

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 713**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2010 PCT/GB2010/002040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11055121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10777076 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2496269**

54 Título: **Cuantificación de la muerte celular**

30 Prioridad:

**06.11.2009 GB 0919520**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.07.2018**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC. (100.0%)  
The Network Building 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**MOSS, STEPHEN;  
CORDEIRO, FRANCESCA, MARIA y  
DAKIN, STEVEN**

74 Agente/Representante:

**CAMPello ESTEBARANZ, Reyes**

**ES 2 674 713 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cuantificación de la muerte celular

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para determinar una fase de una enfermedad.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

La muerte celular y la pérdida neuronal son las principales causas patológicas de la neurodegeneración en afecciones tales como Alzheimer (EA), Parkinson, Huntington y glaucoma. La EA es la forma más común de demencia y se predice que aumentará de 4 a 12 millones de estadounidenses en los próximos 20 años. El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en todo el mundo y afecta al 2 % de las personas mayores de 40 años.

15

La afección tiene una morbilidad significativa debido a su naturaleza silenciosa y progresiva, que a menudo da como resultado un retraso en el diagnóstico y el tratamiento.

20

La formación de imágenes de células vivas se ha usado ampliamente para investigar la disfunción neuronal en células cultivadas *in vitro*, que junto con el marcado múltiple fluorescente permite la visualización de diferentes actividades celulares y patrones de localización molecular distintos. Aunque las imágenes *in vivo* de las dos formas principales de muerte celular, concretamente la apoptosis y la necrosis, usando radioligandos han aparecido en los últimos años (Saint-Hubert *et al.*, 2009), hasta ahora, la investigación de la progresión y la dinámica de las distintas fases de una enfermedad neurodegenerativa a nivel celular solo ha dependido de análisis histológicos o *in vitro* (Huerta *et al.*, 2007). Los métodos cualitativos para identificar apoptosis en la retina se conocen a partir del documento WO2009/077750. Sin embargo, no se describe ningún análisis cuantitativo.

30

La obtención de imágenes de las diferentes fases de la muerte de las células nerviosas *in vivo* podría mejorar significativamente la capacidad de comprender la enfermedad y su historia natural, con aplicaciones directas al paciente. Permitiría investigar el curso temporal de los eventos en relación con diferentes moduladores, y también proporcionar información sobre los patrones espaciales de la muerte celular en periodos de días, semanas o más. Además, dada la aparición de elementos comunes mecanicistas entre diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como EA y glaucoma (Guo *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2007), una apreciación de la dinámica espacio-temporal de la muerte celular en una enfermedad podría mejorar la comprensión de otras enfermedades, tanto en términos de la fisiopatología molecular como posibles vías terapéuticas. En particular, la posibilidad de bloquear la cascada apoptótica en fases tempranas para rescatar células lesionadas (Allen *et al.*, 1997) hace que la capacidad de diferenciar entre apoptosis y necrosis, así como entre diferentes etapas de apoptosis, sea particularmente deseable.

## RESUMEN DE LA INVENCION

40

El primer aspecto de la presente invención es un método para determinar una fase de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo el método generar una imagen *in vivo* de células apoptóticas en el ojo de un sujeto, habiéndose administrado al sujeto un marcador apoptótico marcado, y contar el número de células apoptóticas en la imagen, comprendiendo además el método comparar el número de células apoptóticas en la imagen con el número de células apoptóticas en una imagen del ojo del sujeto previamente obtenida.

45

El marcador apoptótico marcado puede haberse administrado de cualquier manera apropiada, particularmente a través de inyección intravenosa o por vía tópica.

50

Los inventores han encontrado sorprendentemente que pueden usarse varias células apoptóticas para proporcionar una indicación de la fase de la enfermedad. Los experimentos basados en el modelo animal han demostrado que la muerte celular es un proceso dinámico que está estrechamente correlacionado con las fases de la enfermedad. Por lo tanto, el número de células apoptóticas se puede utilizar para identificar el punto de tiempo en estas enfermedades.

55

Se prefiere particularmente poder controlar el avance de la enfermedad comparando células específicas en el tiempo. Por consiguiente, el método comprende la etapa de comparar la imagen con una imagen del ojo del sujeto previamente obtenida. El método comprende comparar el número de células apoptóticas y también puede comprender comparar células específicas en una imagen con las mismas células en una imagen anterior. En el último caso, las células pueden estar en apoptosis en una imagen pero no en la otra, lo que refleja la progresión de

la enfermedad o la eficacia del tratamiento administrado.

El cambio en el número de células apoptóticas puede proporcionar a un médico información sobre la progresión de la enfermedad. Un aumento en el número de células apoptóticas puede indicar la progresión de la enfermedad. Del mismo modo, a medida que la enfermedad alcanza sus últimas fases, puede observarse una disminución en el número de células apoptóticas. El médico experto es capaz de diferenciar las fases de acuerdo con el número de células vistas en una imagen o usando una comparación con una o más imágenes adicionales.

Cuando se comparan células específicas, es ventajoso poder superponer con precisión una imagen sobre otra. Se pueden superponer una, dos o tres o más imágenes adicionales.

La enfermedad es preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa ocular. La expresión "enfermedades neurodegenerativas oculares" es bien conocida por los expertos en la técnica y se refiere a enfermedades causadas por la pérdida gradual y progresiva de neuronas oculares. Incluyen, pero sin limitación, glaucoma y retinopatía diabética.

El término "marcador apoptótico" se refiere a un marcador que permite que las células que experimentan apoptosis se distingan de las células vivas. Adicionalmente, el marcador preferiblemente debería ser capaz de distinguir las células apoptóticas de las neuronales. Por ejemplo, puede ser un compuesto o molécula que se une específicamente a células apoptóticas, pero no a células vivas o células necróticas, o uno o más compuestos o moléculas que se unen específicamente a células vivas y células necróticas, pero no a células apoptóticas. Los marcadores apoptóticos incluyen, por ejemplo, la familia de proteínas anexina. Las anexinas son proteínas que se unen reversiblemente a las membranas celulares en presencia de cationes. Las anexinas útiles en la invención pueden ser naturales o pueden ser recombinantes. La proteína puede ser un fragmento completo o tal vez funcional, es decir, un fragmento o porción de una anexina que se une específicamente a las mismas moléculas que la proteína completa. Además, se pueden usar derivados funcionales de tales proteínas. Están disponibles una diversidad de anexinas, tales como las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0134001A. Una anexina preferida es la Anexina 5, que se conoce bien en la técnica. Otras anexinas que pueden usarse como marcadores apoptóticos incluyen las Anexinas 11, 2 y 6. Se conocen otros marcadores apoptóticos en la técnica incluyendo, por ejemplo, el dominio C2A de sinaptotagmina I, duramicina, análogos de isatin sulfonamida no peptídicos, tales como WC-II-89, y ApoSense, tales como NST-732, DDC y ML-10 (Saint-Hubert *et al.*, 2009).

Como alternativa, el marcador puede ser una molécula o compuesto liberado o expresado por una célula durante la apoptosis o durante la necrosis, pero no liberado o expresado por células vivas o una molécula o compuesto liberado o expresado por una célula viva pero no durante una o ambas de la apoptosis o la necrosis. También se pueden usar otras indicaciones de actividad celular para identificar células apoptóticas o necróticas. Por ejemplo, se pueden observar cambios en la función mitocondrial, pueden usarse especies de oxígeno reactivo (ROS) como marcadores, al igual que los iones de calcio.

El marcador apoptótico está marcado, preferiblemente con una etiqueta visible. En particular, la etiqueta es preferiblemente una etiqueta optimizada por longitud de onda. El término "etiqueta optimizada por longitud de onda" se refiere a una sustancia fluorescente, que es una sustancia que emite luz en respuesta a la excitación, y que ha sido seleccionada para su uso debido a una mayor relación señal-ruido y, por lo tanto, una mejor resolución de imagen y sensibilidad, mientras que al mismo tiempo cumple la norma de seguridad de exposición a la luz para evitar efectos fototóxicos. Las longitudes de onda optimizadas incluyen longitudes de onda de infrarrojo y de infrarrojo cercano. Dichos marcadores se conocen bien en la técnica e incluyen colorantes tales como IRDye700, IRDye800, D-776 y D-781. También se incluyen sustancias fluorescentes formadas conjugando dichos colorantes con otras moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Se prefiere que las longitudes de onda optimizadas causen poca o ninguna inflamación en la administración. Una etiqueta preferida optimizada por longitud de onda es D-776, ya que se ha encontrado que causa poca o ninguna inflamación en el ojo, mientras que otros colorantes pueden causar inflamación. Los colorantes optimizados también demuestran preferiblemente una estrecha correlación entre el nivel de fluorescencia que puede detectarse histológicamente y el que puede detectarse *in vivo*. Se prefiere particularmente que exista una correlación sustancial, especialmente una correlación 1:1 entre la fluorescencia histológica e *in vivo*.

El marcador apoptótico marcado puede prepararse usando técnicas estándar para conjugar una etiqueta optimizada por longitud de onda con un compuesto marcador. Dichas etiquetas pueden obtenerse de fuentes bien conocidas tales como Dyomics. Las técnicas apropiadas para conjugar la etiqueta con el marcador son conocidas en la técnica

y pueden proporcionarse por el fabricante de la etiqueta.

Para generar una imagen de células apoptóticas, el marcador etiquetado se administra al sujeto, por ejemplo, por inyección intravenosa o por administración tópica. El área del sujeto a someter a formación de imágenes, el ojo, se coloca dentro del campo de detección de un dispositivo de imágenes médico. A continuación, se toman imágenes de las longitudes de onda de emisión del marcador etiquetado y se construye una imagen para que se proporcione un mapa de las áreas de muerte celular. La generación de la imagen puede repetirse para permitir que la apoptosis se controle durante un periodo de tiempo. Puede controlarse en tiempo real. Se prefiere particularmente controlar la apoptosis de las células retinianas, especialmente las células nerviosas retinianas. Las células nerviosas retinianas incluyen células ganglionares de la retina (RGC), células bipolares, amacrinas, horizontales y fotorreceptoras.

Se puede adquirir una imagen "promediada" a partir de la imagen original usando un software desarrollado específicamente para imágenes de autofluorescencia (von Ruckmann *et al.*, 1995; Wade y Fitzke, 1998) y una desviación estándar de puntos en comparación con el fondo creado. Para eliminar el ruido de fondo, los puntos con un área por encima de un cierto umbral se cuentan como "células" y aquellos con un área debajo del umbral indican ruido. El número de células apoptóticas obtenidas se conoce como recuento DARC.

Se describe también un método para diagnosticar una enfermedad que genera una imagen de células apoptóticas en un ojo del sujeto, habiéndose administrado el marcador apoptótico marcado al sujeto, y también se describe el análisis del patrón de distribución de células apoptóticas.

El método también puede comprender administrar un marcador apoptótico marcado al sujeto, especialmente por vía intravenosa o tópica.

Preferiblemente, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa, especialmente una enfermedad neurodegenerativa ocular, especialmente glaucoma.

Es posible identificar la enfermedad mediante la distribución de células apoptóticas. En particular, al preparar un mapa de densidad que muestra la distribución de células apoptóticas, se puede demostrar la distribución de la muerte celular. A partir de ese mapa, es posible diferenciar entre diferentes enfermedades neurodegenerativas que tienen distintos patrones de actividad apoptótica.

Los términos "enfermedades neurodegenerativas oculares", "marcador apoptótico" y "etiqueta" son como se ha descrito anteriormente.

El método usado para generar la imagen retiniana de las células apoptóticas es como se ha descrito anteriormente. Una vez que se obtiene una imagen de células apoptóticas del ojo, se puede construir un mapa de densidad de estas células usando un software estándar. De nuevo, puede ser útil superponer un mapa con uno o más mapas generados en un momento anterior y el método puede incluir esta etapa o la etapa de comparar el mapa con uno o más mapas generados previamente.

El método puede estar relacionado con la distinción entre glaucoma y otras enfermedades.

Un método de estadificación de la enfermedad controlando la actividad o la muerte celular que comprende generar una imagen de la actividad celular o la muerte celular en el ojo de un sujeto, un primer marcador marcado y un segundo marcado que se ha administrado al sujeto, en el que el primer y el segundo marcadores son marcadores de diferentes fases de apoptosis, o de dos de la actividad celular, la apoptosis y la necrosis, y en el que las etiquetas son diferentes, y también se describe la evaluación de la fase de la enfermedad mediante el estudio de los marcadores de colocalización.

Un método para diferenciar entre diferentes fases de muerte celular que comprende generar una imagen de muerte celular en el ojo de un sujeto, un primer marcador de muerte celular marcado y un segundo marcador de muerte celular marcado, en el que el primer y segundo marcadores son marcadores de diferentes fases de apoptosis, o de apoptosis y necrosis, y en el que las etiquetas son diferentes, habiéndose administrado al sujeto, y también se describe la evaluación de la magnitud de las diferentes fases de muerte celular mediante el estudio de los marcadores de colocalización.

El método también puede comprender administrar un primer marcador de muerte celular marcado y un segundo marcador de muerte celular marcado al sujeto.

Los dos marcadores pueden ser marcadores de necrosis y apoptosis. Las etiquetas pueden ser etiquetas optimizadas por longitud de onda.

5 El método de acuerdo también se puede usar para cuantificar las diferentes fases de muerte celular.

El término "muerte celular" se refiere a cualquier proceso que incluye, por ejemplo, la muerte de una célula por apoptosis y necrosis.

10 Los términos "marcador apoptótico" y "etiqueta" son como se ha descrito anteriormente.

El término "marcador necrótico" se refiere a un marcador que permite que las células que experimentan necrosis se distingan de las células vivas y las que experimentan apoptosis. Por ejemplo, puede ser un compuesto o molécula que se une específicamente a células necróticas pero no a células vivas o células apoptóticas, o uno o más

15 compuestos o moléculas que se unen específicamente a células vivas y células apoptóticas pero no a células necróticas. Los marcadores necróticos incluyen, por ejemplo, yoduro de propidio (PI), un agente intercalante que se une a ácido nucleico con poca o ninguna preferencia de secuencia. Se conocen en la técnica otros marcadores necróticos que incluyen pirofosfato, antimiosina, glucarato, hipericina y sus derivados, tales como ácido hipericin monocarboxílico y ácido pamoico, tal como ácido bis-hidrazida-bis-DTPA pamoico. En particular, se han usado  
20 99mTc-pirofosfato, 111In-antimiosina, y 99mTc-glucarato.

El marcador necrótico marcado puede administrarse por vía local o sistémica de una manera similar al marcador apoptótico marcado mencionado anteriormente.

25 El método usado para generar la imagen retinal de células apoptóticas y células necróticas es como se ha descrito anteriormente. La colocalización de células apoptóticas y células necróticas puede estudiarse generando gráficos de dispersión y umbrales de color de co-localización utilizando el software ImageJ con el plugin de Análisis de Correlación de Intensidad. Cuando se construyen gráficos de dispersión de color y en bruto de la intensidad de fluorescencia del marcador apoptótico y necrótico, los datos pueden analizarse mediante la adopción de umbrales  
30 establecidos automáticamente por el plugin, permitiendo de este modo la separación de las diferentes fases de muerte celular en función de si son marcadores positivos apoptóticos, es decir, apoptosis temprana, marcadores apoptóticos y necróticos doblemente positivos, es decir, apoptosis tardía, y marcador necrótico positivo, es decir, necrosis. Los recuentos de intensidad de fluorescencia derivados de gráficos de dispersión en bruto se utilizan para cuantificar cada fase de la muerte celular. De nuevo, la colocalización de las células necróticas y apoptóticas se  
35 puede comparar con las de una fase anterior comparando la imagen con una imagen generada previamente, particularmente superponiendo las dos o más imágenes, como con los métodos descritos previamente.

Puede ser útil distinguir entre las fases de la apoptosis y entre la necrosis y la apoptosis con el fin de determinar la fase de la enfermedad, la fase de apoptosis y qué régimen de tratamiento se debe seguir.

40

Es particularmente útil poder estadificar o diagnosticar una enfermedad, ya que permite seleccionar un curso de tratamiento particular y, opcionalmente, que se monitorice. Por consiguiente, el método incluye opcionalmente administrar al sujeto un tratamiento para el glaucoma u otra enfermedad neurodegenerativa.

