

# **Contaje de Células Microgliales en Modelo Experimental de Glaucoma tras 24h de inducir Hipertensión Ocular**

## **Counting Microglial Cells in an Experimental Model of Glaucoma 24h after induction of Intraocular Hypertension**

Rosa González Martín

Tutor:

A.I. Ramírez Sebastián y J.M. Ramírez Sebastián

Universidad Complutense de Madrid

### *Resumen*

El propósito del trabajo es cuantificar los signos de activación glial en las células microgliales retinianas 24h tras la inducción de hipertensión ocular mediante laser, tanto en el ojo tratado hipertenso como en el contralateral normotenso. Se utilizaron ratones albinos Swiss, que se dividieron en dos grupos: controles e hipertensos oculares (HTO), se cuantificaron las células microgliales Iba1+ en las capas retinianas: capa de conos y bastones (CCB), plexiforme externa (CPE), plexiforme interna (CPI) y capa de células ganglionares-fibras del nervio óptico (CCG-FNO). En todas las capas se hizo contaje semiautomático salvo en la última que se midieron las áreas ocupadas por las células Iba1+. Se realizó el análisis estadístico para comparar el número de células en el ojo control, en el HTO y el contralateral mediante la aplicación de test no paramétricos, donde no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de células. A pesar de ello, se encuentran cambios morfológicos precoces tanto en los ojos hipertensos como en los contralaterales. En conclusión, encontramos una gliosis no proliferativa a las 24h de hipertensión inducida por láser tanto en los HTO como en sus contralaterales normotensos.

*Palabras clave: microglia, glaucoma, contaje, hipertensión ocular, inflamación.*

### *Abstract*

The aim of this work was the quantification of retinal microglia signs of activation after 24h from it have been induced unilateral ocular hypertension in hypertense-eye and contralateral-eye. It was used Albino Swiss mice which were divided in two groups: naïve and lasered. The mounted retinal plane was immunolabeled using anti-Iba1 in order to quantify the number of microglial cells in photoreceptor layer, in outer plexiform layer and the inner plexiform layer too, aiming to compare hypertension eyes, contralateral eyes and naïve eyes. It was also quantified the areas of the retina which were occupied by Iba1+ cells in ganglionar cells layer-nervous fiber layer. As a result, after it were done the statistic analyse, it was not found significant differences in number of cells between the hypertension-eyes and contralateral eyes. Although we had not found statistic significant differences in counting, there were early important morphological changes in hypertense-eye microglial cells and in contralateral-eye microglial cells. Concluding, at 24h, hypertension induced by laser produces a reactive no proliferative microgliotic response in both eyes: in hypertension eyes and contralateral untreated eyes.

*Keywords: microglía, glaucoma, counting, ocular hypertension, inflammation.*

## Introducción

El glaucoma, segunda causa de ceguera irreversible en el mundo, es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de las células ganglionares de la retina que conduce a la pérdida de visión (Quigley y Broman, 2006). En los estadios precoces de esta enfermedad, la reactivación de las células de microglía interviene en la progresión del daño glaucomatoso. Cuando las neuronas sufren un daño la microglía se activa: cambia su forma, prolifera, migra y cambia la expresión de diferentes enzimas, receptores, factores de crecimiento y citoquinas (Rojas et al., 2014), contribuyendo a la neurodegeneración. El papel de la microglía en la fisiopatología del glaucoma no se conoce del todo y, por lo tanto, con el presente trabajo pretendemos hacer el análisis cuantitativo y cualitativo de la respuesta de estas células en un estadio precoz de activación (24h), tras la inducción de la HTO, con el fin de contribuir a las bases del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La disposición de estas células en las distintas capas de la retina y su organización en plexos permite hacer una evaluación cuantitativa y cualitativa de los cambios gliales ante un daño.

## Material y métodos

Se utilizaron ratones machos Swiss adultos (12 semanas) divididos en dos grupos de estudio: control (n=6) y OHT (n=6) estudiándose de este último ambos ojos (el hipertenso y el contralateral normotenso (Gallego et al., 2012; Ramírez et al., 2015) La HTO se indujo en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, bajo anestesia general, mediante fotocoagulación con laser diodo de las venas episclerales y limbares del ojo izquierdo (Salinas-Navarro et al., 2009). A las 24h, se tomaron las presiones oculares con tonómetro de rebote, previo al sacrificio de los animales. Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital sódico realizándose la fijación del tejido mediante perfusión intracardiaca de paraformaldehído al 4% 0,1M pH7,4. Los ojos se enuclearon y postfijaron en el mismo fijador. Se extrajeron las retinas y se procesaron para la realización de montajes planos realizándose

el estudio inmunohistoquímico mediante inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo primario anti Iba-1 (Rabbit 1/600) que permiten identificar células microgliales, macrófagos y dendríticas y como anticuerpo secundario A594 anti-rabbit (Donkey 1/800).

