



ACADEMIA DE CIENCIAS DE LA REGION DE MURCIA

**¿RESPONDEN IGUAL TODAS LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA
A LA LESIÓN Y SU PROTECCIÓN?**

Discurso del Académico

Ilmo. Sr. D. Manuel Vidal Sanz

Académico de Número de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia

leído en la sesión solemne de apertura de curso académico el 12 de enero de 2023

Murcia 2023

Academia
asociada al
Instituto de
España



Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y ss. Del Código Penal).

Con el patrocinio de la Dirección General de Universidades y Política Científica a través de la Fundación Séneca.

© ACADEMIA DE CIENCIAS DE LA REGION DE MURCIA, 2023

© Manuel Vidal Sanz

I.S.B.N.: 978-84-09-47504-9

Deposito Legal: MU 6-2023

Imprime: Compobell, S.L., Murcia

Al Prof. Garth M Bray¹

¹ El Prof. GM Bray fue Catedrático de Neurología de la Universidad McGill, Director de la división de Neurología del Hospital General de Montreal (MGH), Investigador principal en el Centro de Investigación en Neurociencias del MGH y miembro de Departamento de Neurociencias del Instituto Neurológico de Montreal (Instituto Penfield) de la Universidad McGill (Montreal, Quebec, Canadá).

PROLOGO Y AGRADECIMIENTOS

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia

Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades

Ilustrísimos señoras y señores académicos, señoras y señores:

Quisiera comenzar agradeciendo al Sr. Presidente su designación para cumplir con la tarea reglamentaria de impartir la lección inaugural de este curso académico 2022-2023. Se trata de un gran privilegio y honor, que no tienen otra explicación que la de mi antigüedad en la Academia y haber podido disfrutar con salud los años que Dios me ha concedido en este mundo. Aprovecho la ocasión para agradecer a mis compañeros de la Academia, todos estos años de amable colaboración y cooperación en las actividades que se desarrollan. Como manifesté hace ya diecisiete años, pertenecer a esta corporación ha sido uno de los mejores regalos que me ha deparado mi vida profesional Murciana, y sigue siendo motivo permanente de alegría y satisfacción. Mi más cordial Enhorabuena al prof. Angel Ferrández Izquierdo, quien tanto ha trabajado por esta institución, por su merecido nombramiento como Presidente De Honor.

La vida tiene muchos momentos muy tristes y difíciles, que nuestro cerebro trata de ignorar, sobrescribiendo hábilmente recuerdos y vivencias más gratas. Pero, no puedo dejar de tener un emotivo recuerdo para quienes ya no están con nosotros, pues estoy convencido de la ilusión que les habría hecho compartir este acto solemne.

Al pensar en el tema a desarrollar en esta sesión de apertura de curso, creí que sería interesante exponer algunos de los trabajos de investigación que nos han ocupado los últimos años, y en los que he tenido la suerte de contar con los miembros del grupo de investigación en Oftalmología Experimental, un grupo con más de treinta años de trayectoria, y al que debo los progresos que hemos realizado en nuestro trabajo científico. La investigación hoy en día es un acto colaborativo y multidisciplinar, y por eso quisiera reflejar en primer lugar mi agradecimiento a todos los miembros del grupo, pues sin su ayuda estos trabajos no habrían sido posibles.

También quiero aprovechar para agradecer el apoyo incontestable y permanente de mi familia, en particular mi esposa María Paz y mis hijas María Paz y Beatriz, por los muchos ratos que me han apartado de su lado, para seguir con mis trabajos.

Esta lección trata de una de las líneas de investigación actuales del Laboratorio, que versa sobre la respuesta de las células ganglionares de la retina a la lesión y su protección; nos centraremos en documentar que éstas, las CGR, difieren en su respuesta al daño y su prevención.

¿RESPONDEN IGUAL TODAS LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA A LA LESIÓN Y SU PROTECCIÓN?

INTRODUCCION

La retina es una extensión del sistema nervioso central alojada en la parte posterior del globo ocular, un aparato especializado para enfocar en ella imágenes del mundo exterior. La retina contiene en su capa más externa los fotorreceptores que responden a la luz en función de su intensidad, longitud de onda y duración. Los fotorreceptores convierten la luz en una señal eléctrica que se computa en la retina, primero en la capa plexiforme externa donde la información de los fotorreceptores se modula con las células horizontales y pasa a las células bipolares, y posteriormente en la plexiforme interna en la que la información de las bipolares se modula con las células amacrinas y el mensaje final se transmite por las células ganglionares (CGR), las únicas cuyos axones abandonan la retina formando el nervio óptico (NO) para conducir esta información al cerebro. Éste, descifra esta información no solo para crear nuestra percepción visual del mundo que nos rodea, sino para muchos otros aspectos fisiológicos inconscientes de nuestra vida diaria.

Desde el punto de vista funcional, podríamos considerar que la retina de los mamíferos contiene tres retinas diferentes. Una primera dominada por los fotorreceptores tipo bastón, que se encarga de nuestra visión escotópica, en condiciones de luz muy tenue, y que nos proporciona una gran sensibilidad a la luz. Una segunda retina dominada por los fotorreceptores tipo cono que nos permite la visión en su máximo esplendor, tal y como la experimentamos a diario con intensos niveles de luz, que nos permite disfrutar del color, el contraste, y una gran agudeza visual y temporal. Estas dos retinas en conjunto nos proveen las funciones visuales formadoras de imágenes (FI), que nos permiten la percepción visual consciente del mundo que nos rodea. A estas dos retinas se suma una tercera, responsable de funciones visuales inconscientes no formadoras de imágenes (NFI) o tareas no visuales, que dependen de la información transportada por las CGR que expresan el fotorreceptor melanosina, también conocidas como melanosínicas CGRm⁺, CGR intrínsecamente fotosensibles (CGRif), o tercer fotorreceptor de la retina ([Provencio et al., 1998; 2000; Berson et al., 2002; Hattar et al., 2022](#)). Entre las funciones visuales NFI más relevantes caben destacar el reflejo pupilar a la luz, la sincronización de nuestros ritmos circadianos al ciclo de luz/oscuridad medioambiental, amén de

otras múltiples funciones que regulan aspectos importantes de nuestra fisiología, comportamiento, estado de ánimo y percepción (Vidal-Villegas et al., 2021b).

Cada CGR responde a la estimulación luminosa de una pequeña región del campo visual, su campo receptor, y extrae un aspecto particular; la intensidad, el contraste, la frecuencia espacial o temporal, el movimiento y/o su dirección, la aproximación, la longitud de onda u otras más, de modo que una pequeña región de nuestro campo visual es codificada por diferentes CGR que envían información, de forma paralela, sobre aspectos complementarios al cerebro. Dicho de otro modo, la información visual que se recoge en una pequeña región de la retina se envía a través de canales paralelos diferentes, cada uno contiene información de una modalidad distinta dentro del campo visual, y cada CGR se constituye en una unidad funcional de la retina (Nassi y Callaway, 2009).

En la rata adulta la población de CGR comparte su ubicación en la capa más interna de la retina con las células amacrinas desplazadas, una población incluso más numerosa que la propia población de CGR (Nadal-Nicolás et al., 2015a), lo que ha obligado a la utilización de trazadores neuronales y marcadores moleculares para diferenciar y analizar estas dos poblaciones (Thanos et al., 1987; Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1988; Vidal-Sanz et al., 2017). Las CGR se clasifican en diversos tipos atendiendo a criterios morfológicos (Bae et al., 2018), de estratificación en la sináptica interna (Dhande et al., 2015), funcionales (Baden et al., 2016), moleculares que incluye el perfil inmunohistoquímico y la expresión de marcadores y/o de genes (Huang et al., 2022), o por su territorio de inervación (Morin y Studholme 2014). Pero la lesión neuronal provoca cambios morfológicos (Tribble et al., 2014) y moleculares (Lönngren et al., 2006; Agudo et al., 2008, 2009), lo que dificulta la identificación de estas células con estos métodos.

En la actualidad, disponemos de marcadores moleculares de las CGR, el factor de transcripción Brn3a, la melanopsina y la osteopontina, que identifican respectivamente las poblaciones de CGR que conducen información formadora de imágenes, la población de CGR no formadora de imágenes, así como la población de CGR alfa (Nadal-Nicolás et al., 2012; Galindo-Romero et al., 2013; Valiente-Soriano et al., 2014; Vidal-Sanz et al., 2015a,b; Gallego et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021a).

Aunque originalmente se describieron en el mamífero solamente tres tipos de CGR, con estudios funcionales (Hartline, 1938) o morfológicos (Huxlin y Goodchild, 1997), hoy sabemos que la retina codifica la información luminosa con al menos 46

tipos diferentes de CGR (Bae et al., 2018; Rheaume et al., 2018; Tran et al., 2019), que proyectan al menos a 45 territorios cerebrales diferentes (Morin y Studholme, 2014). El Brn3a identifica la inmensa mayoría de la población de CGR de la retina que conducen información relativa a la formación de imágenes, aproximadamente un 96% de la población. Las funciones no formadoras de imágenes dependen de las CGR melanopsínicas o intrínsecamente fotosensibles (CGRif). De los cinco o seis tipos de CGRif descritos en la rata (M1-M5) o ratón (M1-M6), respectivamente, los anticuerpos contra la melanopsina identifican preferentemente los tipos M1-M3, pues los tipos M4-M6 no expresan niveles de melanopsina suficientes para ser detectados con técnicas estándar de inmunocitoquímica (Galindo-Romero et al., 2013a; Valiente-Soriano et al., 2014; Vidal-Villegas et al., 2021a; Gallego-Ortega et al., 2022). En ratas adultas, la melanopsina identifica aproximadamente un 2,5% de la población total de CGR, en su mayoría M1-M3. Además de la melanopsina, las CGRif expresan el factor de transcripción T-box Brain 2 (Tbr2) que también puede ser utilizado como marcador de esta población (Chen et al., 2021; Abed et al., 2022; Gallego-Ortega et al., 2022).

En la rata se describieron originalmente tres grupos principales de CGR en base al tamaño del soma y árbol dendrítico nominados A, B y C, respectivamente (Huxlin y Goodchild, 1997), de los cuales el tipo A fue renombrado tipo alfa (α) por Perry (Perry, 1979). Estas CGR α destacan por su gran tamaño y rápida velocidad de conducción, pues son las primeras que señalan al cerebro los cambios luminosos, porque se han conservado evolutivamente en prácticamente todas las especies de mamíferos estudiados, por su gran campo receptor, su alto contenido en neurofilamentos y su monoestratificación en diferentes niveles de la plexiforme interna (PI) (Peichl, 1989; Peichl et al., 1987). En la rata y el ratón, según su respuesta a la estimulación luminosa y su arborización en la PI, se han descrito cuatro tipos de CGR α (Peichl, 1991; Krieger et al., 2017) que de externo a interno son las α OFF-sostenida (α OFFs), α OFF-transitoria (α OFFt), α ON-transitoria (α ONT) y α ON-sostenida (α ONs). La reciente caracterización inmunocitoquímica de las CGR α (Krieger et al., 2017) ha permitido su identificación con anticuerpos; así las CGR α expresan la fosfoproteína Osteopontina (OPN) y pueden identificarse con anticuerpos contra OPN. Es más, las α ONs corresponden al tipo M4 CGRif (Schmidt et al., 2014) y pueden identificarse combinando anticuerpos contra OPN y Tbr2, mientras que la subpoblación de las CGR α -OFF se puede identificar con la combinación de anticuerpos contra OPN y Brn3a (Gallego-Ortega et al., 2021; 2022). Como el Brn3a, la melanopsina y la osteopontina raramente se expresan en el mismo tipo de CGR, el uso de estos marcadores ha permitido estudiar en paralelo, pero

independientemente, las respuestas de estas poblaciones a diferentes tipos de lesión retiniana y a su protección (Vidal-Sanz et al., 2015a, 2015b; Agudo-Barriuso et al., 2016; Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), los axones se extienden hasta llegar a sus territorios de inervación donde establecen conexiones sinápticas con neuronas específicas para formar determinados circuitos que sirven una determinada función. En el caso más sencillo, como es una actividad refleja, la activación neuronal desencadena una respuesta en la neurona postsináptica que consiste en la secreción de neurotransmisor para producir, por ejemplo, en la placa neuromuscular, una contracción muscular, o para influenciar a su vez a otra célula nerviosa excitándola o inhibiéndola. La interrupción de estos circuitos por una lesión no resulta en una recuperación espontánea pues las neuronas adultas no tienen ya capacidad para regenerar espontáneamente sus axones lesionados y extenderlos de nuevo para reinervar sus dianas originales (Aguayo et al., 1987; Bray et al., 1987; Vidal-Sanz et al., 1987, 1991, 2002; Aviles-Trigueros et al., 2000). Es más, como consecuencia de la interrupción axonal se desencadena un conjunto de respuestas neuronales, conocidas como respuesta neuronal a la lesión, que varían desde la retracción de las conexiones aferentes, a cambios morfológicos, metabólicos, moleculares y de expresión génica entre otros (Agudo et al., 2008, 2009). Por ejemplo, en el sistema visual, las células ganglionares de la retina (CGR) forman un haz de fibras (el nervio óptico) que conduce toda la información visual procesada en la retina a los múltiples núcleos retino-recipientes del cerebro. Las CGR, como cualquier otra neurona del SNC en el mamífero adulto, carecen de capacidad de regeneración espontánea. Es más, no solamente no extienden de nuevo sus axones para alcanzar de nuevo sus dianas cerebrales, sino que como consecuencia de la lesión se produce la degeneración retrógrada y muerte de una gran parte de la población de CGR lesionadas (Villegas-Pérez et al., 1988; 1993; Galindo-Romero et al., 2013b; Sánchez-Migallón et al., 2016). Como toda la información visual es conducida por las CGR, su lesión da lugar a déficits característicos de la visión, que además son permanentes. En la actualidad, al igual que para todas las enfermedades neurodegenerativas del SNC, no hay tratamiento eficaz para prevenir la muerte de las CGR debido a la lesión o neurodegeneración.