45 Los tratamientos para el glaucoma se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de tratamientos para el glaucoma se proporcionan en la descripción detallada. Otros tratamientos pueden ser apropiados y pueden seleccionarse por el médico experto sin dificultad.

En particular, cuando se identifica que la apoptosis se encuentra en la fase inicial, puede ser útil tratar con cualquier  
50 fármaco neuroprotector que module la muerte de las células nerviosas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se describirá ahora en detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras, en las que:

55

La Figura 1 muestra una imagen retiniana DARC original, una imagen promediada obtenida usando un software para imágenes de autofluorescencia y la desviación estándar resultante de los puntos.

La Figura 2 muestra la imagen retiniana DARC de la Figura 1 que diferencia entre "células" y ruido. Los puntos verdes con un umbral de área  $\geq 10$  indican "células"; los puntos rojos con áreas  $< 10$  indican ruido.

La Figura 3 muestra un escotoma arqueado inferior (imagen tomada de Clinical Methods The History, Physical and Laboratory Examinations, 3ª Ed.)

La Figura 4 muestra un mapa de densidad de color de una imagen retiniana de las Figuras 1 y 2.

La Figura 5 muestra la detección de células marcadas con fluorescencia usando la oftalmoscopia con láser de barrido confocal (cSLO). La detección simultánea de múltiples marcadores se logró personalizando la cSLO como se indica a continuación: para la identificación de la anexina 488, se empleó una longitud de onda de láser de argón de 488 nm, y un fotodetector de estado sólido con un filtro de corte de 521 nm y un filtro de corte de 550 nm; para Dil, se usó un láser verde cristalino bombeado por diodo con una longitud de onda de 532 nm con filtros de corte de 550 nm y de corte de 600 nm; se usó el mismo láser para la visualización de PI pero con un corte de 650 nm. El gráfico de la inserción muestra los espectros de emisión de fluorocromos marcadores celulares usados en el estudio. La anexina V marcada por Alexa Fluor 488 (verde; Anexina 488), Dil (azul, perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) y yoduro de propidio (rojo; PI) tienen máximos de excitación/emisión de 495/519, 550/570 y 532/649 nm, respectivamente. (a-d) Se adquirieron imágenes monocromas de cada área de la retina usando la configuración láser apropiada y se colorearon. Se produjeron imágenes tricolores combinando cada una de las imágenes en escala de grises del cSLO en los canales verde (a, anexina 488), azul (b, Dil) y rojo (c, PI) de una imagen en color RGB, y se fusionaron para formar la imagen mostrada en (d) (barra de escala 100  $\mu$ m).

La Figura 6 muestra el análisis de vídeo en intervalos de tiempo de los cambios en los marcadores celulares *in vivo*. (a-g) Las secuencias tomadas de la secuencia de vídeo (vídeo complementario 1) en un ojo de rata tratado con SSP con células ganglionares de la retina (RGC; Dil, azul) y anexina V intravítrea (verde) y yoduro de propidio (PI, rojo), revelan una distribución aleatoria y aparición de células teñidas con anexina V y PI, pero demuestran el claro aumento en la tinción de PI en el tiempo. (DI, azul; anexina V, verde; yoduro de propidio, rojo; puntos de tiempo y barra de escala de 100  $\mu$ m, como se indica). (f-g) Proyecciones de intensidad de fluorescencia promedio de la secuencia de vídeo usando el plugin ImageJ RGB Zproyector con anexina/PI (f) y los tres canales (g). (h) El análisis temporal de las intensidades promedio de anexina (verde) y PI (rojo) tomadas de cada histograma de secuencia de imágenes, demuestra que los perfiles de anexina y PI cambian significativamente con el tiempo con un marcado aumento en la tinción de PI tardía.

La Figura 7 muestra diferentes patrones y fases de muerte celular *in vivo*. (a-b) Muestra aleatoria (n = 30) de células individuales seleccionadas según si eran positivas para Dil (puntos blancos, células ganglionares retinianas marcadas de forma retrógrada con Dil, a) y teñidas con anexina V-488, IP o ambas durante un vídeo de lapso de tiempo (puntos de color azul claro, b). (c-p) Se identificaron tres patrones de etiquetado fluorescente: "PI solo" (puntos rojos, c, y la célula representativa con flecha en los fotogramas de vídeo e-g con el perfil de intensidad de señal correspondiente en h), "Anexina primero" (positivo a anexina V y posteriormente positivo a PI, puntos de color verde c, i-l), "Perfiles similares" (etiquetado positivo para ambos colorantes al mismo tiempo, puntos de color amarillo, c, m-p). Los tiempos medios con respecto a la intensidad máxima (d) revelaron que la apariencia de las células "PI solo" era significativamente más rápida que las células de "anexina primero" o "perfiles similares". Los perfiles de intensidad de anexina V y PI cambiaron significativamente con el tiempo (h, l, p). Estos resultados proporcionan evidencia de que las células neuronales *in vivo* muestran una heterogeneidad considerable con respecto a la cinética de muerte celular necrótica y apoptótica, y también el momento relativo de la exposición a fosfatidilserina (fase temprana) y condensación nuclear (fase tardía). Puntos de tiempo y barra de escala 100  $\mu$ m como se indica.

La Figura 8 muestra el análisis de las fases de muerte celular en un modelo de ratón de muerte de RGC inducida por Abeta. (a-b) Imágenes retinianas de gran angular que muestran el ojo derecho tratado con Abeta (a) y el ojo izquierdo tratado con Abeta + MK801 (b) de un solo ratón. MK801 reduce el número de células positivas a anexina V (verde) y PI (rojo) 72 horas después de la aplicación de Abeta intravítrea (25-35). Para evaluar la magnitud de la apoptosis tardía, los inventores estudiaron la colocalización de PI y anexina V utilizando el software ImageJ con el plugin de análisis de correlación de intensidad. (c-d) Los diagramas de dispersión muestran la distribución de la intensidad de fluorescencia de anexina y PI en los ojos mostrados en a y b, Abeta solo (c) y Abeta + MK801 (d). (e) Los umbrales se establecieron automáticamente por el plugin para cada análisis (superposición de color en C y D), y la cuantificación de cada fase de muerte celular se realizó a partir de los datos generados (e). El tratamiento con MK801 redujo los niveles globales de muerte celular (azul, Total), principalmente reduciendo el número de células en la apoptosis de fase tardía (amarillo, Anx+/PI+) y la necrosis (roja, PI+). (f-g) Imágenes retinianas de gran angular que muestran el ojo derecho tratado con Abeta (f) y el ojo izquierdo tratado con Abeta + PMA (g) de un solo ratón. (h-i) PMA aumentó el nivel de positividad de anexina V (verde) y PI (rojo) como se muestra en los gráficos de dispersión correspondientes. (j) La cuantificación de todos los animales tratados muestra

que PMA aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles globales de muerte celular (azul, total), la mayor parte de lo cual se debe a un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de células en la fase temprana de la apoptosis (verde, Anx+). (k) Comparación de las fases celulares en todos los modelos Abeta y SSP usando análisis de gráficos de dispersión de colocalización. En los puntos de tiempo previamente establecidos de máxima apoptosis (Abeta = 72 h y SSP = 2 h), ambos modelos muestran una tendencia similar sin diferencia significativa en la magnitud de cualquier fase de muerte celular. Sin embargo, ambos modelos muestran significativamente más RGC en las fases de apoptosis tardía ( $p > 0,05$ , amarillo, Anx+/PI+) y necrosis ( $p > 0,05$ , rojo, PI+) que la apoptosis temprana (verde, Anx+). Las barras de error tienen intervalos de confianza del 95 %, \*  $p < 0,05$ .

La Figura 9 muestra la historia natural de la muerte celular en el modelo de neurodegeneración hipertensiva ocular crónica (OHT). (a-f) Las células se marcaron retrógradamente usando Dil (A), y se analizaron a intervalos durante 8 semanas. La imagen de mayor aumento (caja verde en (a)) tomada en el tiempo cero (b) muestra la densidad normal de RGC, con pocos cambios a las 3 semanas (c). Sin embargo, hubo un marcado abandono de RGC 8 semanas después de la inducción quirúrgica de una IOP elevada (d). Cuando se analizaron los datos con respecto a la identificación de apoptosis en estas mismas células, era evidente que las RGC que eran positivas a anexina V a las 3 semanas (e) ya no eran identificables a las 8 semanas (f), confirmando que las células originalmente clasificadas como que experimentan apoptosis se habían degenerado cinco semanas después. (g) Solo se identificó una pequeña proporción de RGC en la apoptosis en fase temprana (anexina V solamente) en comparación con la apoptosis en fase tardía (tanto tinción con anexina V como con PI) a las 3 semanas. (h) El tratamiento con MK801 en animales en el momento de la cirugía redujo significativamente el número tanto de células apoptóticas como necróticas 3 semanas después del tratamiento. (i) El análisis cuantitativo de los datos de colocalización para PI y anexina V confirmó que se encontraban significativamente más células en la apoptosis de fase tardía ( $p > 0,05$ , amarillo, Anx+/PI+) que en la necrosis (rojo, PI+). El tratamiento con MK801 condujo a una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el número de células en proceso de muerte (Total), principalmente debido a una disminución significativa en los niveles de necrosis ( $p > 0,05$ , rojo, PI+) y muerte celular apoptótica tardía ( $p > 0,05$ , amarillo, Anx+/PI+). Barra de escala 100  $\mu\text{m}$  como se indica, las barras de error representan intervalos de confianza del 95 %, \*  $p < 0,05$ .

La Figura 10 muestra la muerte celular retiniana en el modelo Triple Transgénico de Alzheimer. (a-b) Imágenes retinianas de gran angular representativas de ratón transgénico triple de Alzheimer (3xTg-AD, a) de 14 meses adquirido 2 horas después de PI intravítrea (rojo) y anexina (verde), en comparación con (b), un ratón de control PS1KI de 18 meses. (c) Cuantificación de los datos del diagrama de dispersión de colocalización que muestran significativamente más RGC en la fase temprana de apoptosis ( $p < 0,05$ , verde, Anx+) y relativamente pocas células necróticas ( $p < 0,05$ , rojo, PI+) en 3xTg-AD en comparación con el control. (d-e) Imágenes retinianas de ojos de un animal 3xTg-AD de 14 meses (d) y un animal envejecido de control (e) adquiridas 2 horas después de la administración de PMA al mismo tiempo que anexina intravítrea (verde) y PI (rojo). (f-g) La cuantificación de los datos generados por el análisis de diagrama de dispersión de colocalización mostró que el tratamiento con PMA aumentó significativamente la apoptosis temprana ( $p < 0,05$ , verde, Anx+) y disminuyó la apoptosis tardía ( $p < 0,05$ , amarillo, Anx+/PI+) en modelo de 3xTg-AD (g). PMA también aumentó el nivel de apoptosis temprana en los animales envejecidos de control ( $p < 0,05$ , verde, Anx+), aunque no en la misma medida (30,3 % en el control envejecido en comparación con el 61,4 % en 3xTg-AD). \*  $p < 0,05$

La Figura 11 muestra que los cambios en la función mitocondrial pueden identificarse en las células de la retina.

Figura 11A. Imágenes de células vivas de cambios en la despolarización mitocondrial (Abramov AY et al. J Neurosci 24: 565-75, 2004). Los cambios en la señal de Rho123 se midieron en un cultivo de astrocitos corticales en respuesta a A $\beta$  25-35 (50 M) en presencia de glutamato 1 mM (A), succinato de metilo 10 mM (B), y glutamato 1 mM en una solución salina libre de Ca $^{2+}$  con la adición de EGTA 500 M (C). En presencia de glutamato o succinato de metilo, todavía se observan despolarizaciones mitocondriales transitorias reversibles rápidas, pero la despolarización mitocondrial lenta progresiva se suprimió casi por completo; en comparación con el trazo de control del mismo día que se muestra en A como una línea discontinua. En presencia de glutamato y la ausencia de Ca $^{2+}$  externo, se eliminó toda la respuesta. En D se muestran una serie de imágenes extraídas de una secuencia temporal que muestra cambios en el potencial mitocondrial en respuesta a A $\beta$  en presencia de succinato de metilo. Se ha de apreciar que la señal Rh123 en algunas células se vuelve transitoriamente muy brillante, pero luego se restaura y muestra un aumento adicional con FCCP en la imagen final. La imagen final con FCCP muestra la primera imagen adquirida inmediatamente después de la aplicación de FCCP, ya que la señal continuó siendo aún más brillante con una saturación de la pantalla en este rango. Se indica el tiempo de cada imagen en la secuencia (minutos). Se muestra un análisis del efecto del glutamato sobre diferentes componentes de la respuesta en E, y se muestran las

mediciones del aumento medio en la fluorescencia de Rh123 a los 30 min en respuesta a A en presencia de glutamato, succinato de metilo, y TMPD/ascorbato en F. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$

Figura 11B. Las primeras investigaciones muestran los efectos de la rotenona intravítrea sobre el potencial de membrana mitocondrial (MMP) en un ojo de ratón *in vivo*. La administración intravítrea de rotenona (20  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$ ) dio como resultado señales fluorescentes de Rho123 más fuertes en la retina (D), en comparación con el ojo de control (B) y el valor inicial (A, C). El análisis estadístico mostró que la rotenona indujo una despolarización significativa de la membrana mitocondrial en comparación con el control del vehículo (E).

Figura 11C. Usando el mismo análisis, se buscaron los efectos de A $\beta$ 25-35 en MMP *in vivo* en un ojo de ratón. Rho123 es una sonda fluorescente, utilizada para detectar los cambios en la densidad fluorescente mitocondrial. La administración de A $\beta$ 25-35 (como se muestra en C "estrella") mostró una fuerte señal fluorescente a nivel de RGCL (B). El análisis cuantitativo mostró que la administración de A $\beta$  dio como resultado una pérdida significativa del MMP en la retina con unos minutos de retraso, en comparación con el valor basal (A) (C,  $p < 0,01$ ). La línea de puntos en C representa la fluorescencia inicial antes de inyectar Rho123.

Figura 11D. Detección de cambios metabólicos retinianos inducidos por FCCP *in vivo* en un ojo de ratón. Puede visualizarse una administración intravítrea de FCCP (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona), un potente desacoplador de mitocondrias, provoca un aumento de la autofluorescencia en tiempo real *in vivo* en la retina de los ratones, sugiriendo cambios en la actividad metabólica de las células oculares tales como NADH y FAD.

La Figura 12 muestra que los cambios en la función ROS pueden identificarse en las células de la retina.

Figura 12A. Rotenona (A, B) y PMA (C, D) indujeron la producción de ROS *in vitro* (Wood-Kaczmar A et al, PLoS ONE 3:e2455, 2008) Rotenona, un inhibidor del complejo mitocondrial 1, causó un aumento significativo de la producción de ROS en células de control, y este aumento fue aún mayor en células knockdown PINK1 (kd) medidas por fluorescencia MitoSox (A, B). (PINK1 es un factor genético, que desempeña un papel neuroprotector en las mitocondrias de las neuronas de mamíferos contra el estrés oxidativo. Las células PINK1 kd parecen haber perdido el efecto protector). La aplicación de éster de forbol PMA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), un activador de la NADPH oxidasa, indujo un aumento en la generación de ROS a partir de cultivos de astrocitos medidos utilizando fluorescencia de luminiscencia de lucigenina (C, D). La respuesta de lucigenina se revirtió mediante la adición de superóxido dismutasa para eliminar el superóxido (A), lo que demuestra la especificidad de la respuesta, y se bloqueó por DPI (B).

Figura 12B. Los efectos de la rotenona en la producción de ROS en la retina del ratón *in vivo*. Producción de ROS visualizada con DHE (dihidroetidinio). DHE es un agente no fluorescente, que reacciona con ROS intracelularmente para producir un producto oxidativo fluorescente que puede detectarse. Rotenona (50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$ ) se inyectó por vía intravítrea en un ojo (C57) y se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina) en el ojo contralateral. A continuación, se inyectó DHE (1  $\mu\text{l}$ ) por vía intravítrea y se obtuvieron imágenes de ambos ojos para detectar la producción de ROS utilizando una máquina SLO. Mientras que no se pueden detectar señales en los niveles iniciales en ambos ojos (A, C), la administración de rotenona indujo señales fluorescentes más fuertes de la producción de ROS en la retina (D) en comparación con el vehículo de control (B), que fue significativamente diferente (E,  $p < 0,0001$ ).

