1125–1137. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90007-1)
- Perry, V. H., Oehler, R., & Cowey, A. (1984). Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience*, 12(4), 1101–1123. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90006-X)
- Peters, A., Kara, D. A., & Harriman, K. M. (1985). The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. III. Numerical considerations. *Journal of Comparative Neurology*, 238(3), 263–274. <https://doi.org/10.1002/cne.902380303>
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Research Reviews*, 46(1), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Possemiers, H., Vandermosten, L., & Van den Steen, P. E. (2021). Etiology of lactic acidosis in malaria. *PLOS Pathogens*, 17(1), e1009122. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009122>
- Potter, S., Chan-Ling, T., Ball, H. J., Mansour, H., Mitchell, A., Maluish, L., & Hunt, N. H. (2006). Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *International Journal for Parasitology*, 36(4), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.12.005>
- Priebe, N. J., & McGee, A. W. (2014). Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 8, Issue OCT). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00123>
- Pronin, A., Pham, D., An, W., Dvorianchikova, G., Reshetnikova, G., Qiao, J., Kozhekbaeva, Z., Reiser, A. E., Slepak, V. Z., & Shestopalov, V. I. (2019). Inflammasome Activation Induces Pyroptosis in the Retina Exposed to Ocular Hypertension Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00036>
- Provis, J. M., Diaz, C. M., & Penfold, P. L. (1996). Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 3(3), 213–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931095>
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., & Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *GLIA*, 55(5), 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>
- Quaresima, V., Agbenyega, T., Oppong, B., Awunyo, J. A. D. A., Adu Adomah, P., Enty, E., Donato, F., & Castelli, F. (2021). Are Malaria Risk Factors Based on Gender? A Mixed-Methods Survey in an Urban Setting in Ghana. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(3), 161. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030161>
- Rameshrad, M., Soraya, H., Maleki-Dizaji, N., Vaez, H., & Garjani, A. (2016). A-769662, a direct AMPK activator, attenuates lipopolysaccharide-induced acute heart and lung inflammation in rats. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2843–2849. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4821>
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Ortín-Martínez, A., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2010). Quantification of the Effect of Different Levels of IOP in the Astroglia of the Rat Retina Ipsilateral and Contralateral to Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(11), 5690. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5248>

- Ramirez, J. M., Triviño, A., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., & Garcia-Sanchez, J. (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Research*, 34(15), 1935–1946. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90024-8)
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* (vol. 1).
- 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. *Annual Review of Vision Science*, 7(1), 389–415. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-093019-113212>
- Reese, B. E. (1988). ‘Hidden lamination’ in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Research Reviews*, 13(2), 119–137. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(88\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(88)90017-3)
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2010). *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1672-3>
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2020). Glia of the human retina. *Glia*, 68(4), 768–796. <https://doi.org/10.1002/glia.23727>
- Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., & Finfer, S. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *New England Journal of Medicine*, 377(5), 414–417. <https://doi.org/10.1056/nejmp1707170>