Una de las principales enfermedades del sistema visual, para las que todavía no hay una cura y que conduce a la ceguera, es el glaucoma. Una enfermedad, conocida como neuropatía óptica glaucomatosa (NOG), que es heterogénea y multifactorial, y que se caracteriza por la degeneración progresiva de las CGR que se acompaña de

trastornos y déficits característicos del campo visual y alteraciones de la cabeza del nervio óptico. Esta enfermedad supone la segunda causa más frecuente de ceguera irreversible en el mundo desarrollado, afecta aproximadamente a 70 millones de personas y provoca la ceguera en el 10% de estos enfermos afectos bilateralmente (Gao et al., 2022). Aunque la patogenia del glaucoma no se conoce con exactitud, en la actualidad se acepta que el daño se produce en los axones de las CGR a nivel de la cabeza del nervio óptico. Se barajan en la actualidad varios mecanismos lesivos que podrían actuar de forma independiente, secuencial o simultánea, a saber; la isquemia, la hipertensión ocular, la excitotoxicidad, la activación autoinmune y la compresión axonal o axotomía. Para comprender los mecanismos involucrados en la degeneración inducida por la NOG se han utilizado diferentes modelos animales, en los que se ha estudiado los efectos de diversos tipos de insultos que pueden estar implicados en la fisiopatología de la NOG, como la isquemia transitoria de la retina (Sellés et al., 1996; Lafuente et al., 2000; Vidal-Sanz et al., 2007), la hipertensión ocular crónica (Salinas-Navarro et al., 2010; Vidal-Sanz et al., 2012) o aguda (Rovere et al., 2016; Gallego-Ortega et al., 2020), la excitotoxicidad mediada por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Vidal-Villegas et al., 2019), la activación inmuno-inflamatoria de la retina (Ramírez et al., 2010), o la axotomía (Vidal-Sanz et al., 2017).

Modelos de estudio de la lesión axonal

La utilización de modelos animales murinos ha contribuido enormemente a descubrimientos científicos durante décadas y su utilización sigue creciendo. En contra de lo que se pensaba, el ratón tiene una retina bien organizada y un sistema visual que incluye una porción substancial de la corteza cerebral. Además, se han descrito hasta 46 tipos diferentes de CGR, varios de los cuales parecen análogos a los de los primates (Zhang et al., 2012). Entre los roedores, el ratón presenta múltiples ventajas como animal experimental, por su facilidad de estabulación y manejo, su bajo coste, pero quizás la razón más importante sea la disponibilidad de herramientas que permiten la manipulación molecular de su genoma, que posibilita añadir, sustituir, cambiar o eliminar determinados genes para desarrollar modelos experimentales de enfermedades humanas (Beier et al., 2022). Es más, la utilización de chivatos fluorescentes o bioquímicos permite identificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones neuronales, y esto ha permitido estudiar su función y propiedades tanto morfológicas, como de inervación, y en la actualidad se ha convertido en el modelo de estudio más importante para investigar el sistema visual de los mamíferos

(Chen et al., 2011; Beier et al., 2021). Es más, la transparencia de los medios oculares facilita el estudio de la retina con técnicas no invasivas, como la tomografía óptica de coherencia (OCT), y monitorizar longitudinalmente (a lo largo del tiempo) el curso temporal de la progresión de los efectos de la lesión del nervio óptico (NO) y otros tipos de lesiones en la supervivencia de neuronas retinianas (Rovere et al., 2015; Sánchez-Migallon et al., 2018b; Valiente-Soriano et al., 2019; Lucas-Ruiz et al., 2021; Norte-Muñoz et al., 2021; Miralles de Imperial-Ollero et al., 2021a, 2021b).

Neuroprotección

Hasta mediados de los años ochenta se aceptaba que las lesiones del sistema nervioso en el mamífero adulto resultaban tanto en la degeneración y muerte de las neuronas lesionadas, como en la desconexión irreversible de estas neuronas con sus territorios de inervación (Aguayo et al., 1987). El sistema nervioso central del mamífero adulto no puede regenerarse. La incapacidad de las neuronas para sobrevivir y regenerar sus axones espontáneamente en distancias lo suficientemente largas como para alcanzar de nuevo sus territorios originales de inervación, diferenciarse y establecer nuevas conexiones sinápticas se atribuía a la ausencia de estas facultades, que estaban presentes durante el desarrollo, pero se perdían como consecuencia de la maduración. Durante los años ochenta, se comenzó a investigar con técnicas modernas de trazado neuronal la posibilidad de que las neuronas adultas pudieran regenerar sus axones lesionados (Vidal-Sanz et al., 1987, 1991, 2002; Avilés-Trigueros et al., 2000), así como la posibilidad de prevenir la muerte neuronal inducida por lesión. Se documentó que las retinas que habían sufrido una amputación del nervio óptico y recibido un implante de nervio periférico autólogo, mostraban una supervivencia de CGR muy superior a la que se observaba tras la sección simple del NO (Villegas-Pérez et al., 1988). Se postuló entonces que factores tróficos producidos en el injerto de nervio periférico por las células de Schwann denervadas podrían ser responsables del efecto rescate observado en estos experimentos (Villegas-Pérez et al., 1988). En efecto, múltiples factores tróficos, incluidas las neurotrofinas factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y neurotrofina NT4/5, tenían potentes efectos neuroprotectores en la supervivencia de las CGR axotomizadas (Mansour-Robbaey et al., 1994; Peinado-Ramon et al., 1996). Estos experimentos supusieron el comienzo de la neuroprotección en el sistema visual, un concepto que ha sido corroborado posteriormente, de forma independiente, por múltiples laboratorios pero que no ha podido ser trasladado a la clínica con eficacia. La idea de ralentizar la muerte neuronal inducida por lesión era

tremendamente atractiva, máxime en situaciones en las que no se conocía la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas que cursan progresivamente. Hoy se concibe la neuroprotección como la posibilidad de aminorar la cuantía y ralentizar el curso de la muerte neuronal inducida por lesión o enfermedad, con la aplicación de una sustancia neuroprotectora (Vidal-Sanz et al., 2000; 2001; 2015b; 2017). En efecto, durante los últimos años se han realizado múltiples estudios para descubrir y caracterizar diferentes sustancias neuroprotectoras en diferentes modelos de la enfermedad glaucomatosa. Así se han caracterizado los efectos neuroprotectores de varias sustancias frente a la axotomía (Sánchez-Migallón et al., 2016; Vidal-Sanz et al., 2017; Lucas-Ruiz et al., 2009; Vidal-Villegas et al., 2021; Gallego-Ortega et al., 2021), la isquemia transitoria (Vidal-Sanz et al., 2001, 2007; Avilés-Trigueros et al., 2003), la hipertensión ocular crónica (Valiente-Soriano et al., 2015) o aguda (Rovere et al., 2016) y la excitotoxicidad mediada por sobreestimulación de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato (Vidal-Villegas et al., 2019).

Entre los compuestos con propiedades neuroprotectoras cabe destacar los factores neurotróficos. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Barde et al., 1982) ejerce sus efectos por la activación del receptor de alta afinidad (receptor B de la tirosina quinasa; TrkB) de las neurotrofinas, que se fosforila desencadenando la activación de vías intracelulares de supervivencia (Di Polo et al., 2000; Lindqvist et al., 2002, 2010). Se ha demostrado que el BDNF es uno de los neuroprotectores más eficaces en diferentes modelos de lesiones retinianas, incluida la sección intraorbitaria del nervio óptico (Galindo-Romero et al., 2013; Sanchez-Migallon et al., 2011), el aplastamiento intraorbitario del nervio óptico (Parrilla-Reverter et al., 2009), la hipertensión ocular crónica (Valiente-Soriano et al., 2015) o aguda (Rovere et al., 2016), la isquemia retiniana (Vidal-Sanz et al., 2000) y modelos de degeneración de fotorreceptores inducida por fototoxicidad focal con diodo emisor de luz (LED) (Ortín-Martínez et al., 2014; Valiente-Soriano et al., 2019; Miralles de Imperial-Ollero et al., 2021). Sin embargo, el alto peso molecular del BDNF (27 kDa), su corta vida media en plasma y su incapacidad para cruzar la barrera hematoencefálica hacen que el BDNF tenga un perfil farmacocinético pobre y de limitado potencial terapéutico. La identificación de la 7,8-dihidroxi-flavona (DHF) como agonista potente de alta afinidad del TrkB (Jang et al., 2010), suscitó múltiples estudios en los que se documentó el efecto neuroprotector en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas (Wurzelmann et al., 2017; Emili et al., 2020). Pero, hasta muy recientemente, no se había estudiado su efecto en modelos experimentales *in vivo* de la retina. Así, se ha

documentado que cuando se administra intraperitonealmente, la DHF previene la muerte de las CGR inducida por axotomía e induce la fosforilación del receptor TrkB (Vidal-Villegas et al., 2021; Gallego-Ortega et al., 2021), que a su vez desencadena una cascada de señalización intracelular a través tres vías principales: la vía de la fosfolipasa- C_{γ} (PLC $_{\gamma}$); la vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) a través del efector AKT (PI3K/AKT), y; la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP/ERK), éstas dos últimas las más relevantes en cuanto a la supervivencia, pues bloquean las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis (Wurzelmann et al., 2017; Galindo-Romero et al., 2021).

A pesar de los múltiples estudios preclínicos y del progreso en este campo, el concepto sigue siendo experimental. Son muchos los trabajos que han intentado documentar la neuroprotección en la retina, pero todavía la evidencia clínica es escasa. Entre las múltiples razones de este fracaso en la traslación, quizás una de ellas se deba a que la población de CGR es una población heterogénea, compuesta de muchos tipos diferentes de CGR, cada uno con su particular idiosincrasia y respuesta a la lesión y prevención (neuroprotección) de la misma (Vidal-Sanz et al., 2015a; Agudo-Barriuso et al., 2016). Nuestro Laboratorio se ha dedicado durante las últimas décadas al estudio y caracterización de las repuestas de las neuronas a diferentes tipos de lesión, su capacidad de regeneración y supervivencia, así como al estudio de la posibilidad de prevenir los efectos degenerativos inducidos por la lesión (Vidal-Sanz et al., 2002; 2017).

En esta revisión repasamos algunos experimentos recientes del Laboratorio que documentan la idiosincrasia de distintos tipos de CGR a la lesión y su respuesta a la prevención. Analizaremos la respuesta de distintas poblaciones de CGR a un tipo concreto de lesión, la sección intraorbitaria del nervio óptico, y compararemos su respuesta a la lesión y a su protección con la administración sistémica de la 7,8-dihidroxi-flavona (DHF), un potente mimético del BDNF que administrado sistémicamente alcanza la retina (Galindo-Romero et al., 2021; Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021a). Utilizamos técnicas descritas en el Laboratorio para identificar, contar y mapear en las mismas retinas montadas a plano, poblaciones de CGR de la rata identificadas inmunocitoquímicamente con los siguientes anticuerpos. Melanopsina para las CGR responsables de funciones visuales no formadoras de imágenes, Brn3a para las CGR responsables de las funciones visuales formadoras de imágenes, Osteopontina para las CGR α , una combinación de Osteopontina y Tbr2 para las CGR α ONS/M4) o de Osteopontina y Brn3a para las CGR α -OFF. Es probable que el

estudio de la respuesta molecular de estos diferentes tipos neuronales ayude a comprender como influenciar estas células para que sobrevivan.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Todas las manipulaciones de los animales se realizaron de acuerdo con la normativa europea (Directiva 86/609/CEE) sobre la protección y cuidado de animales destinados a la experimentación y otros fines científicos, así como la ley nacional (Ley 32/2007) para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio y las recomendaciones de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) y fueron aprobadas por el comité de ética y estudios animales de la Universidad de Murcia (números de protocolos de la Universidad de Murcia A13171103, A13170110 y A13170111). Hemos utilizado ratas albinas hembra adultas del tipo Sprague-Dawley (SD) de unos 180-200 gramos de peso obtenidos de los laboratorios Charles Rivers (Francia) y del estabulario de la Universidad de Murcia. Estos animales fueron estabulados bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con una intensidad media de 5-30 lux y temperatura constante a 25°C, y comida y bebida proporcionadas "ad libitum". Las manipulaciones experimentales se realizaron bajo anestesia intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de xilacina (20 mg/ml, Xilagesic®, Laboratorios Calier, Barcelona, España) y ketamina (50 mg/ml, Imagene®, Merial Laboratorios, S.A.U. Sant Cugat del Vallès, Barcelona).