Figura 12C. Los efectos de PMA en la producción de ROS en retina de ratón *in vivo*. Se inyectó PMA (50  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{l}$ ) por vía intravítrea en un ojo y solución salina (1  $\mu\text{l}$ ) en el ojo contralateral. Se inyectó simultáneamente DHE (1  $\mu\text{l}$ ) para detectar la producción de ROS. Similar a la rotenona, PMA dio como resultado niveles significativamente más altos de producción de ROS (D, E) que el vehículo de control (B, E), y no se observó ninguna señal en ningún ojo antes de la inyección de PMA (A, B).

Figura 12D. Los efectos de A $\beta$ 25-35 en la producción de ROS *in vivo*. Se inyectó por vía intravítrea DHE en los dos ojos de un ratón para detectar la producción de ROS. La administración de A $\beta$ 25-35 (5 nmol) en el ojo contralateral dio como resultado señales fuertes de fluorescencia de ROS en la capa de células ganglionares de la retina (RGCL, D), en comparación con el control (B) y el valor inicial (A y C). Cambios en la fluorescencia como se muestra en E con la cuantificación de los datos que permiten el análisis estadístico, que mostraron que A $\beta$  indujo un aumento significativo de la producción de ROS en la retina en comparación con el control (E,  $p < 0,0001$ ).

La Figura 13 muestra que los cambios en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> pueden identificarse en las células de la retina.

Figura 13A. Imágenes confocales de la respuesta de Ca<sup>2+</sup> a A $\beta$ 25-35 (Abramov AY et al. J Neurosci 23: 5088-95, 2003). En un cocultivo de hipocampo cargado con fluo-4, las imágenes confocales durante la exposición a A $\beta$  muestran que el cambio en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> puede originarse como un cambio focal que se difunde a través de la célula y puede restringirse al espacio subplasmalémico. Serie de tiempo de imágenes confocales tomadas durante una sola respuesta transitoria a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en un astrocito. Ha de apreciarse que la respuesta comienza con un aumento focal en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (punta de flecha) seguido de la propagación más

lenta a través de la célula. Esto se ilustra adicionalmente en *b*, que muestra un gráfico de la señal con el tiempo en cuatro ubicaciones diferentes en la celda (se indica con un código de color en la imagen insertada). La rápida tasa de aumento en el punto de afluencia contrasta con el aumento mucho más lento visto en lo profundo del citosol de la célula. *B*, Serie de imágenes tomadas de otro astrocito durante una respuesta a A $\beta$  25-35, mostrando de nuevo que la señal de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> puede estar restringida a la periferia de la célula y no se puede propagar a través de la célula. La primera imagen de la secuencia muestra los datos brutos, mientras que las imágenes posteriores muestran la relación de la secuencia de imágenes con respecto a la primera imagen de la secuencia.

Figura 13B. Los efectos de A $\beta$ 25-35 en señales de calcio *in vivo* en un ojo de ratón. La administración intravítrea de Fura rojo, un indicador de calcio fluorescente, produjo una señal de calcio débil en la retina (B) en comparación con el valor inicial (A). Diez minutos después de la aplicación de A $\beta$ 25-35 (5 nmol) (como se muestra D) sin embargo, se detectó una señal fluorescente más fuerte en la RGCL (C). El análisis cuantitativo reveló que A $\beta$  indujo un aumento significativo de las señales de calcio en la retina, en comparación con el pretratamiento (D,  $p < 0,001$ ).

Figura 13C. Se obtuvieron imágenes *in vivo* de ratones transgénicos de calcio con proteínas indicadoras de Ca<sup>2+</sup> fluorescentes codificadas genéticamente (FCIP). Transitorios de calcio inducidos por A $\beta$ 25-35 en un ojo de ratón transgénico de calcio. Comparado con el valor inicial (A), la administración intravítrea de A $\beta$ 25-35 indujo una señal de calcio fluorescente inmediata en la retina (B) y la señal pareció aumentar significativamente minutos más tarde (C). El análisis de la señal fluorescente después de la inyección de A $\beta$  en  $t = 0$ , se muestra gráficamente con la fluorescencia vista en las áreas identificadas por cuadros de colores en el recuadro (D, E).

La Figura 14 muestra que los cambios en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> pueden usarse como un marcador para controlar la respuesta al tratamiento.

Figura 14A. Efecto de la ciclosporina sobre la despolarización mitocondrial inducida por ionóforos y [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>. (Abramov AY et al. Cell Calcium 33: 101-12, 2003). Imagen de células vivas que muestra la medición simultánea de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> con Fura-2 y TMRM (un fluoróforo catiónico permeable a la membrana) en células HepG2 preincubados con lum CsA durante 30 min y durante los experimentos. (A) ionomicina 10  $\mu$ m (B) 4-BrA23187 50  $\mu$ m (un ionóforo neutro), (C) ferutinina 50  $\mu$ m (un ionóforo de origen natural electrogénico, que se cree que induce la apertura de MPTP)). CsA impidió completamente la despolarización mitocondrial inducida por ferritinina.

Figura 14B. Imágenes DARC *in vivo* de ojos de rata OHT 3 semanas después de una presión intraocular (IOP) elevada que muestra una apoptosis de RGC aumentada (puntos blancos) en Control (A) en comparación con ojos tratados con CoQ10 (B). (C) muestra el porcentaje de reducción en la apoptosis de RGC en el modelo de OHT de glaucoma experimental con tratamiento con CoQ10 tópico en comparación con el control (las flechas de color naranja indican tratamiento tópico los Días 0, 1, 7, 21 y 42). CoQ10 redujo significativamente la apoptosis de RGC a las 3 y 6 semanas.

Figura 14C. Secciones transversales histológicas de retina teñidas para Cicofilina D. Ojos de rata normales (A), OHT (B) y tratados con CoQ10 (C) que muestran un aumento de Cicofilina D (CyD, rojo, Vector rojo, azul, tinción nuclear de hematoxilina) en la retina tratada con CoQ10 en la capa de RGC 3 semanas después de la inducción de OHT, lo que sugiere que CoQ10 aumenta la CyD.

Figura 14D. Gráficos que muestran la puntuación promedio de clasificación histológica de retinas de ojos de rata de control, OHT y OHT tratados con CoQ10 a las 3 y 12 semanas después de una IOP elevada, lo que muestra un aumento significativo de CyD en ojos CoQ10 a las 3 pero no a las 12 semanas. Esto sugiere que existe una asociación en la reducción de la apoptosis de RGC observada en ojos CoQ10 y el nivel de apoptosis de RGC,

las Figuras 15 a a f muestran etapas de procesamiento de imágenes para el etiquetado celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 50 Modelos animales

Para estas investigaciones en ratas, los inventores usaron modelos establecidos de apoptosis neuronal retiniana (Cordeiro *et al.*, 2004). Todos los procedimientos cumplieron las regulaciones locales y nacionales y se realizaron bajo anestesia general. Se usaron ratas Dark Agouti (DA) adultas, 150-200 g, en todos los experimentos con ratas.

55

Para los estudios experimentales de glaucoma, los inventores usaron un modelo establecido de hipertensión ocular. 18 ratas fueron sometidas a cirugía para elevar la presión intraocular (IOP) mediante inyección de solución salina hipertónica (1,8 M) en dos venas episclerales como se ha descrito anteriormente (Cordeiro *et al.*, 2004). Los ojos contralaterales y no operados actuaron como controles. Se obtuvieron imágenes de los animales a las 0, 3, 8 y 16

semanas, sacrificando al menos 3 animales en cada punto de tiempo para su histología inmediatamente después de la obtención de imágenes. Un subgrupo de animales ( $n = 4$ ) se trató en el momento de la cirugía con el antagonista de NMDA MK801 (0,6 nmol; Tocris Cookson Ltd, Bristol, Reino Unido). Se obtuvieron imágenes de estos animales a las 3 semanas y luego se sacrificaron para la histología.

5

Para el análisis de la apoptosis de RGC inducida por estaurosporina, 14 ratas DA recibieron 0,5  $\mu\text{g}$  de estaurosporina intravítrea (SSP) en 5  $\mu\text{l}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS); ambos de Sigma Aldrich Reino Unido, para inducir la apoptosis de RGC como se ha descrito previamente (Cordeiro *et al.*, 2004). Se obtuvieron imágenes de los animales de inmediato durante hasta 6 horas, después de lo cual se sacrificaron para

10

realizar la histología.

Para el análisis de A $\beta$ , se inyectó por vía intravenosa A $\beta$ <sub>25-35</sub> recién preparada (Sigma - Aldrich, 3,40 nmol) (Dahlgren *et al.*, 2002) en ratones C57 ( $n = 10$ ) (Maass *et al.*, 2007). Se obtuvieron imágenes de los animales a las 72 horas. Para los estudios de EA 3xTg-AD, se evaluaron 4 ojos (todos mujeres, 14 meses) con 2 ojos de ratones de control envejecidos (PS1KI; hembras, 18 meses). Se obtuvieron ratones 3xTg-AD y control PS1KI de una colonia (mantenida en CeSI) establecida después de un generoso regalo de Frank Laferla. Se administró acetato de miristato de forbol intravítrea (1  $\mu\text{l}$  de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a los ojos izquierdos de animales 3xTg-AD, al mismo tiempo que la anexina V y PI.

15

#### 20 *Etiquetado fluorescente in vivo*

Para identificar RGC, las retinas se marcaron retrógradamente usando diferentes agentes en estudios piloto mediante su aplicación a ambos colículos superiores, como se ha descrito previamente (Cordeiro *et al.*, 2004). Los estudios piloto identificaron a Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina, solución al 10

25

%; Molecular Probes, Cambridge Biosciences, Reino Unido) como mejor que DiAsp (yoduro de 4-(4-(didecilamino)estiril)-N-metilpiridinio (4-Di-10-Asp), Fluorogold o Rodamina B. Dil se aplicó 10 días antes de todos los procedimientos de tratamiento con ratas detallados anteriormente. Dil es un rastreador neuronal lipófilo de dialquilcarbocianina de cadena larga, que no afecta a la viabilidad celular, el desarrollo o las propiedades fisiológicas celulares básicas (Honig y Hume, 1989).

30

Utilizando un método descrito recientemente por los inventores, a las ratas se les dieron 2,5  $\mu\text{g}$  de anexina V marcada con Alexa Fluor 488 intravítrea en 5  $\mu\text{l}$  de PBS para identificación de la apoptosis de RGC, 2 horas antes de la formación de imágenes *in vivo* (Cordeiro *et al.*, 2004). Para los ratones, los inventores usaron 1  $\mu\text{l}$  de una solución de 0,25 mg/ml de anexina marcada con IR (anexina-IR) en inyecciones intravítreas como se ha descrito

35

previamente (Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2008).

Para identificar RGC necróticas en ratas (2  $\mu\text{l}$ ) y ratones (1  $\mu\text{l}$ ), se administró yoduro de propidio (PI; 0,4 mg/ml, solución al 1 %, Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) por vía intravítrea al mismo tiempo que la anexina, 2 horas antes de la obtención de imágenes *in vivo*. PI se intercala en ácidos nucleicos, se une al ADN bicatenario, pero solo

40

cruza la membrana plasmática de células no viables. Por lo tanto, las células que han perdido la integridad de la membrana se identifican mediante tinción con PI de color rojo fluorescente a través de los núcleos.

#### *Obtención de imágenes*

Se obtuvieron imágenes retinianas *in vivo* de todas las ratas a intervalos regulares y establecidos después del tratamiento experimental, usando un prototipo de oftalmoscopio láser de barrido confocal Zeiss (cSLO), como se ha descrito previamente (Cordeiro *et al.*, 2004; Maass *et al.*, 2007). La obtención de imágenes se realizó bajo anestesia general con animales que se mantuvieron en un marco estereotáxico, con las pupilas dilatadas. Se usaron láseres y filtros diferentes para los diferentes fluorocromos: para la excitación de Alexa Fluor 488 se empleó una longitud de onda de láser de argón de 488 nm, y un fotodetector de estado sólido con un filtro de corte de 521 nm y un filtro de

50

corte de 550 nm; para Dil, se usó un láser verde cristalino bombeado por diodo con una longitud de onda de 532 nm con filtros de corte de 550 nm y de corte de 600 nm; se usó el mismo láser para la visualización de PI pero con un corte de 650 nm. El cSLO utilizado en este estudio es el mismo que se ha descrito previamente y con modificaciones que cumplen los estándares establecidos para la seguridad y la exposición a la luz (Cordeiro *et al.*, 2004; Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2008). Los inventores han desarrollado un software escrito especialmente para permitir el procesamiento óptimo de señales fluorescentes de baja luz, lo que ha ayudado enormemente a obtener estas imágenes de células vivas (Cordeiro *et al.*, 2004). Se adquirieron imágenes monocromas de cada área usando la configuración láser apropiada y se colorearon. Se produjeron imágenes en tres colores combinando cada una de las imágenes en escala de grises del cSLO con los canales rojo (PI), verde (anexina 488) y azul (Dil) de una imagen en

55

color RGB. Las imágenes se procesaron de esta manera porque el color rojo, verde y azul (RGB) es universalmente aceptado como el método más informativo para mostrar la colocación. Se aplicó el plugin de análisis de correlación de intensidad de ImageJ para generar gráficos de dispersión de colocación y umbrales de color (Li *et al.*, 2004). Se construyeron gráficos de dispersión en color y en bruto de anexina y de intensidad de fluorescencia PI, por lo que los datos pudieron analizarse de manera similar a los datos obtenidos mediante análisis FACS *in vitro*. La separación de las diferentes fases de muerte celular según si eran como positivas a anexina V (apoptosis temprana), doblemente positivas a anexina V y PI (apoptosis tardía) y positivas a PI (necrosis) se habilitó mediante la adopción de umbrales establecidos automáticamente por el plugin para cada análisis. Los recuentos de intensidad de fluorescencia derivados de gráficos de dispersión en bruto se usaron para cuantificar cada fase de la muerte celular.

En ratones, los inventores usaron instrumentación como se ha descrito previamente (Maass *et al.*, 2007; Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2008), con un cSLO modificado (Heidelberg Retina Angiograph 2, Heidelberg Engineering, Dossenheim, Alemania) y una lente de campo amplio (55°). Se usaron los ajustes de angiograma de fluoresceína (láser de argón de 488 nm) y verde de indocianina (láser de diodo IR 790 nm) para detectar PI y anexina marcada con IR, respectivamente. Se usó el mismo software para analizar imágenes secuenciadas de vídeo como se ha descrito anteriormente con imágenes monocromas retinianas completas de cada ojo grabadas y coloreadas. Las imágenes de doble color se produjeron al combinar cada una de las imágenes en escala de grises del cSLO con el rojo (PI) y verde (anexina IR) de una imagen en color RGB.

## 20 Análisis

Se usó el software ImageJ con plugins específicos para crear gráficos de superficie en 3D, proyecciones RGB y analizar la colocación (JaCoP y el Análisis de Correlación de Intensidad). Los datos gráficos de los valores medios se concibieron con intervalos de confianza del 95 %, y las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante ANOVA o prueba t de Student para ojos emparejados, con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

### Ejemplos

#### El recuento DARC

La imagen retiniana DARC, una imagen "promediada", se adquiere a partir de la imagen original usando un software desarrollado específicamente para imágenes de autofluorescencia (von Ruckmann *et al.*, 1995; Wade y Fitzke, 1998) y se crea una desviación estándar de puntos en comparación con el fondo (Figura 1). Para eliminar el ruido de fondo, los puntos con un área por encima de un cierto umbral, por ejemplo, 10, se cuentan como "células" y aquellos con un área debajo del umbral indican ruido. El número de células apoptóticas obtenidas se conoce como recuento DARC. En la Figura 2, hay 633 puntos en total y 319 se identifican como células. Por consiguiente, el recuento DARC para esta imagen es de 319.