- Ren, J. L., Yu, Q. X., Liang, W. C., Leung, P. Y., Ng, T. K., Chu, W. K., Pang, C. P., & Chan, S. O. (2018). Green tea extract attenuates LPS-induced retinal inflammation in rats. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18888-5>
- Resulaj, A. (2021). Projections of the Mouse Primary Visual Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.751331>
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 10, pp. 776–787). <https://doi.org/10.1038/nri2402>
- Rodríguez-Ramírez, K. T., Norte-Muñoz, M., Lucas-Ruiz, F., Gallego-Ortega, A., Calzaferrí, F., García-Bernal, D., Martínez, C. M., Galindo-Romero, C., de los Ríos, C., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2024). Retinal response to systemic inflammation differs between sexes and neurons. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1340013>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kisson, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 395(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- Sachot, C., Poole, S., & Luheshi, G. N. (2004). Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *The Journal of Physiology*, 561(1), 263–272. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074351>
- Saggu, R., Faille, D., Grau, G. E., Cozzone, P. J., & Viola, A. (2011). In the Eye of Experimental Cerebral Malaria. *The American Journal of Pathology*, 179(3), 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.044>
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). A computerized analysis of the entire

- retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Research*, 49(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.09.029>
- 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>
- Sandiego, C. M., Gallezot, J.-D., Pittman, B., Nabulsi, N., Lim, K., Lin, S.-F., Matuskey, D., Lee, J.-Y., O'Connor, K. C., Huang, Y., Carson, R. E., Hannestad, J., & Cosgrove, K. P. (2015). Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40), 12468–12473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511003112>
- Sapienza, A., Raveu, A. L., Reboussin, E., Roubeix, C., Boucher, C., Dégardin, J., Godefroy, D., Rostène, W., Reaux-Le Goazigo, A., Baudouin, C., & Melik Parsadaniantz, S. (2016). Bilateral neuroinflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0509-7>
- Sarkar, S., Keswani, T., Sengupta, A., Mitra, S., & Bhattacharyya, A. (2017). Differential modulation of glial cell mediated neuroinflammation in Plasmodium berghei ANKA infection by TGF β and IL 6. *Cytokine*, 99, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.07.026>
- Schofield, L., & Grau, G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 5(9), 722–735. <https://doi.org/10.1038/nri1686>
- 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>
- Semmler, A., Frisch, C., Debeir, T., Ramanathan, M., Okulla, T., Klockgether, T., & Heneka, M. T. (2007). Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Experimental Neurology*, 204(2), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.01.003>
- Semmler, A., Hermann, S., Mormann, F., Weberpals, M., Paxian, S. A., Okulla, T., Schäfers, M., Kummer, M. P., Klockgether, T., & Heneka, M. T. (2008). Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *Journal of Neuroinflammation*, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-38>
- Semmler, A., Okulla, T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., & Heneka, M. T. (2005). Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 30(2–3), 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.07.003>
- Shang, C., Liu, Z., Chen, Z., Shi, Y., Wang, Q., Liu, S., Li, D., & Cao, P. (2015). A parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice. *Science*, 348(6242), 1472–1477. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8694>
- Shayan, M., & Elyasi, S. (2020). Cilastatin as a protective agent against drug-induced nephrotoxicity: a literature review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 19(8), 999–1010. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1796967>
- 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.jpsh.2020.12.009>