Sección intraorbitaria del nervio óptico (SINO)

Las ratas se anestesiaron y se colocaron en decúbito prono con la zona apical de la cabeza rasurada y sujeta mediante un sujetador de cabezas o pinza buco-nasal, diseñada al efecto según técnicas descritas previamente y que son estándar en el laboratorio (Vidal-Sanz et al., 1987; 1991; 2002; Avilés-Trigueros et al., 2000). Se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, desde la región nasal hasta la inserción de los músculos occipitales, y a continuación se efectúa una disección roma del plano subcutáneo hasta observar el reborde orbitario superior. Se practica una incisión en el cartílago a lo largo de este reborde, hasta llegar a la fascia del músculo temporal. La sección, disección y tracción del reborde supraorbitario y de la fascia del

musculo temporal, facilita la exposición de la zona superior de la pirámide orbitaria. Esta maniobra se debe realizar con extrema suavidad, con el fin de evitar que la tracción induzca compresión de los vasos retinianos y se produzca una isquemia de la retina. A continuación, se desinsertan los músculos recto y oblicuo superior con la ayuda de un hilo de sutura del que se tracciona suavemente hacia abajo para obtener una buena visualización de la parte posterior del globo ocular y de la salida del NO. Se disecciona la duramadre que rodea al NO, se abre longitudinalmente la misma en su aspecto temporal superior, para evitar la lesión de los vasos retinianos que en la rata discurren por el aspecto inferior y nasal de la misma (Forrester y Peters, 1967) y no en el interior del NO como ocurre en los primates. Posteriormente se secciona el NO lo más cerca posible del globo ocular. Finalizado esto, se reconstruye la órbita con puntos de seda de 6/0 y se suturaba la piel de la cabeza con sutura continua de 4/0. El examen del fondo de ojo para comprobar la integridad de la vascularización retiniana se efectuaba con un portaobjetos de vidrio colocado sobre la córnea y a través del microscopio operatorio. Cuando existe un espasmo de estos vasos, se procede a realizar un masaje suave del globo ocular, con lo que se consigue que en la gran mayoría de las ocasiones se restaure la circulación retiniana. Cuando esto no ocurría en el plazo de unos 20 minutos tras la intervención, se desechaba el animal y no se incluía en los grupos experimentales. Para terminar, se aplicaba en ambos ojos un ungüento tópico para evitar la desecación de la córnea y los animales se devolvieron al estabulario.

Grupos animales y administración de neuroprotectores

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales. Un primer grupo se utilizó para determinar la respuesta de las CGR Brn3a⁺ y melanopsínicas (m⁺) a la axotomía y su prevención a largo plazo con la administración intraperitoneal de la dihidroxiflavona (DHF). Este primer grupo compuesto por 96 ratas adultas se analizó a los 7, 10, 14, 21, 30 o 60 días después de la sección intraorbitaria del NO y administración i.p. diaria de una dosis de vehículo (solución salina con 1% de DMSO) (n=48), o de vehículo con 5 mg/kg de DHF (n=48), comenzando 12h antes de la sección intraorbitaria del NO. Esta dosis de 5 mg/Kg, había resultado óptima en experimentos preliminares (Vidal-Villegas et al., 2021).

Un segundo grupo se utilizó para examinar la respuesta de las CGR α y sus subtipos a la axotomía y su prevención con la administración intraperitoneal de la DHF. Para comparar con los resultados obtenidos en el grupo anterior, en este segundo

grupo también se analizó la respuesta de las CGR Brn3a⁺. Este segundo grupo compuesto de 39 ratas se analizó a los 7, 14 o 21 días después de la sección intraorbitaria del NO y administración i.p. diaria de una dosis de vehículo (n=17), o de vehículo con 5 mg/kg de DHF (n=21), comenzando 12 h antes de la sección del NO.

Proceso tisular

Para el sacrificio de los animales se inyecta una sobredosis i.p. de pentobarbital sódico (0,5 ml) al 20% (Eutanax®; Fatro, S.A., Barcelona, España). Los animales se perfunden a través de la aorta ascendente primero y brevemente con suero salino al 0,9% y posteriormente con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M (pH 7,2-7,4) a 4°C. Tras perfusión del PFA, se marca el polo ocular superior con un punto de sutura (más largo para el ojo izquierdo que para el derecho), se enuclean ambos ojos y se postfijan durante una hora adicional en PFA al 4%.

Bajo el microscopio operatorio se disecan ambas retinas en montajes goblaes. Para ello, se realizan cuatro cortes radiales, separados entre ellos aproximadamente 90° para limitar los cuatro cuadrantes superonasal, superotemporal, inferonasal e inferotemporal. El más profundo de estos cuatro cortes señala el polo superior de la retina. La retina se monta *in toto* sobre un trozo de papel de filtro y se transfiere a una solución del fijador durante una hora adicional. La retina se lava entonces en solución salina/tampón fosfato 0,1 M (PBS) durante unos 10 minutos y se guarda a 4°C hasta su proceso inmunohistoquímico.

Inmunofluorescencia

Las CGR se identifican con inmunohistofluorescencia. Las retinas se lavan dos veces con PBS (0,1M) conteniendo Tritón al 0,5% (Tx; Triton® X-100; Sigma X100, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) durante 10 minutos cada uno y embebidas en el mismo líquido se congelan durante 15 minutos a -70°C. Posteriormente se atemperan a 22-24°C y se realizan tres lavados adicionales con PBS-Tx al 0,5%. Ambas retinas (experimentales y contralaterales, control) se incuban durante la noche a 4°C en una solución de PBS 2% Tritón X-100 (Tx) que contiene anticuerpos primarios contra el Brn3a (ratón anti-Brn3a, diluido 1:500, MAB1585 Millipore), melanopsina (conejo anti-melanopsina, diluido 1:500, PAI-780 Invitrogen, Termo Fisher Scientific, Alcobendas, Madrid), Osteopontina (OPN) (cabra anti-Osteopontina, diluido 1:1000, AF808 Biotechne), y Tbr2 (conejo-anti Tbr2, diluido 1:1000, AB233 Abcam).

Para el revelado o inmunofluorescencia secundaria las retinas se lavan dos veces con PBS que contiene Tx al 0,5% durante 5 minutos y se incuban a temperatura ambiente durante dos horas en una solución de PBS-Tx al 2% que contiene una mezcla de anticuerpos secundarios (diluidos 1:500) cabra anti-ratón IgG1 Alexa 555 (A21127), burro anti-conejo Alexa 488 (A21206) y burro anti-cabra Alex 647 (A32849) (Molecular Probes Thermo-Fisher, Madrid). A continuación, se realizan lavados con PBS-Tx al 2% y se montaron con su cara vítrea hacia arriba en un portaobjetos de vidrio gelatinizado, con una solución 3/1 de glicerol/tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9, conteniendo un 0,04% de p-fenilendiamina, cubriéndolas con un cubreobjetos de vidrio, que se sella con laca de uñas. Las retinas se guardan a 4°C en lugar seco y protegido de la luz hasta su análisis a microscopía de fluorescencia.

Examen al microscopio y reconstrucción de retinas a plano

La densidad y distribución de las CGR inmunomarcadas se determinó en reconstrucciones digitales de la totalidad de estas retinas según métodos descritos en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro et al., 2009, 2010). Estas reconstrucciones se obtuvieron en un microscopio (Leica, DM6-B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y las retinas se fotografiaron (x10) secuencialmente, captando imágenes sin solapamiento de la totalidad de la retina. Cada imagen se enfocaba individualmente y se obtenía con los filtros que permiten identificar las células marcadas con los diferentes anticuerpos Brn3a, melanopsina, Osteopontina o Tbr2, respectivamente (Fig. 1).

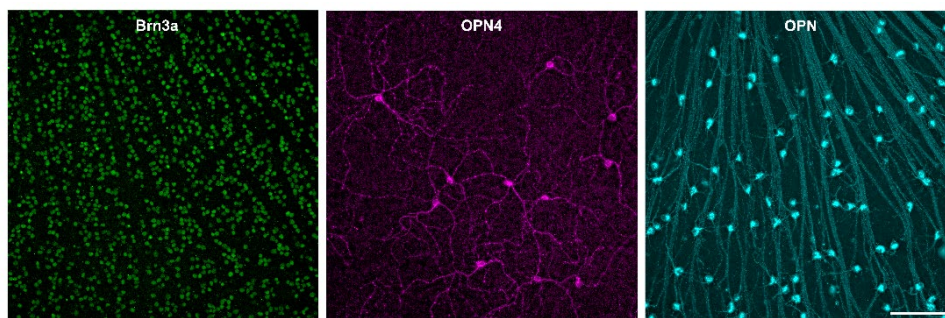


Figura 1. Micrografías fluorescentes de retinas intactas fotografiadas con filtros diferentes para identificar CGR marcadas con Brn3a, melanopsina (OPN4) y osteopontina (OPN). Mientras que el marcaje de Brn3a identifica el núcleo celular, el marcaje de la melanopsina y la osteopontina identifica el citoplasma, dendritas y segmento proximal del axon. Barra = 100 μ m (Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021a).

Las reconstrucciones de los montajes globales de cada retina se analizaron para obtener la cuantificación automática de las CGR marcadas con Brn3a, siguiendo métodos y algoritmos descritos en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro et al., 2009, 2010; Nadal-Nicolás et al., 2009; Vidal-Villegas et al., 2019). Las CGR marcadas con melanopsina, Osteopontina y/o Tbr2, se puntuaron manualmente sobre las imágenes y se cuantificaron con la ayuda de un editor gráfico de Adobe Photoshop CS8.01 (Adobe Systems, Inc., San José, CA, USA), siguiendo métodos previamente descritos en nuestro laboratorio (Nadal-Nicolás et al., 2014).

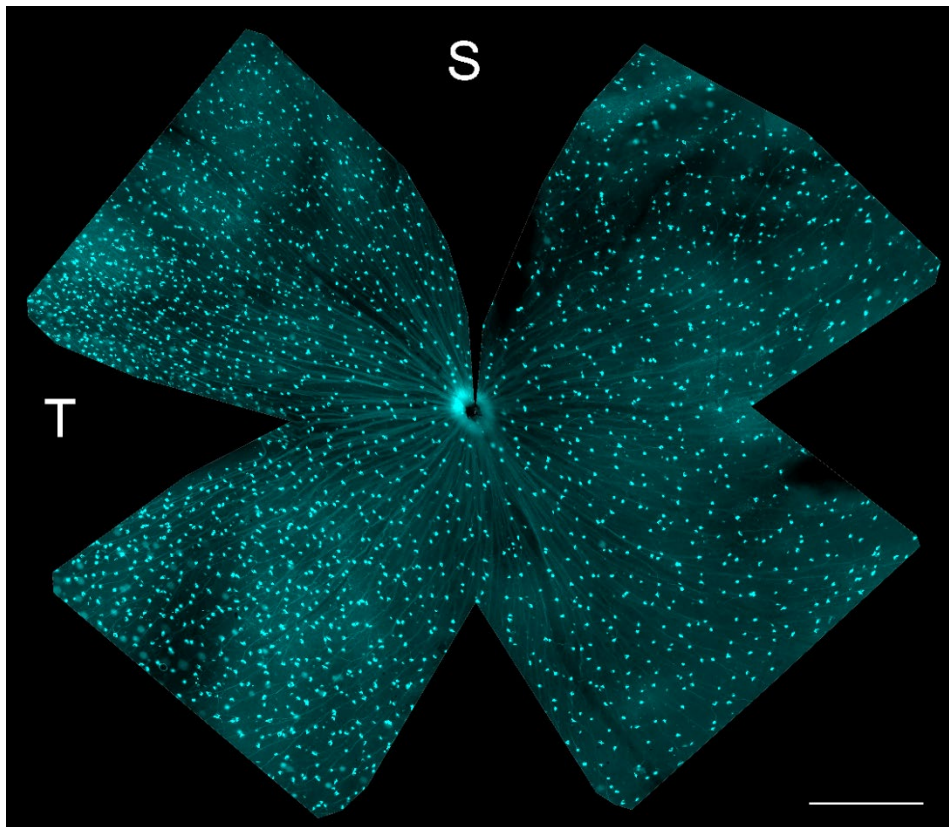


Figura 2. Fotomontaje de una retina derecha de ratón pigmentado marcada con anticuerpos que reconocen la osteopontina y por tanto identifican las células ganglionares de la retina (CGR) tipo α . El marcaje con osteopontina identifica el citoplasma, dendritas y segmentos proximales de los axones. En esta retina se contabilizaron 2.338 CGR. S, superior. T, temporal. Barra = 1 mm. (Gallego-Ortega et al., 2022).