#### El patrón DARC de distribución

Un escotoma es un área de visión deficiente rodeada por todos lados por una visión relativamente mejor. Las fibras arqueadas rodean el fascículo papilomacular, que se origina arriba, abajo y temporal a éste. Las lesiones del fascículo arqueado producen escotomas arqueados o cuneiformes y estos son característicos del glaucoma (Figura 3).

De manera similar, la distribución de células apoptóticas a lo largo del fascículo papilomacular permitirá la diferenciación entre diferentes enfermedades neurodegenerativas del ojo. Por ejemplo, el glaucoma tendrá un patrón focal (típicamente arqueado) de muerte del nervio retiniano después del fascículo papilomacular, mientras que en enfermedades, tal como la neurodegeneración diabética, será difuso.

La Figura 4 muestra un mapa de densidad de color de la misma imagen mostrada en las Figuras 1 y 2.

#### La personalización de los equipos de obtención de imágenes permite la detección de etiquetado de triple fluorescencia

Para detectar simultáneamente tres fluorocromos diferentes, se personalizó un prototipo de oftalmoscopio de barrido láser confocal Zeiss (cSLO, Cordeiro *et al.*, 2004) para permitir la detección de diferentes longitudes de onda de emisión. Los parámetros utilizados se basaron en marcadores de células marcadas por fluorescencia bien establecidos seleccionados para tener propiedades espectrales distintas y una superposición mínima, y la recogida

de luz emitida se optimizó con los filtros apropiados (Figura 5). Diversos marcadores de muerte celular que pueden diferenciar la apoptosis y la necrosis se conocen bien por los expertos en la técnica. La obtención de imágenes *in vivo* de la apoptosis se basa en el direccionamiento de moléculas marcadoras, tales como las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9), las caspasas efectoras (caspasa 3 y 7), la fosfatidilserina (PS), que está expuesta en el exterior de la membrana celular de las células apoptóticas como una señal para la fagocitosis, y la fosfatidiletanolamina (PE), que está presente en la superficie de las células apoptóticas y desempeña un papel regulador. Los marcadores apoptóticos incluyen, pero sin limitación, anexina V, dominio C2A de sinaptotagmina I, duramicina, análogos de isatin sulfonamida no basados en péptidos, tal como WC-II-89, y ApoSense, tal como NST-732, DDC y ML-10. Por el contrario, la obtención de imágenes de necrosis *in vivo* aprovecha la pérdida de la integridad de la membrana celular permitiendo el intercambio de macromoléculas entre el entorno intracelular y extracelular, lo que no es posible en células viables. Los marcadores necróticos incluyen, pero sin limitación, yoduro de propidio (PI), pirofosfato, antimiosina, glucarato, hipericina y sus derivados, tales como ácido hipericina monocarboxílico y ácido pamoico, tales como ácido bis-hidrazida-bis-DTPA pamoico. En el presente estudio, para la identificación de células apoptóticas, los investigadores usaron anexina V marcada con Alexa Fluor 488 que tiene un máximo de excitación/emisión de 495/519 nm, con un láser de argón y un fotodetector de estado sólido con un filtro de corte de 521 nm y un filtro de corte de 550 nm (Cordeiro *et al.*, 2004); para identificar las RGC apoptóticas necróticas y tardías los inventores usaron PI, con máximos de excitación y emisión de 532 nm y 649 nm, respectivamente, con detección usando un láser verde cristalino bombeado por diodo con una longitud de onda de 532 nm, y un filtro de corte de 650 nm en el fotodetector. Después de la evaluación empírica de varios compuestos diferentes, incluyendo DiAsp (yoduro de 4-(4-(didecilamino)estiril)-N-metilpiridinio (4-Di-10-Asp), Fluorogold y Rodamina B, los investigadores determinaron que Dil era el marcador de RGC más adecuado en estos modelos de rata, con máximas de excitación y emisión de 550 nm y 570 nm, respectivamente. El mismo láser utilizado para PI se utilizó para la visualización de Dil pero con filtros de corte de 550 nm y 600 nm de corte.

Este sistema permitió la formación de imágenes de longitudes de onda múltiples con alta resolución y sensibilidad, y una transferencia mínima (Figura 5). Los filtros fueron elegidos específicamente para los fluorocromos utilizados, pero en principio se pudo estudiar un número diverso de marcadores fluorescentes utilizados en una amplia gama de protocolos establecidos de biología celular con la modificación adecuada del sistema cSLO, destacando el uso de la retina como modelo para estudiar procesos celulares *in vivo*.

La obtención de imágenes *in vivo* permite el seguimiento longitudinal de los cambios en los marcadores celulares en el tiempo

Después de definir los parámetros funcionales de la tecnología, los investigadores investigaron a continuación su aplicación *in vivo* usando modelos animales de neurodegeneración. La estaurosporina (SSP), un conocido inhibidor no selectivo de la proteína cinasa, se usa rutinariamente como un potente inductor de la apoptosis neuronal en ensayos *in vitro* (Belmokhtar *et al.*, 2001). Los investigadores han establecido previamente que SSP puede emplearse convenientemente *in vivo* para inducir una onda rápida y bastante sincrónica de apoptosis de RGC que se detecta fácilmente usando anexina V (Cordeiro *et al.*, 2004; Maass *et al.*, 2007). Por lo tanto, los investigadores primero estudiaron los efectos de SSP en ratas en las que las RGC se habían marcado retrógradamente con Dil, seguido de la administración intravítrea de SSP, anexina V-488 y PI.

En este modelo, las secuencias de vídeo de lapso de tiempo (Figura 6a-e y Vídeos complementarios 1-2) de áreas retinianas únicas durante 5 horas revelaron una distribución aleatoria y la aparición de células apoptóticas y necróticas, destacadas particularmente por el gráfico de superficie tridimensional (Vídeo complementario 2), y las proyecciones de intensidad promedio de la secuencia de lapso de tiempo mostrada en la Figura 6f-g (generada por el plugin ImageJ RGB Zprojector). El análisis gráfico de los histogramas de secuencia de imágenes demostró que los perfiles de intensidad promedio de anexina V y PI cambiaron significativamente en el tiempo (ejemplos mostrados en la Figura 6h).

Estos resultados demuestran la prueba del principio de que esta técnica permite el seguimiento de cambios en células retinianas individuales en el mismo ojo en el tiempo, con la capacidad de analizar temporal y cuantitativamente los cambios en la intensidad de fluorescencia. Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración de imágenes de múltiples longitudes de onda de alta resolución utilizadas para visualizar la muerte de neuronas individuales *in vivo*.

Identificación de patrones de marcadores de muerte de células individuales rastreadas en el tiempo *in vivo* (ejemplo comparativo)

Los investigadores evaluaron a continuación si el multietiquetado de las células *in vivo* permitió la resolución de diferentes patrones de muerte celular apoptótica y necrótica. Debido a la rápida cinética y al modo de muerte celular predominantemente apoptótico inducido por SSP, los investigadores investigaron de nuevo el triple etiquetado simultáneo en ratas. Aunque la cinética precisa del inicio de la positividad a la anexina V y el desarrollo de la tinción de PI variaba de una célula a otra, el rastreo de células individuales permitió delinear la historia natural de los patrones de fluorescencia.

En este modelo de SSP (Cordeiro *et al.*, 2004) se identificaron células individuales de fotogramas, y se seleccionó una muestra aleatoria (n = 30) según si eran positivas para Dil (es decir, puntos blancos que identificaban RGC individuales, Figura 7a) y se tñieron con anexina V-488, PI, o ambos. El análisis de vídeo de las células individuales rastreadas seleccionadas que cumplen estos criterios (etiquetadas artificialmente como puntos de color azul claro en la Figura 7b) usando el software ImageJ y el plugin Time Series Analyzer permitió construir perfiles de intensidad de anexina V y PI. A partir de estos perfiles, se descubrió que típicamente se observaron tres patrones de etiquetado fluorescente, como se ilustra en la Figura 7c, que es un mapa de colores que muestra la distribución de las células y los patrones de tinción. En primer lugar, se encontró que algunas células estaban marcadas solo con PI ("PI solo", puntos rojos, Figura 7c); otras fueron inicialmente positivas para anexina V y posteriormente se volvieron positivas para PI ("Anexina primero", puntos verdes, Figura 7c), mientras que otras se volvieron positivas para ambos tintes aproximadamente al mismo tiempo ("Perfiles similares", puntos amarillos, Figura 7c). Los patrones de etiquetado fluorescente parecen estar distribuidos aleatoriamente.

El seguimiento de la tinción con anexina V-488 y PI en células individuales se muestra claramente en los fotogramas de vídeo ampliados que ilustran células representativas que muestran los patrones específicos de etiquetado fluorescente (señalados con flechas en la Figura 7, por ejemplo, "PI solo"; i-k "Anexina primero"; y m-o "Perfiles similares") con gráficos correspondientes de la intensidad de la señal en el tiempo (Figura 7h, l, p). En cada caso ilustrativo, los perfiles de intensidad de anexina V y PI cambiaron significativamente en el tiempo. Los tiempos medios con respecto a la intensidad máxima de esta muestra aleatoria (Figura 7d) revelaron que las células "PI solo" tendían a aparecer con una cinética significativamente más corta que las células "Anexina primero" o "Perfiles similares". Además, las células que se convirtieron en positivas para anexina V, invariablemente también se volvieron positivas para PI, ya sea en una hora o por coincidencia.

Estos resultados proporcionan evidencia de que las células neuronales *in vivo* muestran una heterogeneidad considerable con respecto a la cinética de la tinción del marcador de muerte de células necróticas y apoptóticas, y por inferencia también el tiempo relativo de exposición a fosfatidilserina (apoptosis en fase temprana) y condensación nuclear (apoptosis en fase tardía).

#### Evaluación de las fases de muerte celular *in vivo* (ejemplo comparativo)

El análisis de FACS *in vitro* permite que las células se clasifiquen como en apoptosis temprana (positivas para anexina V solo), necrosis (PI solo) o apoptosis en fase tardía (positivas tanto para anexina V como para PI). Para cuantificar la magnitud de la apoptosis de fase tardía *in vivo*, los investigadores estudiaron los niveles individuales de anexina V, PI y su colocalización utilizando el modelo Abeta de muerte de RGC recientemente desarrollado (Guo *et al.*, 2007). Las ventajas de esta metodología están bien establecidas en el campo de la biología celular y proporcionan una instantánea del estado de la muerte de RGC en cualquier momento. Los investigadores también evaluaron los efectos del tratamiento con el bloqueador de canales de NMDA MK801, con los mismos métodos analíticos.

Usando el modelo Abeta, los investigadores evaluaron los efectos de la Abeta intravítrea ( $A\beta_{25-35}$ ) de la cual los investigadores han demostrado recientemente que induce la apoptosis de RGC en ojos de roedores (Guo *et al.*, 2007). La muerte significativa de RGC ocurrió 72 horas después de la administración intravítrea de 3,40 nmol de  $A\beta_{25-35}$  en el ojo derecho, un tiempo que según el trabajo previo los investigadores había demostrado producir niveles pico de apoptosis (Figura 8). El ojo izquierdo de cada animal se trató con MK801 intravítreo 0,40 nmol al mismo tiempo que Abeta. Las imágenes retinianas de ángulo amplio se registraron 2 horas después de la anexina intravítrea (verde) y PI (rojo), tal como se ha descrito previamente (Guo *et al.*, 2006). Una imagen típica de un ojo derecho tratado con  $A\beta_{25-35}$  (Figura 8a) en comparación con el ojo izquierdo tratado con MK801 del mismo ratón (Figura 8b), demuestra que el tratamiento con MK801 reduce la cantidad de células positivas para anexina V (verde) y PI (rojo).

Para evaluar los niveles relativos de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, los investigadores estudiaron la colocalización de PI y anexina V utilizando el software ImageJ con el plugin de análisis de correlación de

intensidad (Li *et al.*, 2004). Se construyeron gráficos de dispersión en bruto y en color de intensidad de fluorescencia de anexina y PI a partir de datos generados por plugin para cada animal. Los gráficos de dispersión correspondientes (azul) de los ojos mostrados en la Figura 8a-b se ilustran en la Figura 8c-d. Los datos se analizaron de manera similar a los datos obtenidos mediante análisis FACS *in vitro*, con cuatro cuadrantes (líneas medias sombreadas en superposición de color como rojo, verde, azul y amarillo) que permiten la separación de las diferentes fases de la muerte celular como positivo para anexina V (apoptosis temprana, verde), doble positivo para anexina V y PI (apoptosis tardía, amarillo) y positivo para PI (necrosis, rojo). Los umbrales se ajustaron automáticamente por el plugin para cada análisis de cada ojo. Después, los investigadores usaron los recuentos de intensidad de fluorescencia de los gráficos de dispersión en bruto para cuantificar cada fase de la muerte celular. El tratamiento con MK801 redujo claramente los niveles globales de muerte celular (Total), pero más particularmente el número de células en la apoptosis tardía y la necrosis (Figura 8e). Curiosamente, hubo un pequeño aumento en el número de células apoptóticas de fase temprana (Anx+) en los ojos tratados con MK801 (Figura 8e). Dado que están destinadas a convertirse en Anx+/PI+, esto sugiere que aunque los resultados generalmente respaldan el papel neuroprotector de los antagonistas de NMDA en la muerte celular inducida por Abeta (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002), es posible que los efectos protectores de MK801 parezcan transitorios debido a su única aplicación en estos experimentos.

Para evaluar adicionalmente el poder analítico de la técnica, a continuación se investigó si el nivel de estrés oxidativo en los ojos tratados con Abeta influía en la fase de muerte celular y si esto era posible de visualizar *in vivo*. Las imágenes de células vivas de cultivos gliales/neuronales han sugerido que Abeta aumenta el estrés oxidativo neuronal al activar la NADPH oxidasa en la microglía, un efecto que es potenciado por el acetato de miristato de forbol (PMA) (Abramov *et al.*, 2005). La Figura 8f-g se toma del ojo derecho no tratado (F) y el ojo tratado con PMA (G) izquierdo de un animal tratado 72 horas antes con 3,40 nmol de A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Se administró PMA (0,016 nmol) o vehículo al mismo tiempo que anexina V intravítrea y PI, y se obtuvieron imágenes 2 horas después. PMA aumentó el número de células positivas para anexina V (verde) (Figura 8f, g), que se confirmó mediante los gráficos de dispersión de colocalización (Figura 8h, i). La cuantificación de la fluorescencia en todos los animales reveló que PMA aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles globales de muerte celular en el modelo Abeta, pero en particular, el número de células que experimentan apoptosis en fase temprana (Figura 8j). Estos resultados respaldan la hipótesis de que PMA potencia el daño de ROS inducido por Abeta a través de rutas predominantemente apoptóticas (Abramov *et al.*, 2005).

Usando la misma metodología, los investigadores compararon a continuación los niveles relativos de fases de muerte celular entre los modelos agudos de SSP y Abeta de muerte de RGC, en los puntos temporales en los que los investigadores demostraron previamente que se producía la positividad máxima de anexina V de RGC, es decir, a las 2 y 72 horas respectivamente (Cordeiro *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007). Las imágenes se volvieron a analizar para todos los animales tratados usando gráficos de dispersión de colocalización y la misma metodología que se ha descrito anteriormente. La Figura 8k ilustra que tanto los modelos SSP como los modelos Abeta presentan patrones similares de muerte celular en el momento de la apoptosis máxima. Los perfiles de muerte celular en ambos modelos mostraron significativamente más células en la fase tardía de la apoptosis ( $p < 0,05$ ) en comparación con la necrosis o la apoptosis temprana.