- Shulyatnikova, T., & Verkhatsky, A. (2020). Astroglia in Sepsis Associated Encephalopathy. In *Neurochemical Research* (Vol. 45, Issue 1, pp. 83–99). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02743-2>

- Silamut, K., Phu, N. H., Whitty, C., Turner, G. D. H., Louwrier, K., Mai, N. T. H., Simpson, J. A., Hien, T. T., & White, N. J. (1999). A Quantitative Analysis of the Microvascular Sequestration of Malaria Parasites in the Human Brain. *The American Journal of Pathology*, *155*(2), 395–410. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65136-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65136-X)
- Silva, L. S., Peruchetti, D. B., Silva-Aguiar, R. P., Abreu, T. P., Dal-Cheri, B. K. A., Takiya, C. M., Souza, M. C., Henriques, M. G., Pinheiro, A. A. S., & Caruso-Neves, C. (2018). The angiotensin II/AT1 receptor pathway mediates malaria-induced acute kidney injury. *PLoS ONE*, *13*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203836>
- Silverman, S. M., & Wong, W. T. (2018). Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annual Review of Vision Science*, *4*(1), 45–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425>
- Simião, G. M., Parreira, K. S., Klein, S. G., Ferreira, F. B., Freitas, F. de S., Silva, E. F. da, Silva, N. M., Silva, M. V. da, & Lima, W. R. (2024). Involvement of Inflammatory Cytokines, Renal NaPi-IIa Cotransporter, and TRAIL Induced-Apoptosis in Experimental Malaria-Associated Acute Kidney Injury. *Pathogens*, *13*(5), 376. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050376>
- Simkiene, J., Pranskuniene, Z., Patasius, M., Trumpaitis, J., Boerma, E. C., & Pranskunas, A. (2020). Alterations of retinal vessels in patients with sepsis. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, *34*(5), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s10877-019-00401-0>
- Simmons, P. A., Lemmon, V., & Pearlman, A. L. (1982). Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *Journal of Comparative Neurology*, *211*(3), 295–308. <https://doi.org/10.1002/cne.902110308>
- Simon, D. K., & O’Leary, D. D. M. (1991). Relationship of retinotopic ordering of axons in the optic pathway to the formation of visual maps in central targets. *Journal of Comparative Neurology*, *307*(3), 393–404. <https://doi.org/10.1002/cne.903070305>
- Simwela, N. V., & Waters, A. P. (2022). Current status of experimental models for the study of malaria. *Parasitology*, *149*(6), 729–750. <https://doi.org/10.1017/S0031182021002134>
- Singer, M. (2014). The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. In *Virulence* (Vol. 5, Issue 1, pp. 66–72). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.26907>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 315, Issue 8, pp. 801–810). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Skelly, D. T., Hennessy, E., Dansereau, M. A., & Cunningham, C. (2013). A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF- α and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069123>
- Storm, T., Burgoyne, T., Dunaief, J. L., Christensen, E. I., Futter, C., & Nielsen, R. (2019). Selective Ablation of Megalin in the Retinal Pigment Epithelium Results in Megaophthalmos, Macromelanosome Formation and Severe Retina Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *60*(1), 322. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25667>
- Strangward, P., Haley, M. J., Albornoz, M. G., Barrington, J., Shaw, T., Dookie, R., Zeef, L., Baker, S. M., Winter, E., Tzeng, T.-C., Golenbock, D. T., Cruickshank, S. M., Allan, S. M., Craig, A., Liew, F. Y., Brough, D., & Couper, K. N. (2018). Targeting the IL33–NLRP3 axis improves therapy for experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(28), 7404–7409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801737115>

- Strangward, P., Haley, M. J., Shaw, T. N., Schwartz, J.-M., Greig, R., Mironov, A., de Souza, J. B., Cruickshank, S. M., Craig, A. G., Milner, D. A., Allan, S. M., & Couper, K. N. (2017). A quantitative brain map of experimental cerebral malaria pathology. *PLOS Pathogens*, *13*(3), e1006267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006267>