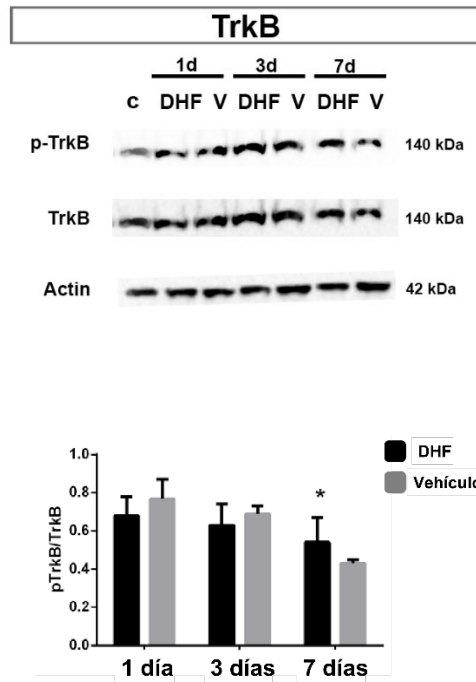


Figura 3. La administración de DHF activa TrkB. Se evaluó la cantidad de proteína TrkB y su fosforilación (pTrkB) y ambas se compararon con la Actina en retinas derechas control (c), experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihydroxiflavona (DHF) o Vehículo (V) y analizadas a los 1, 3 ó 7 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico (n=4 retinas para cada grupo). La cantidad total de Trkb disminuyó en paralelo a la muerte progresiva de CGR, sin embargo, se observó que después de los 3 días, la fosforilación de Trkb fue significativamente mayor en el grupo tratado con DHF que en el tratado con Vehículo, indicando su activación con anterioridad a los 7 días (Vidal-Villegas et al., 2021a).

La distribución de las CGR en cada retina se examinó con mapas de isodensidad para las CGR Brn3a⁺, o con mapas de vecinos para las poblaciones de CGR m⁺, OPN⁺, OPN⁺Tbr2⁺ ó OPN⁺Brn3a⁺, respectivamente (Galindo-Romero et al., 2013a; Nadal-Nicolás et al., 2014). Los mapas de isodensidad de las CGR Brn3a se obtuvieron a partir de los valores obtenidos en cada una de las microfotografías y se presentaron con una escala de pseudocolor con un rango de 0 (púrpura) a más de ≥ 2500 (rojo) RGC/mm². Los mapas de vecinos de las CGR OPN⁺Tbr2⁺ ó CGR OPN⁺ representan su distribución de modo que cada punto corresponde a una célula individual con un color que revela

el número de vecinos en un radio de 0,276 mm de 0-4 (púrpura) hasta $\geq 32-35$ (rojo) vecinos. Tanto los mapas de isodensidad como los de vecinos se construyeron con la ayuda del programa Sigmaplot (SigmaPlot 9.0 for Windows; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA), siguiendo métodos descritos previamente (Nadal-Nicolás et al., 2012, 2014; Galindo-Romero et al., 2013) (Fig. 2).

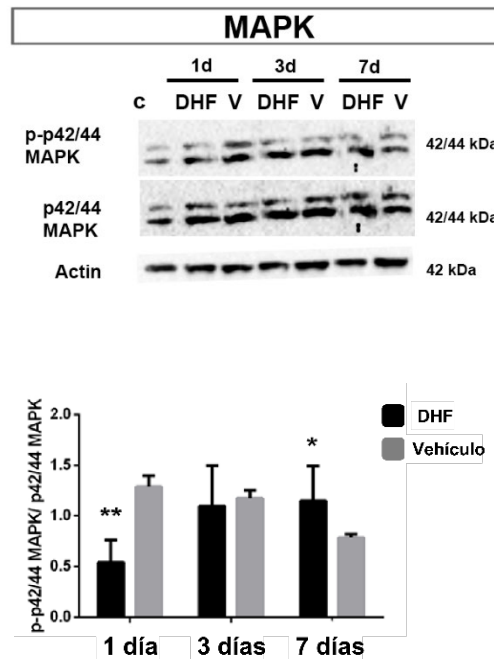


Figura 4. La administración de DHF activa la subvía de señalización intracelular MAPK, del TrkB. Superior. Imágenes representativas de Western blot de los niveles de proteína MAPK en muestras de retinas intactas (c), de retinas experimentales analizadas a los 1, 3 o 7 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico y tratamiento i.p. diario con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi flavona (DHF) o Vehículo (V) (n=4 retinas para cada grupo). Inferior. Histograma de barras en los que se evaluó cuantitativamente la relación de proteína fosforilada (p-MAPK) en relación con la proteína total (MAPK), comparadas con niveles totales de actina, en experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi flavona (DHF) o Vehículo (V) y analizadas a los 1, 3 o 7 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico (n=4 retinas para cada grupo) (Galindo-Romero et al., 2021).

Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en los diferentes grupos experimentales se efectuó con un programa estadístico para Windows (Statistix, V 1.0; Analytical Software, USA). Los valores se expresaron como medias aritméticas y errores estándar

de la media. Las poblaciones experimentales se compararon estadísticamente utilizando el test no paramétrico ANOVA de una vía, Kruskal Wallis. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nuestros estudios documentan por primera vez que la DHF administrada sistémicamente previene la muerte inducida por la axotomía de las poblaciones de CGR estudiadas. Mostramos también la diferente respuesta de las CGR Brn3a⁺, de las CGR m⁺ y de las CGR α , frente a la lesión. Es más, estas poblaciones no solamente difieren en su respuesta a la lesión, sino que difieren en su respuesta a la protección mediada por la DHF, un efecto que se debe a la fosforilación del receptor TrkB (Galindo-Romero et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021) (Fig. 3) y a la activación de vías intracelulares de supervivencia (Galindo-Romero et al., 2021) (Fig. 4)

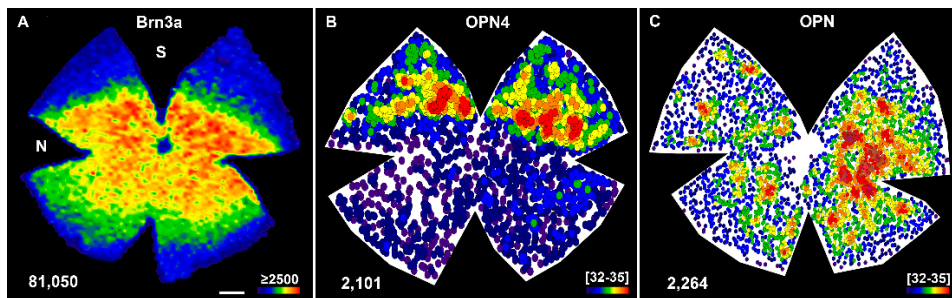


Figura 5. Mapas de isodensidad o de vecinos que muestra la distribución topográfica de las CGR Brn3a⁺ (A), melanopsínicas (OPN4) (B) y alfa (α) (OPN) (C), en retinas intactas. En la parte inferior izquierda de cada mapa se indica el número total de células contabilizadas en esa retina. A. Las CGR Brn3a muestran su típica distribución por la retina, con una franja de mayor densidad en la hemirretina superior y densidades más altas en el cuadrante supero-temporal. B. Las CGR melanopsínicas identificadas con anticuerpos contra la melanopsina se distribuyen de forma complementaria a las CGR Brn3a. C. Las CGR alfa, marcadas con anticuerpos contra osteopontina se distribuyen por toda la retina con una mayor presencia en la hemirretina temporal. S: superior, N: nasal. La escala de color en el mapa de isodensidades tiene un rango de 0 CGR/mm² (púrpura) hasta ≥ 2.500 CGR/mm² (rojo). La escala de color del mapa de vecinos oscila desde 0 a 4 (púrpura) hasta $\geq 32-35$ (rojo) vecinos en un radio de 0,276 mm. (Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021a).

Prevención con DHF de la muerte de las CGR Brn3a⁺ inducida por axotomía

Los resultados del primer grupo sirvieron para examinar la duración de la protección inducida por la DHF en la población de CGR axotomizadas, tanto la población general de CGR Brn3a⁺ como de CGR m⁺. Examinadas al microscopio de fluorescencia, las retinas derechas o control presentaban un aspecto normal, con su típica distribución de CGR Brn3a⁺ dispuestas con una mayor densidad en una franja horizontal de la hemirretina superior aproximadamente a un milímetro por encima del disco óptico, y con densidades máximas en el cuadrante supero temporal, corroborando resultados previos de nuestro laboratorio (Nadal-Nicolás et al., 2012) (Fig. 5).

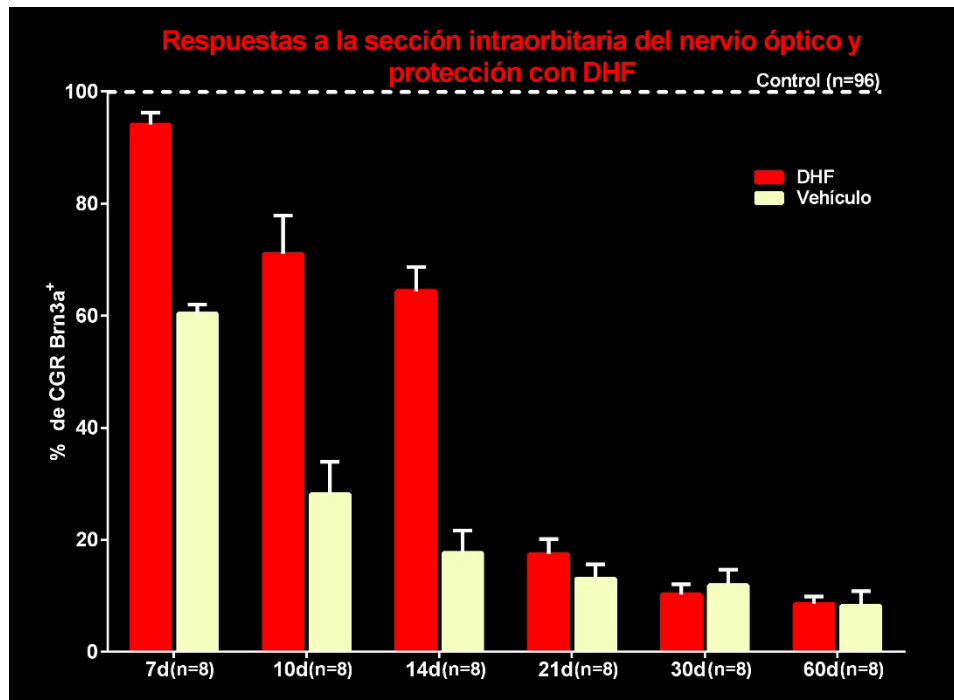


Figura 6. Histograma de barras que muestra el porcentaje (en relación con las retinas derechas control) de CGR marcadas con Brn3a en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi flavona (DHF) o Vehículo y analizadas a los 7, 10, 14, 21, 30 o 60 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. Se observó una protección significativa con la administración de DHF, comparada con el vehículo, a los 7, 10, 14 y 21 días. (Vidal-Villegas et al., 2021a).

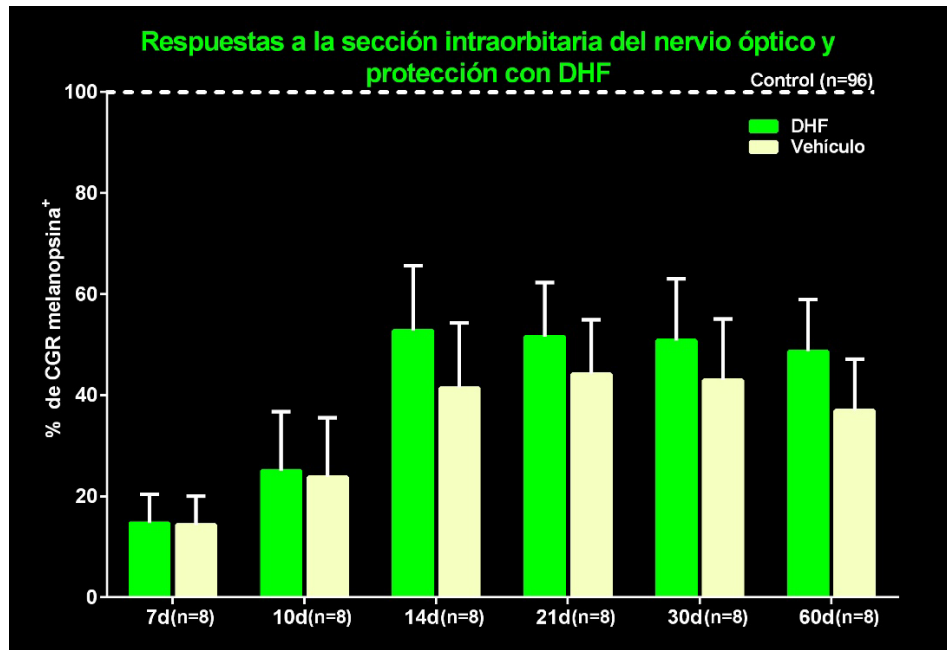


Figura 7. Histograma de barras que muestra el porcentaje (en relación con las retinas derechas control) de CGR marcadas con melanopsina en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi-flavona (DHF) o Vehículo, y analizadas a los 7, 10, 14, 21, 30 ó 60 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. Tras una disminución transitoria de la expresión de melanopsina en ambos grupos a los 7-10 días, se observó una protección significativa en las retinas tratadas con DHF, evidente a los 14 días que persistió durante todo el periodo de estudio. (Vidal-Villegas et al., 2021a).