#### La historia natural de la muerte celular en modelos crónicos relacionados con el glaucoma

Una vez demostrada la aplicación de esta técnica en dos modelos agudos de muerte de RGC, los investigadores investigaron a continuación modelos de neurodegeneración retiniana crónica, que se asemejan más a la enfermedad humana. El grupo ha caracterizado previamente, usando el perfil *in vivo* e histológico de la apoptosis de RGC, un modelo experimental de rata de glaucoma de presión intraocular crónicamente elevada (OHT) (Cordeiro *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006). Las RGC se marcaron retrógradamente usando métodos descritos previamente con Dil (Cordeiro *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007) y se obtuvieron imágenes de animales repetidamente después de la administración de la anexina V intravítrea en diferentes momentos para generar secuencias de vídeo de lapso de tiempo (Figura 9 a-f y Vídeo complementario 3). La evaluación de RGC marcadas intactas en el modelo de glaucoma (identificado por Dil, azul, Figura 9a) reveló cambios drásticos en RGC individuales. Como se esperaba, al compararse con el número de células identificadas al inicio (Figura 9b) y a las 3 semanas (Figura 9c), el número de RGC marcadas evidentes a las 8 semanas se redujo marcadamente (Figura 9d) después de la inducción quirúrgica de presión intraocular elevada (IOP). El análisis de la inducción de la apoptosis en estas retinas reveló que aquellas RGC que eran positivas para anexina V a las 3 semanas (Figura 9e) habían desaparecido a las 8 semanas (Figura 9f), lo que sugiere que una onda de apoptosis sigue al evento de elevación de la IOP inicial, lo que va seguido de la depuración de las células muertas.

A continuación, se analizó la secuencia temporal de los cambios de anexina V y Dil durante este periodo. Utilizando un método similar al descrito anteriormente para la Figura 6, los investigadores construyeron una proyección tridimensional de intensidad máxima de las secuencias de vídeo de lapso de tiempo (vídeo complementario 3), usando Image J RGB Zprojector y el plugin JaCoP. La proyección permitió la evaluación cuantitativa de la máxima tinción con anexina V y Dil en cada píxel en la misma área retiniana estudiada en el tiempo. Aunque hubo una alta relación de superposición de tinción de anexina V con Dil (0,63, lo que confirma la presencia de apoptosis a nivel de las RGC), hubo una relación muy baja (0,072) de células Dil también positivas para la anexina V. Esto demuestra que solo algunas RGC fueron alguna vez positivas para anexina V y que la apoptosis no es la única ruta responsable de la muerte celular en este modelo, o que la positividad para la anexina V es transitoria (como se muestra en la Figura 7).

Los investigadores luego investigaron la presencia de células apoptóticas y necróticas usando PI y anexina V. A las 3 semanas en el modelo de OHT solo se identificó una pequeña proporción de RGC en la apoptosis temprana en comparación con la apoptosis tardía, como se ve en una imagen típica en Figura 9g. La cuantificación de las fases de muerte celular se realizó usando gráficos de dispersión de colocalización descritos previamente. Hubo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en las células en la apoptosis de fase tardía en comparación con la necrosis o la apoptosis en fase temprana (Figura 91l). De hecho, la mayoría de las células marcadas estaban en la apoptosis de fase tardía (Anx+/PI+), presentando relativamente pocas células los marcadores de diagnóstico de la necrosis (PI+) o la apoptosis en fase temprana (Anx+). Esta distribución de las células en proceso de muerte es muy similar a la observada tanto en los modelos SSP como en los modelos Abeta (Figura 8k) en el momento del pico de apoptosis.

Los investigadores evaluaron a continuación si el tratamiento neuroprotector alteró el número relativo de células en cada una de las fases de muerte celular, usando el antagonista de NMDA MK801, que los investigadores han demostrado previamente que es eficaz en este modelo (Guo *et al.*, 2006). El tratamiento con MK801 en el momento de la elevación de la IOP redujo significativamente el número de células positivas tanto para anexina V como para PI (Figura 9h). El análisis de diagrama de dispersión de colocalización mostró una reducción significativa de los marcadores de muerte celular totales ( $p < 0,05$ ) y específicamente una reducción significativa tanto en la apoptosis de fase tardía como en la necrosis, en comparación con los ojos OHT no tratados 3 semanas después de la inducción de IOP elevada.

30

#### Evaluación de las fases de la muerte celular en el modelo transgénico triple de Alzheimer

Cada vez hay más evidencia de la participación de la retina en la EA, usando la demostración técnicas histológicas de que la apoptosis de RGC se produce en modelos de EA transgénicos dobles (Ning *et al.*, 2008; Shimazawa *et al.*, 2008). Para determinar si la sincronización de la muerte de RGC se pudo evaluar *in vivo* en otro modelo de neurodegeneración crónica, los investigadores aplicaron luego esta técnica a un modelo de EA transgénico triple (3xTg-AD). Este es un modelo de EA cada vez más utilizado, que sobreexpresa APPSwe y tauP301L, además de portar una mutación PS1M146V knock-in, y actualmente es el único modelo transgénico existente con neuropatología tanto de Abeta como de tau (Sensi *et al.*, 2008). Se produce una acumulación temprana de Abeta intraneuronal, que disminuye a medida que se depositan las placas extracelulares, similar al desarrollo de la enfermedad y en los cerebros de los pacientes con síndrome de Down (LaFerla *et al.*, 2007).

Estudios de transgénicos previos (Ning *et al.*, 2008; Shimazawa *et al.*, 2008) han demostrado que en la línea de ratón de EA APP/PS1 doble, el nivel de apoptosis de RGC aumentaba con la edad, siendo más preponderante a los 27 que a los 7,8 meses. Sin embargo, en estos estudios, los congéneres de tipo salvaje envejecidos (27 meses) no se evaluaron. La Figura 10a muestra la apariencia típica del ojo de una imagen de 3xTg-AD de 14 meses a las 2 horas después de PI intravítreo y anexina-IR junto con imágenes del ojo de forma similar de un control de 18 meses (ratón transgénico PS1KI que no muestra neuropatología Abeta y tau (Oddo *et al.*, 2003)) (Figura 10b). Para cuantificar los niveles de las diferentes fases de muerte celular, los investigadores utilizaron de nuevo los datos generados a partir de un análisis de gráfico de dispersión de colocalización, que mostró significativamente más RGC en la fase de apoptosis temprana ( $p < 0,05$ , verde, Anx+) y menos necrosis ( $p < 0,05$ , rojo, PI+) en 3xTg-AD en comparación con el control envejecido (Figura 10c). Estos datos muestran que mientras que un bajo nivel de muerte celular apoptótica y necrótica ocurre como una correlación del envejecimiento sano normal en ratones, en los ratones con EA hay un aumento significativo en los números relativos de RGC en la apoptosis en fase temprana.

55

A continuación, se investigó si el estrés oxidativo en los ojos con EA influía en la fase de muerte celular y si esto podía visualizarse *in vivo*. Como la acumulación de A $\beta$  intraneuronal y las placas Abeta extracelulares son características de este modelo (LaFerla *et al.*, 2007), los investigadores plantearon la hipótesis de que la adición de PMA revelaría si el nivel de Abeta en este ratón transgénico es suficiente para modular la respuesta retiniana *in vivo*

(Abramov *et al.*, 2005). Por lo tanto, los investigadores compararon los efectos de PMA en animales 3xTg-AD de 14 meses (Figura 10d) y animales de control envejecidos (Figura 10e). PMA pareció aumentar el nivel de tinción de anexina en los ojos tratados de ambos animales. Sin embargo, la cuantificación reveló que aunque el tratamiento con AMP aumentó significativamente la apoptosis en fase temprana tanto en ojos de control como en ojos 3xTg-AD (p <0,05, Figura 10f-g), la magnitud del aumento fue mucho menor en los ojos de control en comparación con 3xTg-AD (30,3 % en control envejecido, 61,4 % en 3xTg-AD). PMA también disminuyó la apoptosis tardía (p <0,05) en el modelo 3xTg-AD y la necrosis (p <0,05) en los ojos de control.

Estos hallazgos muestran que PMA estimula una mayor tasa de apoptosis en fase temprana (tinción de anexina V sola) en animales 3xTg-AD, y son consistentes con los datos en la Figura 8 que muestran un efecto similar de PMA en el modelo de muerte de RGC aguda mediada por Abeta.

**Procesamiento de imágenes para etiquetado celular**

Como se ha mencionado anteriormente, es ventajoso poder superponer una imagen sobre otra y ser capaz de identificar y seguir la apoptosis en células específicas.

**Fase 1. Preprocesamiento** La luminancia y/o el contraste de las regiones que constituyen imágenes de "mosaico" pueden ser heterogéneas y esto es muy problemático para el procesamiento de imágenes que se basa en técnicas de filtro + umbral (como es típico en biología celular). Para hacer frente a esto, se emplea un "control de ganancia" de luminancia local y contraste local (**elemento novedoso n.º 1**) que minimiza las fluctuaciones de luminancia/contraste de escala gruesa y conserva los detalles finos. Este proceso consiste en calcular la desviación media y estándar de los niveles de gris en el espacio de un píxel dado y convertir la luminancia de píxeles en una "puntuación z" de luminancia eficaz. Específicamente, la luminancia media ponderada de Gauss es una versión difusa gaussiana del original

$$\mu = G_s \otimes I$$

1.

donde *I* es la imagen fuente y *G<sub>s</sub>* es un filtro gaussiano bidimensional (desviación estándar, *s*). La desviación estándar ponderada de Gauss se puede calcular de la siguiente manera:

$$\sigma = \sqrt{G_s \otimes I^2 - \mu^2}$$

2.

y la imagen final preprocesada es entonces:

$$P = \frac{G_s - \mu}{\sigma}$$

3.

A continuación, esta imagen se procesa con un filtro de paso de banda laplaciano-gaussiano ( $\Delta^2 G_t$ ) convencional (con desviación estándar, *t*) para destacar la estructura de imagen isotrópica de alta energía. La ventaja del preprocesamiento se ilustra en la Figura 15. La Figura 15a es la imagen original y 15b el resultado de filtrarla con el filtro  $\Delta^2 G_t$ . Se han de tener en cuenta las respuestas de filtro débiles (bajo contraste) en la parte inferior izquierda de la imagen. La Figura 15c muestra la versión preprocesada de la Figura 15a (generada con las Ec. 1-3) y la Figura 15d una versión filtrada de laplaciana de la imagen preprocesada. Se ha de tener en cuenta que la respuesta del filtro ahora es mucho más uniforme espacialmente que en 1b y que la vasculatura candidata y la estructura celular a través ahora es visible en toda la imagen, y seguirá siéndolo después del umbral global (usado rutinariamente, y a continuación, para aislar la estructura de imagen discreta).

**Fase 2. Identificación celular** Para etiquetar la estructura de la imagen como células, primero se aplica el umbral de imagen estándar a las imágenes filtradas. Luego se emplea "análisis de Blob" en las regiones aisladas que resultan para calcular su longitud a lo largo de la longitud de los ejes mayor (*L<sub>maj</sub>*) y menor (*L<sub>min</sub>*), su área (*A*) y su centroide (*[C<sub>x</sub>, C<sub>y</sub>]*). Luego se realiza una categorización novedosa de la estructura de la imagen basada en estas estimaciones. En la imagen de la Figura 15e se han categorizado blobs como células (rojo), vasos (verde) o ruido (azul), basándose en los siguientes criterios: Para ruido:  $A < A_{min}$ , y para vasos:  $(L_{maj} / L_{min}) > Aspecto_{min}$ . Todas las

demás características se clasifican como células. Esta exclusión de la estructura no celular usando criterios de tamaño combinado y relación de aspecto es novedosa.

**Fase 3. Análisis de densidad celular** La fase final del procesamiento usa estimaciones de la ubicación de cada celda ( $[C_x, C_y]$ ) para calcular los mapas de densidad celular. Para cualquier punto dado en una imagen, se genera una estimación del número medio (ponderado de Gauss) de celdas que están dentro de algún espacio que rodea el punto. La Figura 15f es el mapa de densidad resultante de dicho análisis de la imagen de células en la esquina superior derecha. El radio del anillo (inserción) indica el tamaño ( $\pm 1\sigma$ ) de la ventana gaussiana utilizada para calcular la densidad de peso.

10

### Ejemplos de tratamientos para el glaucoma

#### **Apoptosis de RGC glaucomatosas**

15 En el glaucoma crónico, la apoptosis de RGC parece ser un evento temprano (Kerrigan *et al.*, 1997; Quigley, 2005; Quigley *et al.*, 1995), con varios mecanismos implicados en la patogénesis de la muerte de RGC apoptóticas en el glaucoma, aunque aún no se ha identificado un único mecanismo causal. Aunque la IOP puede verse como un inductor directo de estrés y la apoptosis de RGC (Guo *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2009), el daño a RGC puede producirse en presencia de una IOP "normal" (Sommer, 1989). El glaucoma parece ser de naturaleza multifactorial con factores genéticos y ambientales complejos (Fingert *et al.*, 1999; Libby *et al.*, 2005; Mabuchi *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2003). En condiciones de aumento de la IOP, el estrés mecánico sobre la lámina cribosa puede conducir a la degeneración axonal inicial, como lo sugieren Howell *et al.* usando el modelo de ratón DBA/2J de glaucoma. Este estudio también sugirió que es posible proteger las RGC contra dicho daño usando el alelo lento de la degeneración de Waller, lo que permitió la protección funcional del glaucoma en el modelo de ratón D2. *Wld<sup>s</sup>* (Howell *et al.*, 2007).

25

Se han identificado varios factores inductores de estrés diferentes tales como la hipoxia tisular (Kaur *et al.*, 2008; Tezel *et al.*, 2009) y la activación de células gliales (Lebrun-Julien *et al.*, 2009). Los mecanismos que se cree que inician la cascada apoptótica en el glaucoma y, por lo tanto, dianas potenciales para la neuroprotección, se resumen en la Tabla 1. Estos incluyen: excitotoxicidad (Dreyer *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2006; Osborne *et al.*, 1999; Salt y Cordeiro, 2006), disfunción mitocondrial (Mittag *et al.*, 2000; Tatton *et al.*, 2001; Tezel y Yang, 2004), plegamiento defectuoso de proteínas (Guo *et al.*, 2007; McKinnon *et al.*, 2002a; Yoneda *et al.*, 2005), estrés oxidativo (Ko *et al.*, 2005; Tezel, 2006), inflamación (Tezel *et al.*, 2001; Tezel *et al.*, 2007) y privación de neurotrofina (Cui and Harvey, 1995; Rudzinski *et al.*, 2004). Para una revisión exhaustiva de los mecanismos de lesión de RGC véase (Qu *et al.*, 2010).

35

Las posibles estrategias neuroprotectoras incluidas en este artículo se han seleccionado de acuerdo con la evidencia en relación con el glaucoma y/o otras afecciones neurodegenerativas. Por lo tanto, solo se han incluido aquellas terapias donde se ha identificado un mecanismo de acción, y el agente usado que se ha demostrado que modula el mecanismo.

40

Los diversos mecanismos propuestos de muerte celular de RGC se han investigado mediante el uso de una diversidad de modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, como se muestra en la Tabla 1. Las ventajas, desventajas y qué tan estrechamente estos diferentes modelos se correlacionan con el glaucoma de ángulo abierto primario (POAG) en el hombre, han sido recientemente el centro de algunas revisiones exhaustivas (Johnson y Tomarev, 2010). Es importante reconocer que todavía no existe un modelo perfecto de glaucoma, y trasladar los resultados de estudios preclínicos a estudios clínicos es a menudo problemático.

45

#### **Neuroprotección y excitotoxicidad**

50 La excitotoxicidad es el proceso patológico por el cual las RGC y otras células neuronales mueren como resultado del exceso de glutamato extracelular (Choi, 1992; Doble, 1999; Olney, 1969). El glutamato liberado de la célula apoptótica puede desencadenar la muerte necrótica de las células circundantes que se han salvado del insulto original, iniciando una cascada de autodestrucción, lesión celular adicional y muerte (Casson, 2006; Cheung *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 1999). Varios estudios han confirmado el efecto neurotóxico del glutamato en la retina (Gross *et al.*, 1999; Hyndman, 1984; Kawasaki *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001), mientras que otros han sugerido una lesión y muerte de las RGC mediadas por glutamato en glaucoma (Brooks *et al.*, 1997; Dreyer *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2006; McInay *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005; Salt y Cordeiro, 2006).