- Sugiyama, S., Sasaki, T., Tanaka, H., Yan, H., Ikegami, T., Kanki, H., Nishiyama, K., Beck, G., Gon, Y., Okazaki, S., Todo, K., Tamura, A., Tsukita, S., & Mochizuki, H. (2023). The tight junction protein occludin modulates blood–brain barrier integrity and neurological function after ischemic stroke in mice. *Scientific Reports*, *13*(1), 2892. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29894-1>
- Sweis, R., Ortiz, J., & Biller, J. (2016). Neurology of Sepsis. In *Current Neurology and Neuroscience Reports* (Vol. 16, Issue 3, pp. 1–10). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0623-z>
- Tang, B. M., Huang, S. J., & McLean, A. S. (2010). Genome-wide transcription profiling of human sepsis: A systematic review. *Critical Care*, *14*(6). <https://doi.org/10.1186/cc9392>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Taylor, T. E., Fu, W. J., Carr, R. A., Whitten, R. O., Mueller, J. S., Fosiko, N. G., Lewallen, S., Liomba, N. G., & Molyneux, M. E. (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature Medicine*, *10*(2), 143–145. <https://doi.org/10.1038/nm986>
- Tonelli, L. H., & Postolache, T. T. (2005). Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge. In *Neurological Research* (Vol. 27, Issue 7, pp. 679–684). <https://doi.org/10.1179/016164105X49463>
- Towner, R. A., Saunders, D., Smith, N., Towler, W., Cruz, M., Do, S., Maher, J. E., Whitaker, K., Lerner, M., & Morton, K. A. (2018). Assessing long-term neuroinflammatory responses to encephalopathy using MRI approaches in a rat endotoxemia model. *GeroScience*, *40*(1), 49–60. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0009-z>
- Tsioti, I., Steiner, B. L., Escher, P., Zinkernagel, M. S., Benz, P. M., & Kokona, D. (2023). Endothelial Toll-like receptor 4 is required for microglia activation in the murine retina after systemic lipopolysaccharide exposure. *Journal of Neuroinflammation*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02712-1>
- Van den Steen, P. E., Deroost, K., Deckers, J., Van Herck, E., Struyf, S., & Opendakker, G. (2013). Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in Parasitology*, *29*(7), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.006>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 60, pp. 1–12). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Varo, R., Chaccour, C., & Bassat, Q. (2020). Update on malaria. *Medicina Clínica*, *155*(9), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.05.010>
- 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>
- Velagapudi, R., Kosoko, A. M., & Olajide, O. A. (2019). Induction of Neuroinflammation and Neurotoxicity by Synthetic Hemozoin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(8), 1187–1200. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00713-4>

- Verma, A., & Krishna, M. (2015). To report a case of unilateral proliferative retinopathy following noncerebral malaria with Plasmodium falciparum in Southern India. *Indian Journal of Ophthalmology*, 63(1), 63. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.151475>
- Vincent, J.-L. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, 302(21), 2323. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
- Virzì, G. M., Mattiotti, M., de Cal, M., Ronco, C., Zanella, M., & De Rosa, S. (2022). Endotoxin in Sepsis: Methods for LPS Detection and the Use of Omics Techniques. *Diagnostics*, 13(1), 79. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13010079>
- 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>
- Wang, M., & Wong, W. T. (2014). Microglia-Müller cell interactions in the retina. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801, 333–338. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_42
- White, N. J. (2022). Severe malaria. *Malaria Journal*, 21(1), 284. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04301-8>
- World Health Assembly. (2017). WHA70.7. Seventieth World Health Assembly, Geneva, 22-31 May 2017. From http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_R7-en.pdf
- World Health Organization. (2023). World Malaria Report 2023. World Health Organization. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>