El examen de las retinas experimentales tratadas con DHF mostraba densidades de CGR Brn3a⁺ que eran mayores que las de las retinas tratadas con vehículo, analizadas a los 7, 10, 14 ó 21 días de la lesión intraorbitaria del NO. Las retinas procesadas a intervalos de tiempo superiores (30 ó 60 días) mostraban poblaciones similares de CGR Brn3a⁺ en las retinas experimentales tratadas con DHF ó vehículo. La cuantificación de las poblaciones de CGR Brn3a⁺ supervivientes en ambos grupos experimentales, documentó que la DHF ejercía un efecto neuroprotector significativo hasta los 21 días. La supervivencia de las CGR Brn3a⁺ a los 7, 10, 14 ó 21 días de la sección del NO fue del 59% ó 96%(n=8), 28% ó 71% (n=8), 17% ó 65% (n=8) y 13% ó 17% (n=8), respectivamente, para las retinas tratadas con vehículo o DHF. Así, la administración de DHF resultó en la prevención de la muerte abrupta de las CGR

inducida por la sección del NO y en un rescate que se mantuvo significativo hasta los 21 días de la lesión (**Fig. 6**).

Prevención de la muerte de las CGR m⁺ y protección permanente con la DHF

Este primer grupo también sirvió para examinar la duración de la protección inducida por la DHF en la población de CGR melanopsínicas axotomizadas. Cuando se examinaron al microscopio de fluorescencia, las retinas derechas o control presentaban un aspecto normal, con su típica distribución de las CGR m⁺ agrupadas en regiones complementarias a las CGR Brn3a⁺, y con densidades mayores en la hemirretina superior, corroborando hallazgos previos del laboratorio ([Galindo-Romero et al., 2013b](#); [Nadal-Nicolás et al., 2014](#)).

El examen de las retinas experimentales tratadas con vehículo mostró que a los pocos días de la sección intraorbitaria del NO, las densidades de CGR m⁺ estaban muy disminuidas, de modo que a los 7-10 días de la lesión la población de CGR m⁺ era el 13-21% de los valores recogidos en sus retinas contralaterales (control). Las retinas analizadas a los 14 días de la lesión mostraban sin embargo que la población de CGR m⁺ alcanzaba valores alrededor del 38% que no disminuían considerablemente en retinas analizadas a intervalos mayores de supervivencia de 21, 30 ó 60 días. Estos resultados sugerían que como consecuencia de la lesión del NO se produce una disminución en la expresión de melanopsina que es transitoria y se recupera a los 14 días, confirmando resultados y observaciones previas de nuestro laboratorio documentando la disminución transitoria de la expresión de la melanopsina tras la axotomía ([Nadal-Nicolás et al., 2015a, 2015b](#); [Sánchez-Migallon et al., 2018](#)), hipertensión ocular aguda ([Rovere et al., 2016](#)), la excitotoxicidad inducida por NMDA ([Vidal-Villegas et al., 2019](#)) o la fototoxicidad ([García-Ayuso et al., 2017](#)). Además, estos resultados indican que la axotomía induce un período de muerte inicial de CGR m⁺, que afecta aproximadamente al 38% de la población a los 14 días, pero que se estabiliza y no progresa con el tiempo, pues a los 60 días la supervivencia de las CGR m⁺ es comparable (**Fig. 7**). El examen de las retinas experimentales tratadas con DHF también mostró una reducción de las densidades de CGR m⁺ a los pocos días de la sección intraorbitaria del NO, que era máxima entre los 7-10 días de la lesión. Estos resultados sugerían que, al igual que en las retinas tratadas con vehículo, se producía una reducción transitoria de la expresión de melanopsina. Sin embargo, las retinas tratadas con DHF y analizadas a los 14 días mostraban una población de CGR m⁺ de alrededor del 48%, una proporción superior a la observada en retinas tratadas con vehículo y este efecto rescate se mantenía en retinas analizadas a intervalos mayores de supervivencia de 21, 30 ó 60 días. La

cuantificación de las poblaciones de CGR m⁺ supervivientes en ambos grupos experimentales, documentó que la supervivencia de las CGR m⁺ a los 14, 21, 30 ó 60 días de la sección del NO fue del 41% ó 52%(n=8), 44% ó 51% (n=8), 43% ó 50% (n=8) y 37% ó 48% (n=8), respectivamente, para las retinas tratadas con vehículo o DHF. Así, la administración de DHF resultaba en una protección significativa de las CGR m⁺ que se mantenía en el tiempo y por tanto era permanente (Fig. 7).

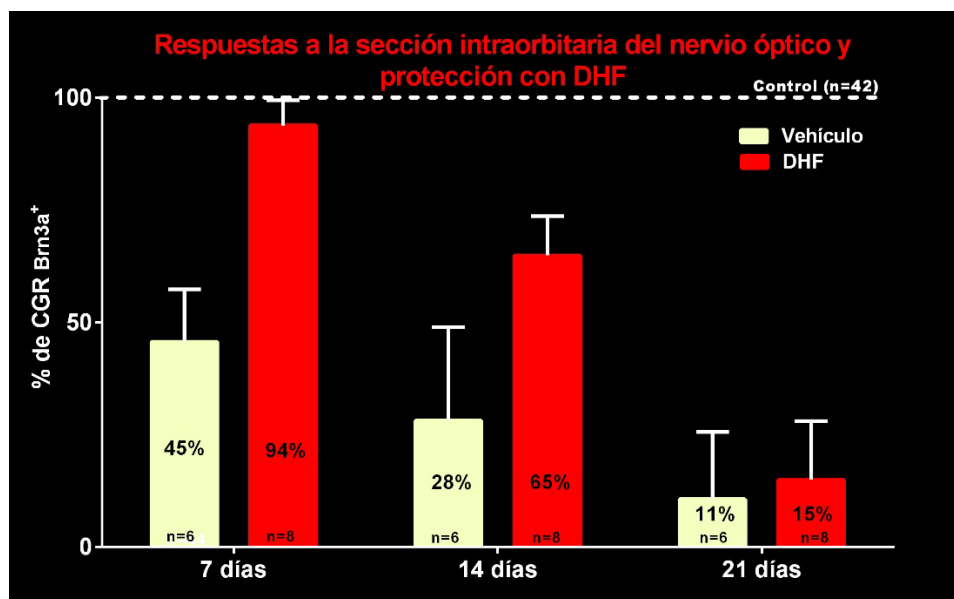


Figura 8. Histogramas de barras que muestran el porcentaje (en relación con las retinas derechas control), de la población general de CGR marcadas con Brn3a, en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi flavona (DHF) o Vehículo y analizadas a los 7, 14 ó 21 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. Las CGR Brn3a muestran su típica respuesta a la lesión y protección con la DHF (similar a la observada en el grupo anterior, Fig. 4) (Gallego-Ortega et al., 2021).

Respuesta a lesión y protección de las CGR α

Para poder comparar los resultados del segundo grupo con los del primero, en este segundo grupo también se analizaron las respuestas a la axotomía y administración de DHF de las CGR BR3a⁺. Los resultados de este análisis corroboraron los resultados obtenidos en el grupo anterior (Vidal-Villegas et al., 2021). Las retinas derechas contralaterales mostraban poblaciones de CGR Brn3a⁺ cuya cuantía y

distribución semejaba las observadas en retinas control de estudios previos. Además, estas retinas derechas contralaterales, también ilustraban la disposición y frecuencia de las CGR α y los subtipos estudiados. Así, las CGR α , marcadas con OPN, estaban distribuidas por toda la retina con densidades mayores en la hemirretina inferior y máximas en el cuadrante infero-temporal, con un valor total medio que osciló alrededor de 1.900, lo que supone aproximadamente el 2,4% de la población total de CGR Brn3a⁺. Las CGR α OFF, doblemente marcadas con Brn3a y OPN, presentaban una distribución regular por la totalidad de la retina, con un valor total medio de aproximadamente 780, que apenas representa el 1% de las CGR Brn3a⁺. El tipo de CGR α ONs/M4, doblemente marcado con OPN y TBr2, presentaba una distribución regular por la retina con densidades mayores en la hemirretina inferior y máximas en el cuadrante inferotemporal, y su valor total medio era de 1.015, lo que supone aproximadamente el 1,2% de la población de CGR Brn3a⁺.

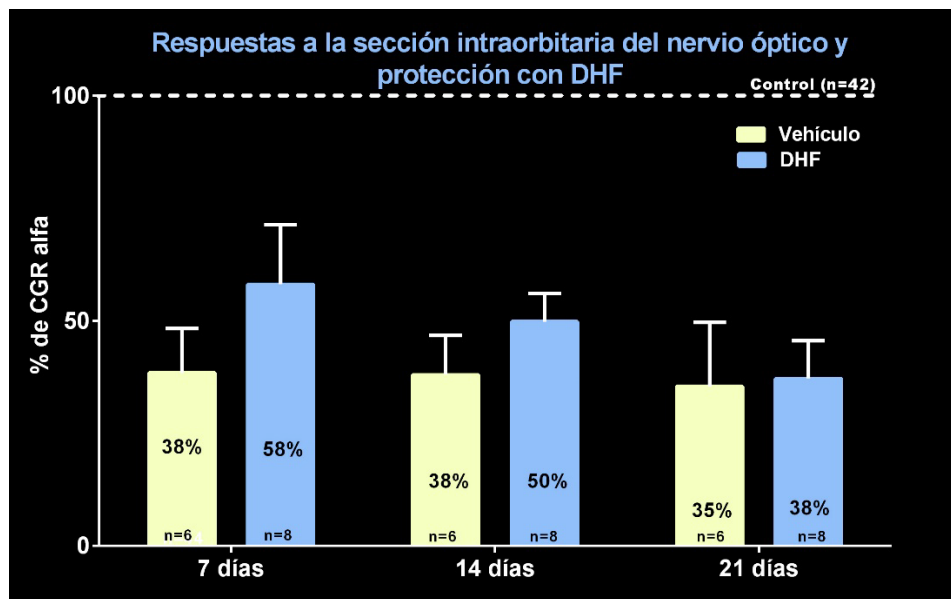


Figura 9. Histogramas de barras que muestran el porcentaje (en relación con las retinas derechas control) de la población de CGR α marcadas con Osteopontina, en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi flavona (DHF) o Vehículo y analizadas a los 7, 14 ó 21 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. La sección del nervio óptico induce a los 7 días una disminución al 38% de su valor control, que no progresa con el tiempo, y la DHF protege estas células hasta los 14 días (Gallego-Ortega et al., 2021).

En las retinas experimentales izquierdas tratadas con vehículo, la sección del NO resultaba en la degeneración masiva de las CGR Brn3a⁺, de modo que a los 7 días habían desaparecido prácticamente el 55% de la población original y a los 21 días la población superviviente solo era del 10-11%. Estos resultados contrastaban con los resultados de las retinas izquierdas de los animales con sección del NO y administración de DHF, en los que a los 7 días sobrevivía aproximadamente el 94% de la población original y a los 21 días el efecto protector era aún significativo, aunque menor, con una supervivencia del 15% de la población original (Fig. 8). En resumen, unos resultados comparables a los que se obtuvieron en el primer grupo (Fig. 6).

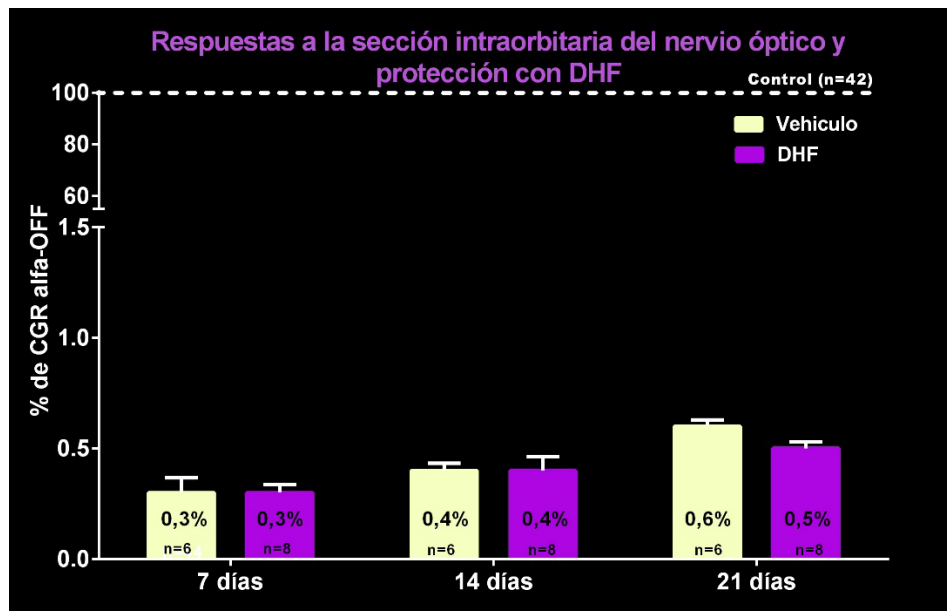


Figura 10. Histogramas de barras que muestran el porcentaje (en relación con las retinas derechas control), de la población de CGR α -OFF marcadas doblemente con Osteopontina y Brn3a, en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihydroxiflavona (DHF) o Vehículo y analizadas a los 7, 14 ó 21 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. La sección del NO induce a los 7 días una pérdida masiva de estas CGR con la supervivencia de aproximadamente el 0,5% que no responden a la protección con DHF (Gallego-Ortega et al., 2021).