55

La modulación del receptor de NMDA ha constituido un área principal de investigación en la neuroprotección de

glaucoma (Dong et al., 2008; Guo et al., 2006). Los estudios *in vivo* e *in vitro* han sugerido que el bloqueo de los receptores tanto NMDA como no NMDA ofrece simultáneamente una protección óptima contra la neurodegeneración isquémica (Leinders-Zufall et al., 1994; Mosinger et al., 1991). Hay varios fármacos anti-excitotóxicos que se han investigado *in vivo* e *in vitro*, que ejercen sus acciones neuroprotectoras al superar la excitotoxicidad inducida por glutamato como se indica en la Tabla 1.

Los antagonistas del receptor de NMDA más prominentes son MK801 y memantina. MK801, también conocido como maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina, es un antagonista no competitivo del receptor de NMDA y ha demostrado potencial neuroprotector en el SNC durante muchos años (el-Asrar et al., 1992; Foster et al., 1988; Tamura et al., 1993).

También se ha encontrado que MK-801 protege las RGC tanto *in vitro* (Tsuda, 2004) como *in vivo* en el modelo de lesión del nervio óptico (Russelakis-Carneiro et al., 1996), el modelo de rata con lesión retiniana inducida por láser (Solberg et al., 1997), y en modelos de ratas hipertensas (Chaudhary et al., 1998; Guo et al., 2006). El trabajo en el modelo experimental de isquemia retiniana inducida por alta IOP verificó el efecto neuroprotector de MK801 a mediar a través de la disminución de la expresión de Bad (Russo et al., 2008). El efecto de MK-801 *in vivo* sobre la apoptosis de RGC en un modelo de toxicidad retiniana inducida por estaurosporina mostró una reducción en el número de RGC apoptóticas en comparación con los controles (Guo et al., 2006). Desafortunadamente, MK801 no se usa clínicamente debido a su efecto neurotóxico (Fix et al., 1993; Olney, 1969), lo que se cree que es debido a la alta afinidad a los receptores de NMDA y su largo tiempo de permanencia en el canal (Lipton, 1993).

La memantina, también conocida como 1-amino-3,5-dimetil-adamantano, es un derivado estructural de tres anillos del fármaco anti-influenza, amantadina (Cheung et al., 2008). Se cree que los grupos adicionales de amina (-NH<sub>2</sub>) y dos grupos laterales de metilo (-CH<sub>3</sub>) son responsables del aumento de la residencia y la afinidad por los receptores de NMDA en relación con la amantadina (Lipton, 2006). Sin embargo, Memantina presenta una fuerte dependencia del voltaje con una rápida cinética de bloqueo/desbloqueo, que muestra una potencia débil durante la transmisión sináptica normal (Johnson y Kotermanski, 2006). Una investigación preliminar sobre la memantina como agente neuroprotector en el glaucoma demostraron una reducción en la muerte neuronal inducida por NMDA *in vitro* (Pellegrini y Lipton, 1993). Resultados posteriores *in vivo* han mostrado una disminución de la pérdida de RGC en modelos de rata y ratón isquémicos e hipertensos (Kim et al., 2002; Lagreze et al., 1998; WoldeMussie et al., 2002), potencialmente a través de liberación reducida de citocromo c en la retina de ratón glaucomatoso (Ju et al., 2009). El tratamiento con memantina también dio como resultado una reducción en la contracción de las neuronas dentro del relevo del cuerpo geniculado lateral (LGB) contralateral (capas 1, 4 y 6), una diana principal para las células ganglionares de la retina (Yucel et al., 2006).

La memantina está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer moderada a grave (Reisberg et al., 2003) y es el único agente neuroprotector que ha completado el ensayo clínico de fase III en pacientes con OAG. El ensayo demostró que la memantina fue ineficaz por el criterio de valoración primario, ofreciéndose los mecanismos variables de la apoptosis ganglionar retiniana como explicación (Osborne, 2008), aunque el diseño inadecuado del estudio y el criterio de valoración inadecuado podrían ser motivos adicionales para este resultado.

DNQX es un antagonista del receptor AMPA que ha demostrado una mayor potenciación de la supervivencia de RGC que MK-801 (Yoneda et al., 2003), mientras que se ha demostrado que Riluzol previene o disminuye la apoptosis inducida por la presión y mejora la recuperación de ondas ERG, destacando los beneficios del direccionamiento de múltiples receptores en la muerte celular excitotóxica.

Otra posible ruta neuroprotectora es a través de la mediación de los receptores de acetilcolina (ACh), como lo demuestran los estudios sobre el inhibidor de la ACh esterasa, galantamina, un fármaco clínicamente utilizado en el tratamiento de la EA. La galantamina activa potencialmente el AchR muscarínico, lo que conduce a la protección de las RGC independientemente de los niveles de IOP (Almasieh et al., 2010).

### Disfunción mitocondrial y terapia

Las mitocondrias son la principal fuente de energía dentro de las células y el sitio principal de producción de ROS, por lo que es una diana principal para reducir el estrés oxidativo. Una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial y un aumento en la permeabilidad de la membrana se han visto implicados como un factor causal de la apoptosis de las RGC en el glaucoma (Mittag et al., 2000; Tatton et al., 2001; Tezel y Yang, 2004). Los estímulos relacionados con el glaucoma tal como la hipoxia, el TNF- $\alpha$  y el estrés oxidativo pueden desencadenar la ruta de la

muerte de RGC mediada por mitocondrias. En el estrés glaucomatoso, las mitocondrias regulan el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, lo que conduce a la acumulación intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de ROS (Kristian y Siesjo, 1998). Se ha demostrado que esto desencadena la liberación de proteínas inductoras de apoptosis, tales como citocromo c (Nickells, 1999) y CPP32 (activadores de caspasa 3) a través de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) (Hirsch et al., 1997; Marchetti et al., 1996).

Se han propuesto varios compuestos, descritos en la Tabla 1, para potenciar la energía disponible dentro de la célula y evitar la despolarización mitocondrial.

10

CoQ<sub>10</sub>, también conocida como ubiquinona, desempeña un papel indispensable en el metabolismo energético y presenta el mayor potencial como neuroprotector. Sirve como un cofactor dentro de la cadena respiratoria, transportando electrones y facilitando la producción de ATP. Se ha encontrado que es altamente eficaz como neuroprotector en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, y la ataxia de Friedreich (Beal, 2003). Su efecto neuroprotector, demostrado en RGC tanto *in vivo* como *in vitro*, se cree que es multifactorial (Nakajima et al., 2008; Nucci et al., 2007b), ejercido no solo a través de la mediación del transporte de electrones del complejo I y II al complejo III dentro de la cadena de transporte de electrones sino también a través de sus propiedades antioxidantes, regulación de la expresión génica e inhibición de la PTP (Cheung et al., 2008; Papucci et al., 2003).

20

#### Tratamientos de plegamiento defectuoso de proteínas

Los depósitos de amiloide, que consisten en agregados de Ap, son un rasgo característico de varias enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer (Pepys, 2006), enfermedad de Parkinson (Bayer et al., 2002), y deterioro cognitivo leve (Attems y Jellinger, 2006; Verwey et al., 2008; Villemagne et al., 2008). También se han visto implicados recientemente en la patogénesis del daño retiniano (Shimazawa et al., 2008), la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (Johnson et al., 2002), y el glaucoma (Goldblum et al., 2007; Guo et al., 2007; McKinnon et al., 2002a; Yoneda et al., 2005).

Los fármacos designados para dirigirse al  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta$ ) incluyen inhibidores de  $\beta$ -secretasa (BSI) tales como *N*-benciloxicarbonil-Val-Leu-leucinal (Z-VLL-CHO) que se ha encontrado que reduce la apoptosis de RGC *in vitro* e *in vivo* (Guo et al., 2007; Yamamoto et al., 2004), así como los anticuerpos rojo Congo y Anti- $\text{A}\beta$  (Guo et al., 2007; Lorenzo y Yankner, 1994). La terapia triple, dirigida a diferentes fases de la ruta  $\text{A}\beta$  usando BSI, anticuerpos anti- $\text{A}\beta$  y rojo congo, mostró un efecto neuroprotector superior sobre la apoptosis de RGC en una hipertensión ocular de rata en comparación con tratamientos singulares (Guo et al., 2007).

También son de interés con respecto al plegamiento defectuoso de proteínas las proteínas de choque térmico (HSP), un grupo de chaperonas moleculares especializadas que median diversas funciones fisiológicas dentro de las células. Las HSP están reguladas positivamente en condiciones estresantes para restaurar la integridad estructural normal (Soti et al., 2005).

Varias familias de HSP se han visto implicadas en enfermedades neurodegenerativas (Pepys, 2006), y la apoptosis de RGC glaucomatosas (Guo et al., 2007; McKinnon et al., 2002a), con niveles aumentados de autoanticuerpos circulantes con respecto a alfa-cristalinas y HSP27 (Tezel et al., 1998), y el aumento de la inmunotinción de HSP-60, HSP-27 en RGC y los vasos sanguíneos de la retina en pacientes con glaucoma (Tezel et al., 2000). Se ha demostrado que la administración sistémica de Geranilgeranilacetona, un agente antiulceroso, en el modelo de glaucoma de rata, aumenta la expresión de HSP-72 con una marcada reducción en la pérdida de RGC (Ishii et al., 2003), posiblemente a través de interacciones con diferentes proteínas cinasa tal como Akt cinasa, y la inhibición de NF-KB (Neckers, 2007; Thomas et al., 1998). Los fármacos dirigidos al plegamiento defectuoso de proteínas en el glaucoma se resumen en la Tabla 1.

#### Terapia y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una afección patológica en la que la tasa de producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) excede la capacidad antioxidante del cuerpo. Las ROS son metabolitos altamente reactivos parcialmente reducidos del oxígeno molecular, que contienen un electrón desapareado. ROS se genera principalmente a través de la cadena de transporte de electrones a niveles relativamente bajos durante el metabolismo aeróbico y desempeña una parte integral en la transducción de señales. La isquemia, potencialmente por desregulación vascular y lesión por reperfusión en las células, son indicios críticos de estrés oxidativo (Flammer et al., 1999), lo que

conduce a una generación adicional de ROS con depleción de ATP y fallo mitocondrial, desencadenando las rutas de muerte celular mitocondrial dependiente de caspasa e independiente de caspasa (Murphy, 1999). Los niveles aumentados de ROS aumentan la peroxidación lipídica, la peroxidación de proteínas (Siu y To, 2002) y las rupturas de cadenas individuales en ácidos nucleicos (Finkel, 1998; Finkel y Holbrook, 2000). También se ha encontrado que las ROS inducen la activación y disfunción de las células de Muller, generando más material oxidativo (Neufeld y Liu, 2003; Tezel et al., 2003; Yuan y Neufeld, 2001).

El posible papel de ROS en el glaucoma ha conducido a la investigación de múltiples antioxidantes como posibles agentes neuroprotectores resumidos en la Tabla 1.

10

La melatonina, un potente antioxidante de origen natural con actividad captadora de radicales libres, que presenta un papel crítico en la circulación del humor acuoso y muestra potencial como neuroprotector (Dubocovich et al., 1997; Sugden et al., 1997; Wiechmann et al., 1999; Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1994). Se cree que sus acciones neuroprotectoras están mediadas por múltiples mecanismos incluyendo la reducción de las rupturas monocatenarias y bicatenarias en el ADN (Sun et al., 2002), el aumento de la fosforilación de Akt (Kilic et al., 2005a; Lee et al., 2006; Tajés Orduna et al., 2009), reducción de la apoptosis inducida por NO (Siu et al., 2004) y la inhibición de los poros de transición mitocondrial y la liberación del citocromo c (Andrabi et al., 2004; Jou et al., 2004; Kilic et al., 2004). La melatonina demostró un efecto neuroprotector sobre las RGC *in vivo* (Siu et al., 2004; Tang et al., 2006), también protegió a las neuronas de retina de conejo *in vitro* (Cazevielle y Osborne, 1997). Ginkgo Biloba ha sido parte de la medicina tradicional china y japonesa durante muchos siglos (Evans, 2002; Samuelsson, 1999), para tratar una amplia gama de enfermedades, incluida la enfermedad de Alzheimer (Kanowski et al., 1996; Kanowski y Hoerr, 2003; Yancheva et al., 2009), AMD (Rhone y Basu, 2008) y glaucoma de baja tensión (Quaranta et al., 2003). Sin embargo, los datos autoinformados del estudio 2002 National Health Interview mostraron que no hubo una asociación significativa entre los pacientes con glaucoma y el uso de Ginkgo biloba (Khoury et al., 2009). El extracto de Ginkgo biloba (EGb761) contiene dos compuestos principales: 24 % de glucósido de flavona y 6 % de terpenoides. El glucósido de flavona está compuesto por quercetina, kaempferol e isorhamnetina glucósidos (1-3), y los terpenoides están compuestos por A, B, C, D y J ginkgólidos y bilobalida. El extracto también contiene ácidos orgánicos tales como ácido cinurénico, ácido 6-hidroxycinurénico, ácido vainílico, ácido shikímico y ácido glucúrico (Hirooka et al., 2004). Se encontró que EGb 761 es un excelente antioxidante, que inhibe eficazmente la apoptosis inducida químicamente (Thiagarajan et al., 2002), además de poseer actividades de factores de activación tanto antiinflamatorios como antiplaquetarios. EGb 761 también tiene un efecto vasomodulador sobre los vasos sanguíneos, donde aumenta la velocidad del flujo sanguíneo ocular (Chung et al., 1999). Además, a través de la inhibición del NO, el factor activador de plaquetas (PAF) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) aumenta el flujo sanguíneo cerebral (Diamond et al., 2000). EGb 761 ha demostrado efectos neuroprotectores sobre las RGC en un modelo de glaucoma de rata (Hirooka et al., 2004). Aunque el mecanismo exacto del efecto neuroprotector de EGb 761 aún se desconoce, se han propuesto todos los mecanismos de reducción de la transducción de señal dependiente de  $Ca^{2+}$ , la inhibición de la forma patológica inducible de la enzima NO sintasa (iNOS) (Bastianetto et al., 2000b) y su posible efecto sobre la ruta A $\beta$  (Augustin et al., 2009; Bastianetto et al., 2000a).

#### 40 Estrategias antiinflamatorias e inmunológicas

La creciente evidencia en estudios clínicos y experimentales sugiere fuertemente la participación del sistema inmune en el glaucoma (Tezel et al., 2009). El daño neuronal sostenido en el glaucoma y otras afecciones neurodegenerativas isquémicas puede desencadenar respuestas inmunes, lo que conduce a una producción excesiva de linfocitos T. Los linfocitos T activados posteriormente atacan a los antígenos presentados a su receptor por el complejo principal de histocompatibilidad 9 (MHC 9). Se ha demostrado la regulación positiva de las moléculas MHC de clase II en células gliales de rata y la estimulación de la activación de linfocitos T en tejido cultivado retiniano y del nervio óptico (Tezel et al., 2007). En un modelo de rata desprovisto de linfocitos T debido a la timectomía hubo un aumento de la muerte de RGC después del aplastamiento del nervio óptico (Yoles et al., 2001). Además, varios estudios de investigación mostraron que el aumento del sistema inmune por transferencia pasiva de linfocitos T dirigidos contra proteínas básicas de mielina o la inmunización activa con el péptido derivado de mielina reduce la pérdida de RGC después de la lesión del nervio óptico (Schwartz, 2001). Se ha informado de un hallazgo similar en ratas a las que se les inyectaron linfocitos T de proteína básica antimielina activados después del aplastamiento parcial del nervio óptico (Moalem et al., 1999; Moalem et al., 2000). La liberación de TNF- $\alpha$ , una potente citocina proinflamatoria, y su posterior unión al receptor de muerte, Receptor-1 de TNF- $\alpha$  (TNR-R1), desencadena un componente dependiente de caspasas y un componente independiente de caspasa de las rutas de promoción de la muerte mitocondrial. El complejo TNF- $\alpha$ -R es capaz de reclutar proteínas adaptadoras que activan la caspasa 8, lo que a su vez activa la caspasa 3 (Pastorino et al., 1996; Tezel et al., 2004).