- Wilson, K. J., Dhalla, A., Meng, Y., Tu, Z., Zheng, Y., Mhango, P., Seydel, K. B., & Beare, N. A. V. (2023). Retinal imaging technologies in cerebral malaria: a systematic review. *Malaria Journal*, 22(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04566-7>
- Wu, N., Luo, Q., Huang, Y., Wan, L., Hou, X., Jiang, Z., Li, Y., Qiu, J., Chen, P., Yu, K., Zhuang, J., & Yang, Y. (2023). Lithium Chloride Exerts Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects by Inhibiting Microglial Activation in LPS-Induced Retinal Injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 64(3). <https://doi.org/10.1167/iovs.64.3.35>
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., Yoshioka, T., C Hendry, S. H., Eddy, R. L., Shows, T. B., & Nathans, J. (1995). The Brn-3 Family of POU-Domain Factors: Primary Structure, Binding Specificity, and Expression in Subsets of Retinal Ganglion Cells and Somatosensory Neurons. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 15, Issue 7).
- Xin, Y., Tian, M., Deng, S., Li, J., Yang, M., Gao, J., Pei, X., Wang, Y., Tan, J., Zhao, F., Gao, Y., & Gong, Y. (2023). The Key Drivers of Brain Injury by Systemic Inflammatory Responses after Sepsis: Microglia and Neuroinflammation. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 60, Issue 3, pp. 1369–1390). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03148-z>
- Yang, Q. qiao, & Zhou, J. wei. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 6, pp. 1017–1035). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Yoshida, M., Yokokura, S., Nishida, T., Mochizuki, K., Suzuki, T., Maruyama, K., Otomo, T., Nishiguchi, K. M., Kunikata, H., & Nakazawa, T. (2020). Endogenous endophthalmitis caused by group B streptococcus; case reports and review of 35 reported cases. *BMC Ophthalmology*, 20(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01378-0>
- 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), 1239. <https://doi.org/10.3390/ijms22031239>
- Zajchowski, L. D., & Robbins, S. M. (2002). Lipid rafts and little caves. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 737–752. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02715.x>
- 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. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 530–546. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>
- Zeppieri, M., Marsili, S., Enaholo, E. S., Shuaibu, A. O., Uwagboe, N., Salati, C., Spadea, L., & Musa, M. (2023). Optical Coherence Tomography (OCT): A Brief Look at the Uses and Technological Evolution of Ophthalmology. *Medicina (Lithuania)*, 59(12). <https://doi.org/10.3390/medicina59122114>
- Zhang, Y., Jiao, Y., Li, X., Gao, S., Zhou, N., Duan, J., & Zhang, M. (2021). Pyroptosis: A New Insight Into Eye Disease Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797110>
- Zhang, Y., Xu, Y., Sun, Q., Xue, S., Guan, H., & Ji, M. (2019). Activation of P2X7R- NLRP3 pathway in Retinal microglia contribute to Retinal Ganglion Cells death in chronic ocular hypertension (COH). *Experimental Eye Research*, 188, 107771. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107771>
- Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., & Zhu, L. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>
- Zhu, X., Liu, J., Feng, Y., Pang, W., Qi, Z., Jiang, Y., Shang, H., & Cao, Y. (2015). Phenylhydrazine administration accelerates the development of experimental cerebral malaria. *Experimental Parasitology*, 156, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.011>

ANEXO 1

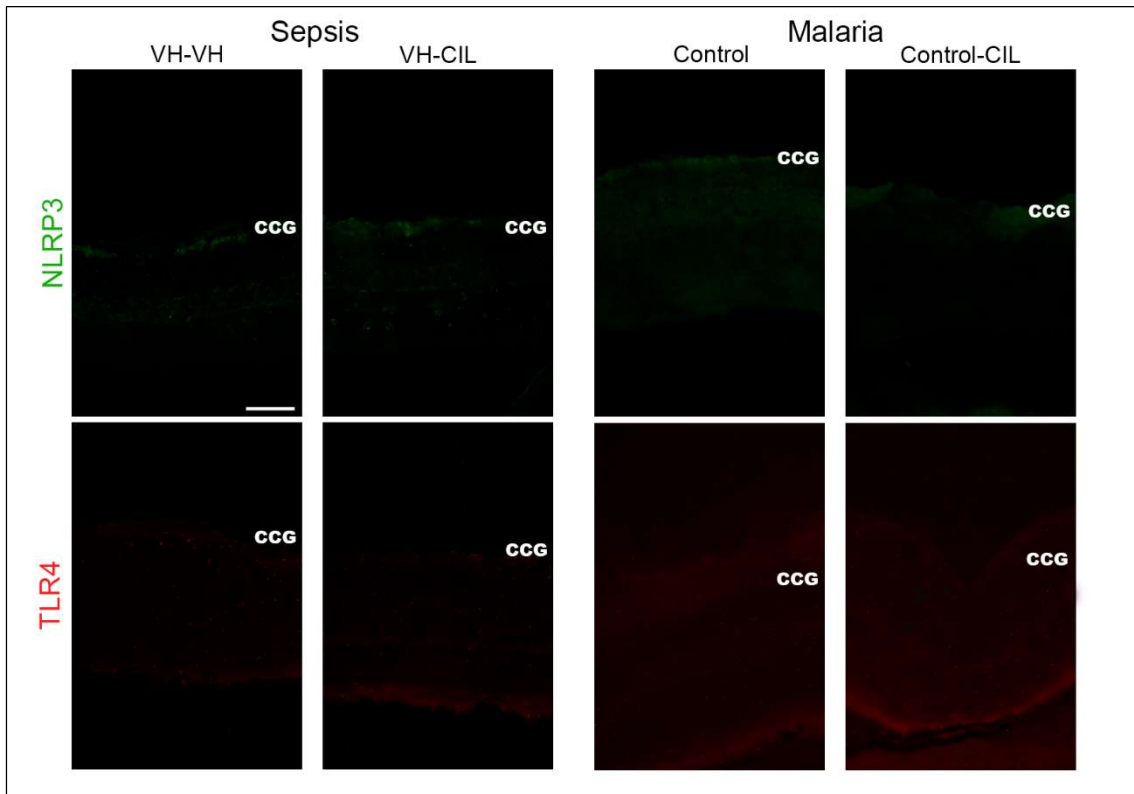


Figura A1. Estudio de inmunofluorescencia de la expresión de NLRP3 y TLR4 en los grupos control de los modelos animales empleados. En la lámina se muestran microfotografías representativas con marcaje individual de cada marcador NLRP3 (verde) y TLR4 (rojo), en los grupos control del modelo animal de sepsis (VH-VH y VH-CIL) y del modelo animal de malaria (Control y Control-CIL). NLRP3, dominio pirina 3 de la familia NLR; TLR4, receptor de tipo *Toll* 4; CCG, capa de células ganglionares. Barra de aumentos: 50 μ m.