La respuesta de las CGR α y sus subtipos a la sección del NO y administración de vehículo era diferente. Las CGR α , presentaban a los 7 días una supervivencia media de aproximadamente un 36% que no disminuía significativamente a intervalos

crecientes de supervivencia de 14 ó 21 días, indicando que tras una disminución rápida e importante de la población de CGR α , éstas mostraban una particular resiliencia pues la muerte no progresaba en el tiempo (Fig. 9). La población de CGR α -OFF, sin embargo, mostró una degeneración abrupta y masiva, apenas se contabilizaban tres o cuatro CGR OPN⁺ Brn3a⁺ en cada una de las retinas analizadas a los 7, 14 ó 21 días, de modo que la población superviviente no alcanzaba el 0,5% de su valor original (Fig. 10). Las CGR α ONs (OPN⁺Tbr2⁺) presentaron a los 7 días una gran reducción en su supervivencia media de aproximadamente un 27% que no progresó significativamente a intervalos crecientes de supervivencia de 14 ó 21 días, indicando que, tras una disminución rápida e importante, esta población se mantenía en el tiempo (Fig. 11).

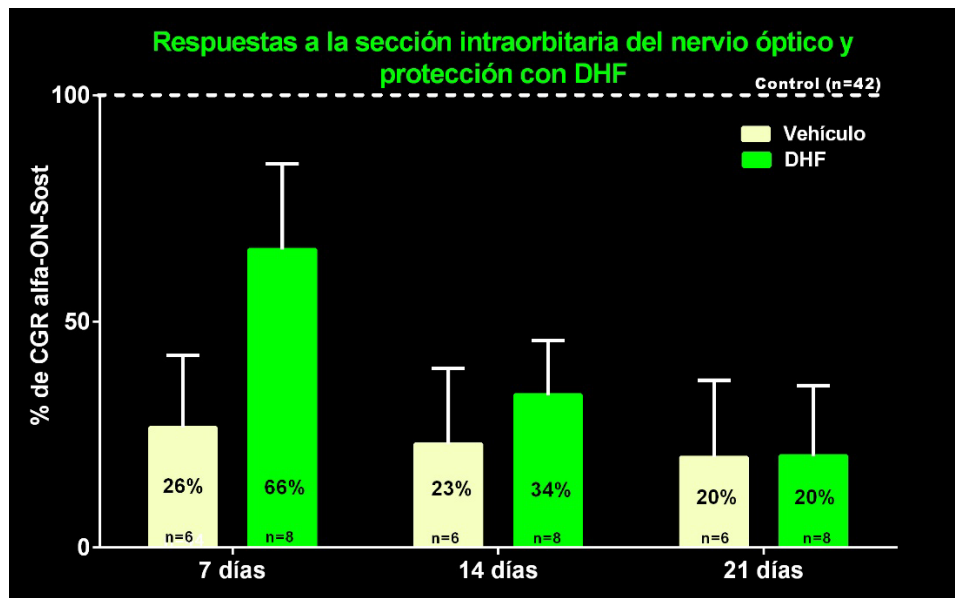


Figura 11. Histogramas de barras que muestran el porcentaje (en relación con las retinas derechas control) de la población de CGR α -ON-Sostenidas marcadas doblemente con Osteopontina y Tbr2, en retinas experimentales izquierdas tratadas diariamente con 5 mg/kg i.p. de 7,8-dihidroxi-flavona (DHF) o Vehículo y analizadas a los 7, 14 ó 21 días de la sección intraorbitaria del nervio óptico. La sección del NO induce a los 7 días una disminución al 26% de su valor original, que no progresa significativamente con el tiempo, y la DHF produce una protección transitoria hasta los 14 días (Gallego-Ortega et al., 2021).

La respuesta de las CGR α y sus subtipos a la sección del NO y protección con DHF también resultó diferente. Las CGR α presentaban a los 7 y 14 días una supervivencia significativamente superior a la observada en las retinas tratadas con vehículo, pero no a los 21 días, sugiriendo que la DHF tiene un efecto rescate significativo, pero transitorio (Fig. 9). Para la población de CGR α -OFF no se pudo evidenciar ningún tipo de rescate con la DHF; las retinas mostraban el mismo aspecto que las retinas tratadas con vehículo analizadas a diferentes intervalos de supervivencia de 7 a 21 días, apenas se contabilizaban algunas células en cada una de las retinas analizadas (Fig. 10). Las CGR α ONs (OPN⁺Tbr2⁺), en las retinas tratadas con DHF y comparadas con las retinas tratadas con vehículo, mostraban supervivencias muy superiores a los 7 días, significativas a los 14 días, pero sin diferencia a los 21 días, indicando un importante efecto rescate de la DHF en periodos iniciales, pero transitorio (Fig. 11).

DISCUSION

Hemos utilizado técnicas desarrolladas en nuestro laboratorio para identificar, contar y mapear las respuestas de diferentes poblaciones de CGR en la retina de la rata adulta albina, la población general de CGR Brn3a⁺, la población de células melanopsínicas, y la población de células α incluyendo el tipo α ONs/M4 y la subpoblación α -OFF, a la sección intraorbitaria del nervio óptico y administración sistémica de la 7,8-dihidroxi-flavona (DHF).

La DHF tiene efectos neuroprotectores en múltiples modelos de enfermedades neurodegenerativas, mediados por la activación del receptor TrkB de alta afinidad del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Emili et al., 2020). Tras la sección del nervio óptico se producen cambios importantes en la expresión génica, que no son muy bien comprendidos (Agudo et al., 2008, 2009, Agudo-Barriuso et al., 2013), pero que afectan a múltiples vías implicadas en la apoptosis (Agudo et al., 2009; Sánchez-Migallon et al., 2011; 2016; Almasieh et al., 2012). En efecto, la muerte inducida por la sección del nervio óptico se puede prevenir significativamente con la administración de factores antiapoptóticos (el inhibidor de la caspasa 3 (Z-DEVD-fmk) o de BDNF (Vidal-Sanz et al., 2000), y al menos el 50% de las CGR que degeneran tras la axotomía expresan Caspasa 3 activa (Sánchez-Migallon et al., 2016), corroborando que la muerte inducida por axotomía es apoptótica y se puede prevenir. Sin embargo, hasta nuestros

estudios, no se habían analizado con detalle los efectos *in vivo* de la DHF en la retina (Galindo-Romero et al., 2021; Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021).

Alteraciones funcionales

Además de las devastadoras consecuencias que tiene la sección del NO para la población de CGR, se producen también, pronto después de la lesión, alteraciones funcionales en la retina. Cuando se examinan las respuestas electroretinográficas frente a estímulos luminosos de campo completo se aprecian alteraciones importantes a las 24 horas de la lesión en las ondas b, que reflejan la actividad de las células bipolares, así como en la onda escotópica umbral que refleja la actividad de las CGR (Alarcon-Martínez et al., 2009, 2010; Gallego-Ortega et al., 2021). Sin embargo, se desconocía si la administración de protectores como la DHF, preservaba también la función de estas neuronas. En estudios longitudinales en los que se examinó la respuesta electroretinográfica de la retina tras la sección del nervio óptico y la administración de vehículo o DHF, se documentó que en las retinas tratadas con vehículo se registraban alteraciones significativas y progresivas de las ondas escotópicas umbrales. Estos resultados reflejan la degeneración de las CGR y corroboran estudios previos que han documentado previamente la degeneración de CGR tras la lesión del NO (Alarcon-Martínez et al., 2009; 2010), la hipertensión ocular aguda (Gallego-Ortega et al., 2020) o crónica (Cuenca et al., 2010). En retinas tratadas con DHF se apreciaron ondas escotópicas umbral que se mantenían durante los 21 días del estudio sugiriendo que la DHF no solo contribuye a la supervivencia de una proporción importante de CGR, sino que además mantiene sus propiedades funcionales (Gallego-Ortega et al., 2021).

Estudios previos han sugerido que algunos tipos de CGR presentan una supervivencia a la lesión mayor que el resto de la población de CGR (Cui et al., 2015; Duan et al., 2015; Vidal-Sanz et al., 2015a, 2015b, Agudo-Barriuso et al., 2016; Tran et al., 2019). Pero el comportamiento de la población general de CGR es sin duda resultado del promedio de todos sus tipos y sabemos que, en roedores, en concreto en el ratón, hay hasta 46 tipos diferentes de CGR, cada uno con sus características propias morfológicas, funcionales y moleculares (Tran et al., 2019). Es importante pues, tratar de conocer la respuesta de cada uno de estos tipos diferentes, pero en ausencia de marcadores individuales nuestro mejor abordaje a este problema consiste en la utilización de marcadores que identifican poblaciones o subpoblaciones de CGR. Así,

hemos investigado las respuestas de las CGR Brn3a⁺, melanopsínicas y alfa, pues son ejemplos de poblaciones diferentes, que se pueden identificar con anticuerpos contra Brn3a⁺, melanopsina, y osteopontina, respectivamente.

Respuestas de las CGR Brn3a⁺ a la lesión

Las CGRBrn3a⁺ suponen aproximadamente el 96% de las CGR, e incluyen muchos tipos de CGR diferentes que tienen en común que vehiculan la información necesaria para la formación de imágenes y percepción visual consciente. Por tanto, la respuesta de las CGR Brn3a⁺ a la sección del NO y a la neuroprotección con DHF es seguramente el promedio de las respuestas de cada uno de los tipos que componen esta población. No obstante, las CGRBrn3a⁺ muestran una respuesta consistente a la lesión y protección, refrendada por muchos estudios independientes ([Vidal-Sanz et al., 2017](#)), y si bien a los 7 días se produce ya la pérdida de un 40% de la población, esta pérdida se puede prevenir con moléculas protectoras prácticamente en su totalidad, aunque de forma transitoria. Queda pues por investigar y determinar cuáles de los tipos que se agrupan dentro de la población de CGR Brn3a⁺ responden a la protección con DHF y qué vía o vías intracelulares de señalización de supervivencia se activan en cada caso.

Respuestas de las CGR melanopsínicas a la lesión

Las CGR melanopsínicas (m⁺) muestran una particular resistencia a diferentes tipos de lesión, incluida la excitotoxicidad inducida por NMDA ([Vidal-Villegas et al., 2019](#)), la hipertensión ocular aguda ([Rovere et al., 2016](#)) o crónica ([Valiente-Soriano et al., 2015](#); [VanderWall et al., 2020](#)), o la fototoxicidad inducida por luz ([García-Ayuso et al., 2017](#)). En nuestros estudios, las CGR m⁺ presentaban una mayor supervivencia tras la sección del nervio óptico, corroborando estudios previos de éste ([Nadal-Nicolás et al., 2015a, 2015b](#); [Sánchez-Migallon et al., 2018](#); [Vidal-Villegas et al., 2021](#)) y otros ([Robinson y Madison, 2004](#); [Pérez de Sevilla et al., 2014](#)) laboratorios. Las CGR m⁺, son una población distinta de las CGR Brn3a⁺, en la actualidad hay descritos 6 tipos (M1-M6) de CGR melanopsínicas en el ratón y 5 tipos (M1-M5) en la rata ([Vidal-Villegas et al., 2021b](#)), y suponen aproximadamente un 2,5% de la población total de CGR en la rata ([Nadal-Nicolás et al., 2014](#)). Incluso para esta población tan pequeña, las respuestas observadas probablemente sean el promedio de al menos tres tipos

diferentes, pues los anticuerpos contra la melanopsina identifican los tipos M1-M3 que expresan mayores cantidades de melanopsina (Vidal-Villegas et al., 2021b). Es más, incluso las M1, el tipo más numeroso (Do et al., 2019), es heterogéneo en su función y territorios que inerva, pudiendo subdividirse según exprese Brn3b en dos poblaciones diferentes (Chen et al., 2011; Beier et al., 2021, 2022). El comportamiento de estas CGR m⁺, también es consistente, presentan una resistencia particular a la axotomía (por sección completa o aplastamiento) (Nadal-Nicolás et al., 2015a) de modo que a los 14 días de la lesión sobrevive aproximadamente el 40% de esta población, sin que se aprecien disminuciones significativas con el tiempo.

Respuestas de las CGR α a la lesión

Nuestros resultados corroboran estudios previos que sugieren una mayor resistencia de las CGR α (Duan et al., 2015; Tran et al., 2019; VanderWall et al., 2020), y documentan que diferentes tipos de CGR α muestran comportamientos diferentes. La población de las CGR α , supone aproximadamente un 2,5% de la población total de las CGR en la rata adulta, y difieren también en su mayoría de las CGR Brn3a⁺ y de las CGR m⁺, aunque una pequeña proporción de las CGR α , las α -OFF que suponen un 0,9% de la población total de CGR, también expresan Brn3a, y las α ONs corresponden al tipo M4 de las CGRif, pero este tipo de CGR no se marca con melanopsina, y representan el 1,2% de todas las CGR (Gallego-Ortega et al., 2021). Las CGR α , como población, también presentan una reducción rápida tras la sección del NO pues a los 7 días se aprecia la pérdida del 60% de la población original que, sin embargo, no progresa en el tiempo. Un comportamiento similar presenta el tipo de CGR α ONs, mientras que la subpoblación de CGR α -OFF resulta ser extremadamente sensible a la lesión con su práctica desaparición.