Las actividades de TNF- $\alpha$  están mediadas por interacción con dos receptores distintos, el receptor de TNF-1 que contiene el dominio de muerte (TNF-R1) y el receptor de TNF-2 que no contiene el dominio de muerte (TNF-R2) (Wajant y Scheurich, 2001). Se ha confirmado que TNFR1 media la mayoría de la actividad biológica de TNF- $\alpha$  (Chen y Goeddel, 2002) y se ha sugerido que participa en el proceso neurodegenerativo de glaucoma (Tezel et al., 2001), la pérdida de células neuronales y la isquemia retiniana (Fontaine et al., 2002), mientras que TNF-R2 mostró actividad neuroprotectora, reduciendo la isquemia retiniana (Fontaine et al., 2002).

Los fármacos antiinflamatorios, que se dirigen a la ruta de señalización de TNF- $\alpha$  y presentan actividad neuroprotectora, se han convertido en un área de investigación cada vez más activa como se describe en la Tabla 1.

El fármaco antiinflamatorio más prometedor es el Copolímero-1 (Cop-1), también conocido como acetato de glatiramero. Fue aprobado por la FDA para tratar la Esclerosis Múltiple (EM), Cop-1 es un análogo no encefalitogénico sintético de baja afinidad a la proteína básica de mielina, que desencadena una respuesta autoinmune neuroprotectora, al unirse a las proteínas MHC y mediante la reacción cruzada con diversos linfocitos T y mielina del SNC. Cop-1 presentaba actividad neuroprotectora sobre las RGC *in vivo* en el modelo de rata de aplastamiento del nervio óptico (Kipnis et al., 2000), en modelos animales de alta IOP (Bakalash et al., 2003, Ben Simon et al., 2006) y contra la excitotoxicidad inducida por glutamato (Schori et al., 2001). Se cree que este efecto neuroprotector está mediado por el aumento del número de linfocitos T en un modelo de glaucoma de rata (Li et al., 2008).

#### Privación de neurotrofinas

Los factores neurotróficos, péptidos de peso molecular pequeño, ampliamente expresados en RGC (Jelsma et al., 1993) tienen un papel indispensable en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia. Incluyen: factor de crecimiento nervioso (NGF) (Kaplan et al., 1991), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas 4 y 5 (NT4 y NT5) (Barde et al., 1982; Berkemeier et al., 1991) y NT3 (Hohn et al., 1990; Rosenthal et al., 1990) que ejercen sus efectos a través de cinasas relacionadas con tropomiosina (Trk). Varios estudios de investigación demostraron que el flujo de los factores neurotróficos del colículo superior en el SNC a las RGC se reduce notablemente en el modelo animal de glaucoma, donde tanto el transporte axonal retrógrado como anti-retrógrado están comprometidos (Anderson y Hendrickson, 1974; Hayreh et al., 1979; Rudzinski et al., 2004). Esto conduce a una reducción en el soporte trófico neuronal, lo que a su vez compromete la supervivencia neuronal y desencadena la apoptosis, como se observa en RGC después de la sección transversal del nervio óptico (Berkelaar et al., 1994).

Se han investigado con éxito diversos factores de crecimiento como neuroprotectores, como se describe en la Tabla 1. El NGF (factor de crecimiento nervioso) se ha identificado en varios estudios como neuroprotector en el modelo de glaucoma de Morrison al reducir la apoptosis de RGC mediante aplicación tópica (Colafrancesco et al., 2010 Lambiase et al., 2009) además de mostrar efectos neuroprotectores funcionalmente en los estudios de pacientes (Lambiase et al., 2009). También se ha demostrado que la restauración de los niveles del receptor de NGF, TrkA, es neuroprotectora, proporcionando evidencia adicional de un papel para la ruta del NGF en Glaucoma (Colafrancesco et al., 2010). La participación de la ruta está respaldada por la evidencia de que una combinación de NGF, agonistas de TrkA y antagonistas de p75<sup>NTR</sup> son neuroprotectores (Lebrun-Julien et al., 2009).

Sin embargo, la sostenibilidad sigue siendo una limitación. Después de un tratamiento prolongado con neurotrofinas, las RGC presentaron una disminución en la expresión del receptor de neurotrofina reduciendo la eficacia del tratamiento. Para superar este problema, se ha propuesto una combinación de tratamiento con neurotrofinas y terapia génica dirigida a la regulación ascendente de los receptores (Cheng et al., 2002). Se ha demostrado que la IOP elevada da como resultado una regulación ascendente transitoria de TrkA, una sobreexpresión del receptor TrkC truncado y la activación de los receptores P75 apoptóticos (Rudzinski et al., 2004). La administración exógena de neurotrofinas aumenta la fosforilación de los receptores Trk en la lámina cribosa y los astrocitos del nervio óptico (Lambert et al., 2004); mientras que la transferencia del gen TrkB protege las RGC *in vivo* en el modelo de axotomía (Cheng et al., 2002).

El campo de la terapia génica en la neuroprotección se está expandiendo rápidamente (Liu et al., 2009; Wax y Patil, 1994). En el glaucoma se está convirtiendo en un enfoque altamente accesible (Harvey et al., 2006), ya que la malla trabecular, el epitelio ciliar, el músculo ciliar, las células Müller y las RGC son estructuras diana apropiadas para la terapia génica, y se han probado diversos sistemas de administración (Borras et al., 2002).

Un agente prometedor para la terapia de glaucoma es BIRC-4, también conocido como XIAP (IAP: inhibidores de la proteína de apoptosis). La inyección intravítrea de vector viral adenoasociado usando codificación de pollo-p-actina

(AAV-CBA) para BIRC4 humano en el modelo de rata de glaucoma crónico dio como resultado una marcada reducción en la apoptosis de RGC que se mantuvo durante 12 semanas. Se cree que este efecto neuroprotector está mediado por la inhibición directa de caspasa-3 y caspasa-8, manteniendo indirectamente la producción de neurotrofinas de células Muller e influyendo en la circulación del humor acuoso o una combinación de ambos (McKinnon et al., 2002b).

### Compuestos con múltiples mecanismos de acción: Brimonidina y estrógenos

El tartrato de brimonidina al 0,2 % se conoce también como UK-14, 304, es un agonista adrenérgico  $\alpha_2$  de tercera generación que atrae el interés de muchos investigadores en el campo de la neuroprotección. El efecto neuroprotector de Brimonidina en RGC se ha demostrado *in vitro* (Knels et al., 2008) e *in vivo* (Donello et al., 2001; Wheeler et al., 1999, WoldeMussie et al., 2001). Sin embargo, el modo de acción para Brimonidina sigue sin estar claro con diversos mecanismos propuestos. Se cree que el efecto positivo de Brimonidina en la supervivencia de RGC, que incluye una reducción en su tamaño de soma en un modelo de hipertensión ocular de rata, está mediado por la atenuación de la toxicidad del glutamato o la regulación ascendente de los factores neurotróficos derivados del cerebro (Hernandez et al., 2008). Sin embargo, en un modelo de rata de isquemia retiniana inducida por presión, se sugirió que el efecto neuroprotector de Brimonidina estaría mediado a través de la inhibición de la cascada apoptótica, posiblemente a través de la inducción de genes antiapoptóticos como bcl-2 y bcl-x, así como como cinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y rutas de fosfatidilinositol-3' cinasa/proteína cinasa (Lai et al., 2002). Mientras que, el efecto de la Brimonidina en las RGC en retinas de rata aisladas, así como *in vivo* en modelos de glaucoma de rata y conejo se demostró que estaba mediado por la reducción de la reducción mediada por el  $\alpha_2$ -adrenoceptor de cAMP intracelular (Dong et al., 2008).

Un ensayo clínico que evaluó los efectos de la brimonidina no relacionados con la IOP demostró un deterioro del campo visual reducido en comparación con la trabeculoplastia con láser de 360° (Gandolfi et al., 2004), mientras que se esperan los resultados del tratamiento con brimonidina en el estudio del tratamiento del glaucoma a baja presión (Krupin et al., 2005).

Los estrógenos, hormonas esteroides derivadas del colesterol, mantienen la función normal de diversos órganos, estando los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$  ampliamente expresados en tejidos retinianos humanos y animales (Kobayashi et al., 1998; Ogueta et al., 1999). El estrógeno ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos animales de Alzheimer (Simpkins et al., 2005) y otras enfermedades neurológicas (Hoffman et al., 2006). Se cree que la acción neuroprotectora del estrógeno está mediada por múltiples mecanismos; la unión con los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$  (D'Astous et al., 2004; Dubal et al., 2001; Singer et al., 1996), la activación de genes antiapoptóticos tales como Bcl-2 y Bcl-xl (García-Segura et al., 1998), la inhibición del estrés oxidativo mitocondrial (Razmara et al., 2007), la inhibición de la muerte neuronal inducida por p-amiloide, así como la estimulación de la ruta Akt/PI-3k (Honda et al., 2000 Zhang et al., 2001). El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol de neuronas corticales de rata expuestas a glutamato demostró una mayor integridad y función neuronal, posiblemente mediada por una reducción en los niveles de caspasa-3 y calpaína (Sribnick et al., 2004). Un análogo de estradiol también demostró efectos protectores sobre el RPE (Dykens et al., 2004; Yu et al., 2005) y sobre las RGC *in vitro* (Kumar et al., 2005) e *in vivo* (Nakazawa et al., 2006; Zhou et al., 2007).

### Conclusión

La gestión de pacientes con glaucoma puede ser un desafío clínico para los oftalmólogos debido al hecho de que la mayoría de los pacientes con glaucoma son asintomáticos hasta que se produce una pérdida sustancial del campo visual. Sin embargo, durante los últimos años, se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos tanto patogénicos como neuroprotectores involucrados en el glaucoma y su tratamiento. Históricamente, sin embargo, el traslado de fármacos preclínicos y experimentales a pacientes ha demostrado ser problemático debido a la falta de buenos modelos experimentales de la enfermedad; el estrecho índice terapéutico de los fármacos neuroprotectores debido a efectos secundarios no deseados en los pacientes, así como la falta de buenos criterios de valoración clínicos (Levin y Peebles, 2008). Ahora se cree que se necesitan mejores criterios de valoración clínicos para acceder a los nuevos agentes terapéuticos. Desafortunadamente, el fracaso del ensayo clínico de fase III de memantina en pacientes con glaucoma ha reducido el entusiasmo por las trayectorias neuroprotectoras (Osborne, 2008). Sin embargo, los avances recientes en la tecnología de imágenes deberían proporcionar a los médicos e investigadores herramientas más fiables para acceder a los agentes neuroprotectores de eficacia (Cordeiro et al., 2004; Cordeiro et al., 2009). Todavía no está claro si la neuroprotección en el glaucoma tiene un papel en los pacientes, y es probable que permanezca poco claro hasta que se publiquen ensayos clínicos de glaucoma bien diseñados y exitosos que demuestren la existencia de un fármaco que proporcione neuroprotección.

## BIBLIOGRAFÍA

- 5 Abramov & Duchon. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 2309-2314 (2005).
- Allen et al. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharm. Toxicol. Meth.*, 37(4), 215-228 (1997).
- Belmokhtar et al. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20, 3354-3362. (2001).
- 10 Cordeiro et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13352-13356(2004).
- Dahlgren et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046-32053 (2002).
- Guo et al. Alzheimer's disease and retinal neurodegeneration. *Curr. Alzh. Res.* 6(2009).
- 15 Guo, L., et al. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 13444-13449 (2007).
- Guo et al. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 626-633 (2006).
- 20 Honig & Hume. Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in neurosciences* 12, 333-335, 340-331. (1989).
- Huerta et al. Screening and detection of apoptosis. *The Journal of surgical research* 139, 143-156 (2007).
- LaFerla et al. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499-509 (2007).
- Li et al. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J. Neurosci.* 24, 4070-4081 (2004).
- 25 Maass et al. Assessment of Rat and Mouse RGC Apoptosis Imaging in Vivo with Different Scanning Laser Ophthalmoscopes. *Current eye research* 32, 851-861 (2007).
- Miguel-Hidalgo et al. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* 958, 210-221. (2002).
- 30 Ning et al. Amyloid Beta Deposits Lead to Retinal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5136-5143 (2008).
- Oddo et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421 (2003).
- Schmitz-Valckenberg et al. Real-time in-vivo imaging of retinal cell apoptosis after laser exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2008).
- 35 Sensi et al. Altered oxidant-mediated intraneuronal zinc mobilization in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 43, 488-492 (2008).
- Shimazawa et al. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling. *J. Neurochem.* 107, 279-290 (2008).
- 40 von Ruckmann & Fitzke, Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. *Br. J. Ophthalmol.* 79, 407-12. (1995).
- Wade & Fitzke, A fast, robust pattern recognition system for low light level image registration and its application to retinal imaging. *Optics Express* 3, 190-197 (1998).
- Abe, Y., Hashimoto, S., and Horie, T. (1999). Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 39, 41-47.
- 45 Almasieh, M., Zhou, Y., Kelly, M. E., Casanova, C., and Di Polo, A. (2010). Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death Dis* 1, -.
- Anderson, D. R., and Hendrickson, A. (1974). Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Investigative ophthalmology* 13, 771-783.
- 50 Andrabi, S. A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G., and Horn, T. F. (2004). Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *Faseb J* 18, 869-871.
- Aoun, P., Simpkins, J. W., and Agarwal, N. (2003). Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2999-3004. Attems, J., and Jellinger, K. A. (2006). Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clinical neuropathology* 25, 265-271.
- 55 Augustin, S., Rimbach, G., Augustin, K., Schliebs, R., Wolffram, S., and Cermak, R. (2009). Effect of a short- and long-term treatment with Ginkgo biloba extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Archives of biochemistry and biophysics* 481, 177-182.

- Aydemir, O., Naziroglu, M., Celebi, S., Yilmaz, T., and Kukner, A. S. (2004). Antioxidant effects of alpha-, gamma- and succinate-tocopherols in guinea pig retina during ischemia-reperfusion injury. *Pathophysiology* 11, 167-171.
- 5 Bakalash, S., Kessler, A., Mizrahi, T., Nussenblatt, R., and Schwartz, M. (2003). Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3374-3381.
- Barde, Y. A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1, 549-553.
- Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R. (2000a). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *The European journal of neuroscience* 12, 1882-1890.
- 10 Bastianetto, S., Zheng, W. H., and Quirion, R. (2000b). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *Journal of neurochemistry* 74, 2268-2277.
- Bayer, A. U., Keller, O. N., Ferrari, F., and Maag, K. P. (2002). Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *American journal of ophthalmology* 133, 135-137.
- 15 Beal, M. F. (2003). Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S39-47; discussion S47-38.
- Behrens, M. M., Strasser, U., Heindinger, V., Lobner, D., Yu, S. P., McDonald, J. W., Won, M., and Choi, D. W. (1999). Selective activation of group II mGluRs with LY354740 does not prevent neuronal excitotoxicity. *Neuropharmacology* 38, 1621-1630.
- 20 Ben Simon, G. J., Bakalash, S., Aloni, E., and Rosner, M. (2006). A rat model for acute rise in intraocular pressure: immune modulation as a therapeutic strategy. *American journal of ophthalmology* 141, 1105-1111.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330, 585-591.
- 25 Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14, 4368-4374.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7, 857-866.
- 30 Borrás, T., Brandt, C. R., Nickells, R., and Ritch, R. (2002). Gene therapy for glaucoma: treating a multifaceted, chronic disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2513-2518.
- Brooks, D. E., Garcia, G. A., Dreyer, E. B., Zurakowski, D., and Franco-Bourland, R. E. (1997). Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *American journal of veterinary research* 58, 864-867.
- 35 Calzada, J. I., Jones, B. E., Netland, P. A., and Johnson, D. A. (2002). Glutamate-induced excitotoxicity in retina: neuroprotection with receptor antagonist, dextromethorphan, but not with calcium channel blockers. *Neurochemical research* 27, 79-88.
- Casson, R. J. (2006). Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clinical & experimental ophthalmology* 34, 54-63.
- 40 Cazevielle, C., and Osborne, N. N. (1997). Retinal neurones containing kainate receptors are influenced by exogenous kainate and ischaemia while neurones lacking these receptors are not -- melatonin counteracts the effects of ischaemia and kainate. *Brain Res* 755, 91-100.
- Cazevielle, C., Safa, R., and Osborne, N. N. (1997). Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. *Brain research* 768, 120-124.
- 45 Chaudhary, P., Ahmed, F., and Sharma, S. C. (1998). MK801-a neuroprotectant in rat hypertensive eyes. *Brain Res* 792, 154-158.
- Chen, G., and Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, NY)* 296, 1634-1635.
- Cheng, L., Sapieha, P., Kittlerova, P., Hauswirth, W. W., and Di Polo, A. (2002). TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci* 22, 3977-3986.
- 50 Cheung, W., Guo, L., and Cordeiro, M. F. (2008). Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches. *Optom Vis Sci* 85, 406-416.
- Chidlow, G., Schmidt, K. G., Wood, J. P., Melena, J., and Osborne, N. N. (2002). Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* 43, 1015-1025.
- 55 Chidlow, G., Wood, J. P., and Casson, R. J. (2007). Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs* 67, 725-759.
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of neurobiology* 23, 1261-1276.
- Chung, H. S., Harris, A., Kristinsson, J. K., Ciulla, T. A., Kagemann, C., and Ritch, R. (1999). Ginkgo biloba extract increases ocular blood flow velocity. *J Ocul Pharmacol Ther* 15, 233-240.
- Colafrancesco, V., Parisi, V., Sposato, V., Rossi, S., Russo, M. A., Coassin, M., Lambiase, A., and Aloe, L.