Las muestras obtenidas se analizaron con el microscopio AXIO IMAGER 2 (Zeiss, Germany) y fueron capturadas por AxioCam 503 mono junto con el dispositivo Apotome-2. El análisis de las imágenes se realizó en (ZEN imaging software) y APOTOME-2 (Zeiss, Germany); Microscopy Compact Workstation Core i5 multilingual (CARL ZEISS, Germany).

Se realizaron capturas de los dos ejes retinianos X e Y tomando como referencia el disco óptico, fotografiando los campos que pasan por dichos ejes, sin incluir el disco por la diferente disposición de las células, obteniéndose fotografías de las áreas nasal, temporal, superior e inferior de las retinas. Se excluyeron aquellas áreas que presentaban fisuras del tejido o pliegues que podrían interferir en el conteo celular.

Para la realización de los conteos celulares se utilizó un algoritmo creado en MATLAB (Gallego y de Gracia, 2016) para el conteo semiautomático de las células en las capas CPE y CPI y manual en la capa 1 y en c medida de áreas ocupadas por células Iba1+ mediante (*thresholding*) en la capa de CGL/NFL. Previamente fue necesario el ajuste de la resolución de las imágenes con Adobe CS3 a imágenes de 1388 x 1040 píxeles. Para el análisis estadístico se utilizaron hojas de cálculo de Excel y SPSS.

## Resultados

Tras la valoración de la distribución no normal de las variables a estudio, se aplicaron test no paramétricos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el número de células entre control, contralateral e HTO en las capas, CCB, CPE y CPI.

En la CCG-CFNO encontramos un aumento significativo del área ocupada por células Iba1+, tanto en los ojos HTO como en sus contralaterales respecto de los controles, así como entre HTO y contralaterales (Tabla 1).

Se observan cambios morfológicos de activación en la microglía de todas las capas: aumento de formas ameboides

Tabla 1.

*Comparativa de los datos obtenidos en el análisis estadístico de las áreas ocupadas por las células Iba1+ en la capa de células ganglionares-fibras nerviosas. Se aplicaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney para variables independientes y de Wilcoxon para variables dependientes.*

Ojo tipo	Media	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Wilcoxon
Control	4096.94±260.97 $\mu^2$			
Contralateral	9383.19±1684.52 $\mu^2$	P < 0.002 (Control Vs Contralateral)	P < 0.002 (Control Vs Hipertenso)	P < 0.028 (Contralateral Vs Hipertenso)
Hipertenso	14812.97±3740.74 $\mu^2$			

en la CCG-FNO, retracción de las prolongaciones, aumento de las ramificaciones en la CPI y desplazamientos celulares, más acusados en los HTO que en los contralaterales.

### Discusión

A las 24h tras la inducción de la HTO, al igual que ocurre en este mismo modelo a 15 días tras la inducción (Rojas et al., 2014), se observan cambios morfológicos de activación microglial tanto en el OHT como en el contralateral normotenso, siendo menos severos en este estadio precoz. Además, no se encuentra aumento significativo del número de células microgliales, a diferencia de la gliosis proliferativa que se producía a los 15 días de la inducción de la HTO en este mismo modelo experimental (Rojas et al., 2014).

### Conclusiones

A las 24h de la inducción de HTO se produce una activación glial no proliferativa en todas las capas retinianas tanto en el HTO como en el contralateral normotenso.

### Referencias

Gallego, B. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A. I., Salinas-Navarro, M., ... Ramírez, J. M. (2012). IOP induces

upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 92. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-9-92>

Gallego, B. I., & de Gracia, P. (2016). Automatic counting of microglial cell activation and its applications. *Neural Regeneration Research*, 11(8), 1212-1215. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.189166>

Quigley, H. A., & Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, 90, 262-267. <http://doi.org/10.1136/bjo.2005.081224>

Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salobar-García, E., ... Ramírez, J. M. (2015). Chapter 7 - Macro- and microglial responses in the fellow eyes contralateral to glaucomatous eyes. *Progress in Brain Research*, 220, 155-172. <http://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.05.003>

Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F. J., ... Ramírez, J. M. (2014). Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 133. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-133>

Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., ... Vidal-Sanz, M. (2009). Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Molecular Vision*, 15, 2578-2598.