Comparación de las respuestas de diferentes tipos de CGR a la lesión

Cuando se comparan las respuestas de las CGR Brn3a⁺ versus las CGR m⁺ llama la atención que las CGR m⁺ tienen una muerte menor; e. g. a los 14 días de la lesión las CGR m⁺ presentan una disminución del 60%, frente al 83% de la población general de CGR Brn3a⁺. Además, la muerte de las CGR m⁺ no progresa en el tiempo, de modo que a los 60 días persiste en la retina una población de CGR m⁺ comparable. Las CGR α también muestran una particular resiliencia a la sección del nervio óptico pues tras una

disminución abrupta de la población, ostensible a los 7 días de la lesión, no se aprecia progresión de la muerte de estas células. Mientras que el tipo α ONs/M4 muestra una resiliencia similar a la población general de CGR α , la población de CGR α -OFF son muy sensibles a la lesión y a los 7 días prácticamente han desaparecido de la retina.

Respuestas de diferentes tipos de CGR a la neuroprotección

La respuesta de las CGR a la protección con DHF también varía notoriamente según las poblaciones estudiadas. La población general de CGR Brn3a⁺ presenta una respuesta al tratamiento con la DHF, que es muy significativa en los primeros 14 días tras la lesión, persiste hasta los 21 días y luego desaparece. El efecto protector de la DHF también es significativo, aunque menor en su magnitud, en la población de CGR melanopsínicas, pero a diferencia de las Brn3a⁺, en las melanopsínicas el efecto rescate es permanente. En la población de CGR α también se aprecia un efecto protector de la DHF en los períodos iniciales que tiende a disiparse con el tiempo, algo parecido a lo que se observa en el tipo de CGR α ONs/M4 con una muy buena protección inicial que desaparece a los 21 días. Sin embargo, la DHF no parece ejercer protección alguna frente a la axotomía en la población de CGR α -OFF. En resumen, la administración i.p. de DHF previene la muerte de las tres poblaciones de CGR que hemos examinado, resultando en un rescate muy amplio pero transitorio de las CGR BRn3a⁺, un rescate sustancial y permanente de las CGR m⁺ y en un rescate más moderado pero transitorio en las CGR α .

Corolario final

Los estudios previos de la utilidad de la dihidroxiflavona como neuroprotector en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas indican que uno de los posibles mecanismos de actuación es por la activación selectiva del receptor TrkB, su fosforilación y activación subsecuente de las vías intracelulares de supervivencia (Jang et al., 2010; Emili et al., 2020). En nuestros estudios en la retina hemos documentado también que la administración sistémica de la DHF resulta en la fosforilación y activación de las vías de señalización intracelular, implicadas en la supervivencia, PI3K/AKT y MAP/ERK (Galindo-Romero et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021). Es tentador sugerir que el mecanismo por el que la DHF previene la muerte de las CGR tras la axotomía sea por el bloqueo de estas vías intrínsecas y extrínsecas de la

apoptosis (Galindo-Romero et al., 2021), y sería interesante conocer si son estas vías, u otras, las que se activan en las diferentes poblaciones de CGR estudiadas o en cada uno de los tipos particulares de CGR que las componen.

En resumen, nuestros trabajos indican que tipos diferentes de CGR tienen respuestas idiosincráticas y por tanto diferentes a la lesión y su prevención. Una hipótesis que ha recibido mucha atención recientemente pues ha sido explorada en múltiples trabajos (Valiente-Soriano et al., 2015; Vidal-Sanz et al., 2015a, 2015b; Agudo-Barriuso et al., 2016; Ou et al., 2016; Rovere et al., 2016; Christensen et al., 2019; Tran et al., 2019; VanderWall et al., 2020; Yang et al., 2020), incluidos los nuestros más recientes (Galindo-Romero et al., 2021; Gallego-Ortega et al., 2021; Vidal-Villegas et al., 2021).

Como las tres poblaciones analizadas en estos estudios son distintas, pues en general las CGR no coexpresan Brn3a, melanopsina y osteopontina, nuestros resultados muestran que la respuesta a la protección con DHF difiere en estas tres poblaciones analizadas, y sugieren además que los tipos que componen las Brn3a, que en conjunto muestran la mejor protección con la DHF, aún están por caracterizar. Una de las líneas de trabajo futura más ilusionante consiste en dilucidar el comportamiento de cada uno de estos tipos de CGR a la lesión y su respuesta a la neuroprotección. Descifrar los mecanismos moleculares responsables de estas respuestas diferentes puede ayudar sin duda a conocer mejor como tratar o modificar la respuesta neuronal a la lesión.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que la sección intraorbitaria del nervio óptico induce la degeneración de las CGR, pero esta respuesta degenerativa difiere según la población de CGR analizadas, la población de CGR formadora de imágenes (CGR Brn3a⁺), la población de CGR melanopsínicas responsables de las funciones no formadoras imágenes (CGR m⁺), la población de CGR α (CGR OPN⁺) incluyendo el tipo de CGR α ONS/M4 (CGR OPN⁺Tbr2⁺) y la subpoblación de CGR α -OFF (CGR OPN⁺Brn3a⁺).

Tras la sección intraorbitaria del nervio óptico, la administración de vehículo resulta en la pérdida abrupta y masiva de las CGR α -OFF (CGR OPN⁺Brn3a⁺); en la pérdida masiva y progresiva de las CGR formadora de imágenes (CGR Brn3a⁺); y en una pérdida menor y no progresiva de las CGR melanopsínicas (CGR m⁺), la población de

CGR α (CGR OPN⁺), y el tipo de CGR α ONS/M4 (CGR OPN⁺Tbr2⁺), sugiriendo que estas últimas presentan una resistencia particular a la lesión.

El tratamiento con DHF resultó en una supervivencia significativa de las poblaciones CGR Brn3a⁺, GRR m⁺, CGR OPN⁺, y del tipo α ONS/M4 (CGR OPN⁺Tbr2⁺), indicando que estas poblaciones responden a la protección inducida por la DHF. Sin embargo, la subpoblación de CGR α -OFF (CGR OPN⁺Brn3a⁺) no responde a la protección inducida por DHF.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy especialmente la colaboración de Johnny Di Pierdomenico, Caridad Galindo Romero, Alejandro Gallego Ortega y Beatriz Vidal-Villegas, autores de los trabajos originales que hemos revisado en este manuscrito. También quisiera extender mi gratitud a todos los miembros del Laboratorio de Oftalmología Experimental, a los que trabajan actualmente y a los que colaboraron en tiempos pasados. Agradezco también la ayuda técnica provista por José M Bernal Garro y M^a Dolores Soria Rodríguez.

Estos trabajos han sido financiados por la: Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología Región de Murcia: 19881/GERM/15; y por el Ministerio de Ciencia e Innovación RED2018-102499-T, PID2019-106498GB-I00, y MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Dedicatoria

Quisiera dedicar esta lección inaugural, del acto de apertura de curso de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, en recuerdo del Prof. Garth M Bray, uno de mis tres muy queridos maestros canadienses, fallecido el pasado 26 de septiembre. Un modelo a seguir por sus discípulos en la clínica o en la investigación, respetado y muy querido por sus colegas, se ha dicho de él y con acierto que era tan bondadoso como genial. El Prof. GM Bray era Catedrático de Neurología de la Universidad McGill, Director de la división de Neurología del Hospital General de Montreal (MGH), Investigador principal en el Centro de Investigación en Neurociencias del MGH, y miembro del Departamento de Neurociencias del Instituto Neurológico de Montreal (Instituto Penfield) de la Universidad McGill (Montreal, Quebec, Canadá).

BIBLIOGRAFÍA

- Abed S, Reilly A, Arnold SJ, Feldheim DA. Adult Expression of Tbr2 Is Required for the Maintenance but Not Survival of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Front Cell Neurosci.* **2022**; 16:826590. PMID: 35401124.
- Aguayo AJ, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM. Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult rats with optic nerves substituted by PNS grafts linking the eye and the midbrain. *Ann N Y Acad Sci.* **1987**; 495:1-9. PMID: 3474936.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lönnngren U, Sobrado P, Conesa A, Cánovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis.* **2008**; 14:1050-1063. PMID: 18552980.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lönnngren U, Salinas-Navarro M, Cánovas I, Nadal-Nicolás FM, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M. Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2009**; 50:424-431. PMID: 18775855.
- Agudo-Barriuso M, Lahoz A, Nadal-Nicolás FM, Sobrado-Calvo P, Piquer-Gil M, Díaz-Llopis M, Vidal-Sanz M, Mullor JL. Metabolomic changes in the rat retina after optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2013**; 54:4249-4259. PMID: 23696609.
- Agudo-Barriuso M, Nadal-Nicolás FM, Madeira MH, Rovere G, Vidal-Villegas B, Vidal-Sanz M. Melanopsin expression is an indicator of the well-being of melanopsin-expressing retinal ganglion cells but not of their viability. *Neural Regen Res.* **2016**; 11:1243-4. PMID: 27651769.
- Alarcon-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis.* **2009**; 15:2373-2383. PMID: 19936311.
- Alarcon-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso M, Villa P de L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* **2010**; 50:2176-2187. PMID: 20727908.
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* **2012**; 31:152-181. PMID: 22155051.
- Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M. Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci.* **2000**; 20:361-374. PMID: 10627613.
- Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* **2003**; 184: 767-777. PMID: 14769369.
- Baden T, Berens P, Franke K, Román Roson M, Bethge M, Euler T. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature.* **2016**; 529:345-350. PMID: 26735013.

- Bae JA, Mu S, Kim JS, Turner NL, Tartavull I, Kemnitz N, Jordan CS, Norton AD, Silversmith WM, Prentki R, Sorek M, David C, Jones DL, Bland D, Sterling ALR, Park J, Briggman KL, Seung HS; Eyewirers. Digital Museum of Retinal Ganglion Cells with Dense Anatomy and Physiology. *Cell*. **2018**; 173:1293-1306. PMID: 29775596.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. **1982**; 1:549-553. PMID: 7188352.
- Beier C, Zhang Z, Yurgel M, Hattar S. Projections of ipRGCs and conventional RGCs to retinorecipient brain nuclei. *J Comp Neurol*. **2021**; 529:1863-1875. PMID: 33104235.
- Beier C, Bocchero U, Levy L, Zhang Z, Jin N, Massey SC, Ribelayga CP, Martemyanov K, Hattar S, Pahlberg J. Divergent outer retinal circuits drive image and non-image visual behaviors. *Cell Rep*. **2022**; 39(13):111003. PMID: 35767957.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. **2002**; 295:1070-1073. PMID: 11834835.
- Bray GM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. The use of peripheral nerve grafts to enhance neuronal survival, promote growth and permit terminal reconnections in the central nervous system of adult rats. *J Exp Biol*. **1987**; 132:5-19. PMID: 3323406.
- Chen SK, Badea TC, Hattar S. Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*. **2011**; 476:92-95. PMID: 21765429.
- Chen CK, Kiyama T, Weber N, Whitaker CM, Pan P, Badea TC, Massey SC, Mao CA. Characterization of Tbr2-expressing retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. **2021**; 529:3513-3532. PMID: 34245014.
- Christensen I, Lu B, Yang N, Huang K, Wang P, Tian N. The Susceptibility of Retinal Ganglion Cells to Glutamatergic Excitotoxicity Is Type-Specific. *Front Neurosci*. **2019**; 13:219. PMID: 30930737.
- Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res*. **2010**; 91:273-285. PMID: 20650699.
- Cui Q, Ren C, Sollars PJ, Pickard GE, So KF. The injury resistant ability of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuroscience*. **2015**; 284:845-853. PMID: 25446359.
- Dhande OS, Stafford BK, Lim JA, Huberman AD. Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annu Rev Vis Sci*. **2015**; 1:291-328. PMID: 28532372.
- Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ. Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2000**; 41:4014-4021. PMID: 11053307.
- Do MTH. Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. *Neuron*. **2019**; 104:205-226. PMID: 31647894.
- Duan X, Qiao M, Bei F, Kim IJ, He Z, Sanes JR. Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling. *Neuron*. **2015**; 85:1244-56. PMID: 25754821.

- Emili M, Guidi S, Uguagliati B, Giacomini A, Bartesaghi R, Stagni F. Treatment with the flavonoid 7,8-Dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2022**; 62:13-50. PMID: 32914634.
- Forrester J, Peters A. Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature.* **1967**; 214:245-247. PMID: 4166494.
- Galindo-Romero C, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M. Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res.* **2013a**; 108:84-93. PMID: 23295345.
- Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-Lopez M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2013b**; 54:974-985. PMID: 23307961.
- Galindo-Romero C, Vidal-Villegas B, Asís-Martínez J, Lucas-Ruiz F, Gallego-Ortega A, Vidal-Sanz M. 7,8-Dihydroxyflavone Protects Adult Rat Axotomized Retinal Ganglion Cells through MAPK/ERK and PI3K/AKT Activation. *Int J Mol Sci.* **2021**; 22:10896. PMID: 34639236.
- Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, Miralles de Imperial-Ollero JA, Bernal-Garro JM, Valiente-Soriano FJ, de la Villa Polo P, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Functional and morphological alterations in a glaucoma model of acute ocular hypertension. *Prog Brain Res.* **2020**; 56:1-29. PMID: 32958209.
- Gallego-Ortega A, Vidal-Villegas B, Norte-Muñoz M, Salinas-Navarro M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 7,8-Dihydroxyflavone Maintains Retinal Functionality and Protects Various Types of RGCs in Adult Rats with Optic Nerve Transection. *Int J Mol Sci.* **2021**; 22:11815. PMID: 34769247.
- Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, Di Pierdomenico J, Avilés-Trigueros M, De la Villa P, Valiente-Soriano FJ, Vidal-Sanz M. Alpha retinal ganglion cells in pigmented mice retina: number and distribution. *Front Neuroanat.* **2022**; 16:1054849. PMID: 36530520.
- Gao J, Provencio I, Liu X. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in glaucoma. *Front Cell Neurosci.* **2022**; 16:992747. PMID: 36212698.
- García-Ayuso D, Galindo-Romero C, Di Pierdomenico J, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas Pérez MP. Light-induced retinal degeneration causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina. *Exp Eye Res.* **2017**; 161:10-16. PMID: 28552384.
- Hartline HK. The response of single optic nerve fibers of the vertebrate to illumination of the retina. *Am. J. Physiol.* **1938**; 121:400-415.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* **2002**; 295:1065-1070. PMID: 11834834.
- Huang W, Xu Q, Su J, Tang L, Hao ZZ, Xu C, Liu R, Shen Y, Sang X, Xu N, Tie X, Miao Z, Liu X, Xu Y, Liu F, Liu Y, Liu S. Linking transcriptomes with morphological and functional phenotypes in mammalian retinal ganglion cells. *Cell Rep.* **2022**; 40:111322. PMID: 36103830.
- Huxlin KR, Goodchild AK. Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *J Comp Neurol.* **1997**; 385:309-323. PMID: 9268130.

- Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanche B, Sun YE, Ye K. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2010**; 107:2687-3692. PMID: 20133810.
- Krieger B, Qiao M, Rousso DL, Sanes JR, Meister M. Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. *PLoS One*. **2017**; 12:e0180091. PMID: 28753612.
- Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök F. Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching. *Brain Res Brain Res Protoc*. **2002**; 10:75-83. PMID: 12431706.
- Lindqvist N, Lönngren U, Agudo M, Näpänkangas U, Vidal-Sanz M, Hallböök F. Multiple receptor tyrosine kinases are expressed in adult rat retinal ganglion cells as revealed by single-cell degenerate primer polymerase chain reaction. *Ups J Med Sci*. **2010**; 115:65-80. PMID: 20187850.
- Lönngren U, Näpänkangas U, Lafuente M, Mayor S, Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök F. The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Res Bull*. **2006**; 71:208-218. PMID: 17113948.
- Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Salinas-Navarro M, González-Riquelme MJ, Vidal-Sanz M, Agudo Barriuso M. Systemic and Intravitreal Antagonism of the TNFR1 Signaling Pathway Delays Axotomy-Induced Retinal Ganglion Cell Loss. *Front Neurosci*. **2019**; 13:1096. PMID: 31680831.
- Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Albaladejo-García V, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Mechanisms implicated in the contralateral effect in the central nervous system after unilateral injury: focus on the visual system. *Neural Regen Res*. **2021**; 16:2125-2131. PMID: 33818483.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994**; 91:1632-1636. PMID: 8127857.
- Miralles de Imperial-Ollero JA, Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, Di Pierdomenico J, Bernal-Garro JM, Valiente-Soriano FJ, Vidal-Sanz M. Short- and Long-Term Study of the Impact of Focal Blue Light-Emitting Diode-Induced Phototoxicity in Adult Albino Rats. *Int J Mol Sci*. **2021a**; 22:9742. PMID: 34575905.
- Miralles de Imperial-Ollero JA, Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, Di Pierdomenico J, Valiente-Soriano FJ, Vidal-Sanz M. An in vivo model of focal light emitting diode-induced cone photoreceptor phototoxicity in adult pigmented mice: Protection with bFGF. *Exp Eye Res*. **2021b**. PMID: 34450185.
- Morin LP, Studholme KM. Retinofugal projections in the mouse. *J Comp Neurol*. **2014**; 522:3733-3753. PMID: 24889098.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2009**; 50:3860-3868. PMID: 19264888.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-Lopez M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors

- in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*. **2012**; 7(11):e49830. PMID: 23166779.
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat*. **2014**; 8:99. PMID: 25339868.
- Nadal-Nicolás FM, Sobrado-Calvo P, Jiménez-Lopez M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Long-Term Effect of Optic Nerve Axotomy on the Retinal Ganglion Cell Layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2015a**; 56:6095-6112. PMID: 26393669.
- Nadal-Nicolás FM, Madeira MH, Salinas-Navarro M, Jiménez-Lopez M, Galindo-Romero C, Ortín-Martínez A, Santiago AR, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Transient Downregulation of Melanopsin Expression After Retrograde Tracing or Optic Nerve Injury in Adult Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2015b**; 56:4309-4323. PMID: 26176868.
- Nassi JJ, Callaway EM. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci*. **2009**; 10:360-372. PMID: 19352403.
- Norte-Muñoz M, Lucas-Ruiz F, Gallego-Ortega A, García-Bernal D, Valiente-Soriano FJ, de la Villa P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Neuroprotection and Axonal Regeneration Induced by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Depend on the Type of Transplant. *Front Cell Dev Biol*. **2021**; 9:772223. PMID: 34805178.
- Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Alarcon-Martínez L, Jiménez-Lopez M, Bernal-Garro JM, Nieto-Lopez L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF. *PLoS One*. **2014**; 9(12):e113798. PMID: 25464513.
- Ou Y, Jo RE, Ullian EM, Wong RO, Della Santina L. Selective Vulnerability of Specific Retinal Ganglion Cell Types and Synapses after Transient Ocular Hypertension. *J Neurosci*. **2016**; 36(35):9240-9252. PMID: 27581463.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res*. **2009**; 89(1):32-41. PMID: 19268467.
- Peichl L. Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *J Comp Neurol*. **1989**; 286:120-39. PMID: 2768556.
- Peichl L, Ott H, Boycott BB. Alpha ganglion cells in mammalian retinae. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **1987**; 231:169-197. PMID: 2889210.
- Peichl L. Alpha ganglion cells in mammalian retinae: common properties, species differences, and some comments on other ganglion cells. *Vis Neurosci*. **1991**; 7:155-69. PMID: 1931799.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **1996**; 37:489-500. PMID: 8595949.

- Pérez de Sevilla Müller L, Sargoy A, Rodriguez AR, Brecha NC. Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. *PLoS One*. **2014**; 9(3):e93274. PMID: 24671191.
- Perry VH. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **1979**; 204:363-375. PMID: 37522.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**; 95:340-345. PMID: 9419377.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. **2000**; 20:600-605. PMID: 10632589.
- Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2010**; 51:5690-5696. PMID: 20538983.
- Rheume BA, Jereen A, Bolisetty M, Sajid MS, Yang Y, Renna K, Sun L, Robson P, Trakhtenberg EF. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nat Commun*. **2018**; 9:2759. PMID: 30018341.
- Robinson GA, Madison RD. Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res*. **2004**; 44:2667-2674. PMID: 15358062.
- Rovere G, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Nucci C, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Comparison of Retinal Nerve Fiber Layer Thinning and Retinal Ganglion Cell Loss After Optic Nerve Transection in Adult Albino Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2015**; 56:4487-4498. PMID: 26193926.
- Rovere G, Nadal-Nicolás FM, Wang J, Bernal-Garro JM, García-Carrillo N, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. Melanopsin-Containing or Non-Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells Response to Acute Ocular Hypertension With or Without Brain-Derived Neurotrophic Factor Neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2016**; 57:6652-6661. PMID: 27930778.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-Lopez M, Valiente-Soriano FJ, Alarcon-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res*. **2009**; 49:637-647. PMID: 19948111.
- Salinas-Navarro M, Alarcon-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-Lopez M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res*. **2010**; 90:168-183. PMID: 19835874.
- Sánchez-Migallon MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*. **2011**; 92:260-267. PMID: 21315070.

- Sánchez-Migallon MC, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss With BDNF or a Caspase 3 Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2016**; 57:81-93. PMID: 26780312.
- Sánchez-Migallon MC, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Di Pierdomenico J, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Survival of melanopsin expressing retinal ganglion cells long term after optic nerve trauma in mice. *Exp Eye Res.* **2018a**;174:93-97. PMID: 29856984.
- Sánchez-Migallon MC, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-Lopez M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Nerve fibre layer degeneration and retinal ganglion cell loss long term after optic nerve crush or transection in adult mice. *Exp Eye Res.* **2018b**; 170:40-50. PMID: 29452106.
- Schmidt TM, Alam NM, Chen S, Kofuji P, Li W, Prusky GT, Hattar S. A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection. *Neuron.* **2014**; 82:781-788. PMID: 24853938.
- Sellés-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **1996**; 37:2002-2014. PMID: 8814140.
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* **1987**; 406:317-321. PMID: 2436717.
- Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G, Yan W, Adiconis X, Arnold ME, Lee JM, Levin JZ, Lin D, Wang C, Lieber CM, Regev A, He Z, Sanes JR. Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron.* **2019**; 104:1039-1055.e12. PMID: 317842865.
- Tribble JR, Cross SD, Samsel PA, Sengpiel F, Morgan JE. A novel system for the classification of diseased retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* **2014**; 31:373-380. PMID: 25384170.
- Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M. Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat.* **2014**; 8:131. PMID: 25477787.
- Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-Lopez M, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. BDNF Rescues RGCs But Not Intrinsically Photosensitive RGCs in Ocular Hypertensive Albino Rat Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2015**; 56:1924-1936. PMID: 25722208.
- Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Gallego-Ortega A, Miralles de Imperial-Ollero JA, Jiménez-Lopez M, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. Topical Brimonidine or Intravitreal BDNF, CNTF, or bFGF Protect Cones Against Phototoxicity. *Transl Vis Sci Technol.* **2019**; 8(6):36. PMID: 31890348.
- VanderWall KB, Lu B, Alfaro JS, Allsop AR, Carr AS, Wang S, Meyer JS. Differential susceptibility of retinal ganglion cell subtypes in acute and chronic models of injury and disease. *Sci Rep.* **2020**; 10:17359. PMID: 33060618.

- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci*. **1987**; 7:2894-2909. PMID: 3625278.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol*. **1988**; 102:92-101. PMID: 3181354.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol*. **1991**; 20:940-952. PMID: 1809272.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Selles-Navarro I, Rodriguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Perez MP. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res*. **2000**; 2:215-27. PMID: 16787842.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol*. **2001**; 45:S261-267; PMID: 11377446.
- Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD. Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res*. **2002**; 137:443-452. PMID: 12440386.
- Vidal-Sanz M, De la Villa P, Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Villegas-Perez MP. Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* **2007**; 21:S42-S45. DOI 10.1038/sj.eye.6702888.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcon-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res*. **2012**; 31:1-27. PMID: 21946033.
- Vidal-Sanz M, Nadal-Nicolás FM, Valiente-Soriano FJ, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. Identifying specific RGC types may shed light on their idiosyncratic responses to neuroprotection. *Neural Regen Res*. **2015a**; 10:1228-1230. PMID: 26487846.
- Vidal-Sanz M, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-Lopez M, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. Retinal neurodegeneration in experimental glaucoma. *Prog Brain Res*. **2015b**; 220:1-35. PMID: 26497783.
- Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Ortin-Martinez A, Rovere G, Salinas-Navarro M, Lucas-Ruiz F, Sanchez-Migallon MC, Sobrado-Calvo P, Aviles-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M. Shared and Differential Retinal Responses against Optic Nerve Injury and Ocular Hypertension. *Front Neurosci*. **2017**; 11:235. PMID: 28491019.
- Vidal-Villegas B, Di Pierdomenico J, Miralles de Imperial-Ollero JA, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Bernal-Garro JM, Cuenca Navarro N, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Melanopsin+RGCs Are fully Resistant to NMDA-Induced Excitotoxicity. *Int J Mol Sci*. **2019**; 20:3012. PMID: 31226772.
- Vidal-Villegas B, Di Pierdomenico J, Gallego-Ortega A, Galindo-Romero C, Martínez-de-la-Casa JM, García-Feijoo J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Systemic treatment with 7,8-Dihydroxiflavone activates TtkB

and affords protection of two different retinal ganglion cell populations against axotomy in adult rats. *Exp Eye Res.* **2021a**; 210:108694. PMID: 34245756.

Vidal-Villegas B, Gallego-Ortega A, Miralles de Imperial-Ollero JA, Martínez de la Casa JM, García Feijoo J, Vidal-Sanz M. Photosensitive ganglion cells: A diminutive, yet essential population. *Arch Soc Esp Oftalmol (Engl Ed).* **2021b**; 96:299-315. PMID: 34092284.

Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* **1988**; 8:265-280. PMID: 2448429.

Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* **1993**; 24:23-36. PMID: 8419522.

Wurzelmann M, Romeika J, Sun D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* **2017**; 12:7-12. PMID: 28250730.

Yang N, Young BK, Wang P, Tian N. The Susceptibility of Retinal Ganglion Cells to Optic Nerve Injury is Type Specific. *Cells.* **2020**; 9:677. PMID: 32164319.

Zhang Y, Kim IJ, Sanes JR, Meister M. The most numerous ganglion cell type of the mouse retina is a selective feature detector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**; 109:E2391-8. PMID: 22891316.