- (2010). Ocular Application of Nerve Growth Factor Protects Degenerating Retinal Ganglion Cells in a Rat Model of Glaucoma. *J Glaucoma*.
- Cordeiro, M. F., Guo, L., Luong, V., Harding, G., Wang, W., Jones, H. E., Moss, S. E., Sillito, A. M., and Fitzke, F. W. (2004). Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13352-13356.
- Cordeiro, M. F., Nickells, R., Drexler, W., Borrás, T., and Ritch, R. (2009). High-resolution ocular imaging: combining advanced optics and microtechnology. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 40, 480-488.
- Cui, Q., and Harvey, A. R. (1995). At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci* 15, 8143-8155.
- Cunha, R. A., Ribeiro, J. A., and Malva, J. O. (2004). Presynaptic kainate receptors modulating glutamatergic transmission in the rat hippocampus are inhibited by arachidonic acid. *Neurochemistry international* 44, 371-379.
- D'Astous, M., Morissette, M., and Di Paolo, T. (2004). Effect of estrogen receptor agonists treatment in MPTP mice: evidence of neuroprotection by an ER alpha agonist. *Neuropharmacology* 47, 1180-1188.
- Diamond, B. J., Shiflett, S. C., Feiweil, N., Matheis, R. J., Noskin, O., Richards, J. A., and Schoenberger, N. E. (2000). Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 81, 668-678.
- Digicaylioglu, M., and Lipton, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412, 641-647.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology & therapeutics* 81, 163-221.
- Donello, J. E., Padillo, E. U., Webster, M. L., Wheeler, L. A., and Gil, D. W. (2001). alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 216-223.
- Dong, C. J., Guo, Y., Agey, P., Wheeler, L., and Hare, W. A. (2008). Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4515-4522.
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M., and Lipton, S. A. (1996). Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Archives of ophthalmology* 114, 299-305.
- Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Kindy, M. S., and Wise, P. M. (2001). Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1952-1957.
- Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S., and Sauri, D. M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mela and Mellb recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 355, 365-375.
- Duhaime, A. C., Gennarelli, L. M., and Boardman, C. (1996). Neuroprotection by dextromethorphan in acute experimental subdural hematoma in the rat. *Journal of neurotrauma* 13, 79-84.
- Dykens, J. A., Carroll, A. K., Wiley, S., Covey, D. F., Cai, Z. Y., Zhao, L., and Wen, R. (2004). Photoreceptor preservation in the S334ter model of retinitis pigmentosa by a novel estradiol analog. *Biochemical pharmacology* 68, 1971-1984.
- el-Asrar, A. M., Morse, P. H., Maimone, D., Torczynski, E., and Reder, A. T. (1992). MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 3463-3468.
- El-Remessy, A. B., Khalil, I. E., Matragoon, S., Abou-Mohamed, G., Tsai, N. J., Roon, P., Caldwell, R. B., Caldwell, R. W., Green, K., and Liou, G. I. (2003). Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *The American journal of pathology* 163, 1997-2008.
- Eschweiler, G. W., and Bahr, M. (1993). Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy. *Journal of the neurological sciences* 116, 34-40.
- Ettaiche, M., Fillacier, K., Widmann, C., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1999). Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 729-736.
- Evans (2002). *Pharmacognosy*, 17th edn (Philadelphia: W.B. Saunders).
- Fingert, J. H., Heon, E., Liebmann, J. M., Yamamoto, T., Craig, J. E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S. T., Buys, Y. M., Dickinson, J., et al. (1999). Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Human molecular genetics* 8, 899-905.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology* 10, 248-253.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

- Fix, A. S., Horn, J. W., Wightman, K. A., Johnson, C. A., Long, G. G., Storts, R. W., Farber, N., Wozniak, D. F., and Olney, J. W. (1993). Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Experimental neurology* 123, 204-215.
- 5 Flammer, J., Haefliger, I. O., Orgul, S., and Resink, T. (1999). Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? *Journal of glaucoma* 8, 212-219.
- Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., and Eisel, U. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22, RC216.
- 10 Foster, A. C., Gill, R., and Woodruff, G. N. (1988). Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J Neurosci* 8, 4745-4754.
- Garcia-Segura, L. M., Cardona-Gomez, P., Naftolin, F., and Chowen, J. A. (1998). Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9, 593-597.
- 15 Gibbs, J. W., 3rd, Sombati, S., DeLorenzo, R. J., and Coulter, D. A. (2000). Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 41 Suppl 1, S10-16.
- Goldberg, M. P., Pham, P. C., and Choi, D. W. (1987). Dextrophan and dextromethorphan attenuate hypoxic injury in neuronal culture. *Neuroscience letters* 80, 11-15.
- Goldblum, D., Kipfer-Kauer, A., Sarra, G. M., Wolf, S., and Frueh, B. E. (2007). Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta immunoreactivity in DBA/2J glaucomatous mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5085-5090.
- 20 Gross, R. L., Hensley, S. H., Gao, F., and Wu, S. M. (1999). Retinal ganglion cell dysfunction induced by hypoxia and glutamate: potential neuroprotective effects of beta-blockers. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1, S162-170.
- Guo, L., Moss, S. E., Alexander, R. A., Ali, R. R., Fitzke, F. W., and Cordeiro, M. F. (2005). Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 175-182.
- 25 Guo, L., Salt, T. E., Luong, V., Wood, N., Cheung, W., Maass, A., Ferrari, G., Russo-Marie, F., Sillito, A. M., Cheetham, M. E., et al. (2007). Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13444-13449.
- 30 Guo, L., Salt, T. E., Maass, A., Luong, V., Moss, S. E., Fitzke, F. W., and Cordeiro, M. F. (2006). Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 626-633.
- Gupta, N., Ang, L. C., Noel de Tilly, L., Bidaisee, L., and Yucel, Y. H. (2006). Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br J Ophthalmol* 90, 674-678.
- 35 Hagen, T. M., Ingersoll, R. T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C. M., Vinarsky, V., Bartholomew, J. C., and Ames, A. B. (1999). (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J* 13, 411-418.
- Hains, B. C., and Waxman, S. G. (2005). Neuroprotection by sodium channel blockade with phenytoin in an experimental model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4164-4169.
- 40 Harvey, A. R., Hu, Y., Leaver, S. G., Mellough, C. B., Park, K., Verhaagen, J., Plant, G. W., and Cui, Q. (2006). Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system. *Prog Retin Eye Res* 25, 449-489.
- Hayreh, S. S., March, W., and Anderson, D. R. (1979). Pathogenesis of block of rapid orthograde axonal transport by elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 28, 515-523.
- 45 Hernandez, M., Urcola, J. H., and Vecino, E. (2008). Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. *Exp Eye Res* 86, 798-806.
- Hirooka, K., Tokuda, M., Miyamoto, O., Itano, T., Baba, T., and Shiraga, F. (2004). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Curr Eye Res* 28, 153-157.
- 50 Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-1581.
- Hoffman, G. E., Merchenthaler, I., and Zup, S. L. (2006). Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 29, 217-231.
- 55 Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y. A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-341.
- Honda, K., Sawada, H., Kihara, T., Urushitani, M., Nakamizo, T., Akaike, A., and Shimohama, S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60, 321-327.

- Hong, S., Kim, C. Y., Lee, J. E., and Seong, G. J. (2009). Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis. *Life Sci* 84, 28-32.
- Hong, S., Park, K., Kim, C. Y., and Seong, G. J. (2008). Agmatine inhibits hypoxia-induced TNF- $\alpha$  release from cultured retinal ganglion cells. *Biocell* 32, 201-205.
- 5 Howell, G. R., Libby, R. T., Jakobs, T. C., Smith, R. S., Phalan, F. C., Barter, J. W., Barbay, J. M., Marchant, J. K., Mahesh, N., Porciatti, V., et al. (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* 179, 1523-1537.
- Huang, W., Fileta, J. B., Dobberfuhr, A., Filippopolous, T., Guo, Y., Kwon, G., and Grosskreutz, C. L. (2005). Calcineurin cleavage is triggered by elevated intraocular pressure, and calcineurin inhibition blocks retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12242-12247.
- 10 Hyndman, A. G. (1984). The effects of glutamate and kainate on cell proliferation in retinal cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 558-563.
- Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Nakajima, Y., Suemori, S., Mishima, S., and Hara, H. (2006). Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 3, 71-77.
- 15 Ishii, Y., Kwong, J. M., and Caprioli, J. (2003). Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1982-1992.
- Jelsma, T. N., Friedman, H. H., Berkelaar, M., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1993). Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J Neurobiol* 24, 1207-1214.
- 20 Ji, J. Z., Elyaman, W., Yip, H. K., Lee, V. W., Yick, L. W., Hugon, J., and So, K. F. (2004). CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci* 19, 265-272.
- Jiang, C., Moore, M. J., Zhang, X., Klassen, H., Langer, R., and Young, M. (2007). Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 13, 1783-1792.
- 25 Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., et al. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- $\alpha$ , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124.
- Johnson, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M., and Thoenen, H. (1986). Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6, 3031-3038.
- 30 Johnson, J. W., and Kotermanski, S. E. (2006). Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 6, 61-67.
- Johnson, L. V., Leitner, W. P., Rivest, A. J., Staples, M. K., Radeke, M. J., and Anderson, D. H. (2002). The Alzheimer's A  $\beta$  peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11830-11835.
- 35 Johnson, T. V., and Tomarev, S. I. (2010). Rodent models of glaucoma. *Brain research bulletin* 81, 349-358.
- Jou, M. J., Peng, T. I., Reiter, R. J., Jou, S. B., Wu, H. Y., and Wen, S. T. (2004). Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 37, 55-70.
- 40 Ju, W. K., Kim, K. Y., Angert, M., Duong-Polk, K. X., Lindsey, J. D., Ellisman, M. H., and Weinreb, R. N. (2009). Memantine blocks mitochondrial OPA1 and cytochrome c release and subsequent apoptotic cell death in glaucomatous retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 707-716.
- 45 Junk, A. K., Mammis, A., Savitz, S. I., Singh, M., Roth, S., Malhotra, S., Rosenbaum, P. S., Cerami, A., Brines, M., and Rosenbaum, D. M. (2002). Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10659-10664.
- Juravleva, E., Barbakadze, T., Mikeladze, D., and Kekelidze, T. (2005). Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glia cells, modulates Ras/NF- $\kappa$ B signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 79, 224-230.
- 50 Kanowski, S., Herrmann, W. M., Stephan, K., Wierich, W., and Horr, R. (1996). Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 29, 47-56.
- Kanowski, S., and Hoerr, R. (2003). Ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia: intent-to-treat analyses of a 24-week, multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Pharmacopsychiatry* 36, 297-303.
- 55 Kapin, M. A., Doshi, R., Scatton, B., DeSantis, L. M., and Chandler, M. L. (1999). Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1177-1182.
- Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L. F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252, 554-558.

- Katsuki, H., Yamamoto, R., Nakata, D., Kume, T., and Akaike, A. (2004). Neuronal nitric oxide synthase is crucial for ganglion cell death in rat retinal explant cultures. *J Pharmacol Sci* 94, 77-80.
- Kaur, C., Foulds, W. S., and Ling, E. A. (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol* 2, 879-889.
- 5 Kawasaki, A., Han, M. H., Wei, J. Y., Hirata, K., Otori, Y., and Barnstable, C. J. (2002). Protective effect of arachidonic acid on glutamate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1835-1842.
- Kawasaki, A., Otori, Y., and Barnstable, C. J. (2000). Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3444-3450.
- 10 Kerrigan, L. A., Zack, D. J., Quigley, H. A., Smith, S. D., and Pease, M. E. (1997). TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Archives of ophthalmology* 115, 1031-1035.
- Khoury, R., Cross, J. M., Girkin, C. A., Owsley, C., and McGwin, G. (2009). The Association Between Self-reported Glaucoma and Ginkgo Biloba Use. *Journal of Glaucoma* 18, 543-545.
- Kikuchi, M., Tenneti, L., and Lipton, S. A. (2000). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20, 5037-5044.
- 15 Kilic, E., Kilic, U., Yulug, B., Hermann, D. M., and Reiter, R. J. (2004). Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator. *J Pineal Res* 36, 171-176.
- Kilic, U., Kilic, E., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., and Hermann, D. M. (2005a). Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 38, 67-71.
- 20 Kilic, U., Kilic, E., Soliz, J., Bassetti, C. I., Gassmann, M., and Hermann, D. M. (2005b). Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *Faseb J* 19, 249-251.
- Kim, T. W., Kim, D. M., Park, K. H., and Kim, H. (2002). Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. *Korean J Ophthalmol* 16, 1-7.
- 25 Kipnis, J., Yoles, E., Porat, Z., Cohen, A., Mor, F., Sela, M., Cohen, I. R., and Schwartz, M. (2000). T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7446-7451.
- 30 Klivenyi, P., Ferrante, R. J., Matthews, R. T., Bogdanov, M. B., Klein, A. M., Andreassen, O. A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., and Beal, M. F. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature medicine* 5, 347-350.
- Knels, L., Worm, M., Wendel, M., Roehlecke, C., Kniep, E., and Funk, R. H. (2008). Effects of advanced glycation end products-inductor glyoxal and hydrogen peroxide as oxidative stress factors on rat retinal organ cultures and neuroprotection by UK-14,304. *J Neurochem* 106, 1876-1887.
- 35 Ko, M. L., Peng, P. H., Ma, M. C., Ritch, R., and Chen, C. F. (2005). Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic Biol Med* 39, 365-373.
- Kobayashi, K., Kobayashi, H., Ueda, M., and Honda, Y. (1998). Estrogen receptor expression in bovine and rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2105-2110.
- 40 Kristian, T., and Siesjo, B. K. (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29, 705-718.
- Krupin, T., Liebmann, J. M., Greenfield, D. S., Rosenberg, L. F., Ritch, R., and Yang, J. W. (2005). The Low-pressure Glaucoma Treatment Study (LoGTS) study design and baseline characteristics of enrolled patients. *Ophthalmology* 112, 376-385.
- 45 Kumar, D. M., Perez, E., Cai, Z. Y., Aoun, P., Brun-Zinkernagel, A. M., Covey, D. F., Simpkins, J. W., and Agarwal, N. (2005). Role of nonfeminizing estrogen analogues in neuroprotection of rat retinal ganglion cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 38, 1152-1163.
- Kwon, Y. H., Fingert, J. H., Kuehn, M. H., and Alward, W. L. (2009). Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 360, 1113-1124.
- 50 Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., Powe, L., Durrleman, S., Delumeau, J. C., and Meininger, V. (1996). A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. *ALS/Riluzole Study Group-II. Neurology* 47, S242-250.
- Laengle, U. W., Markstein, R., Pralet, D., Seewald, W., and Roman, D. (2006a). Effect of GLC756, a novel mixed dopamine D1 receptor antagonist and dopamine D2 receptor agonist, on TNF-alpha release in vitro from activated rat mast cells. *Exp Eye Res* 83, 1335-1339.
- 55 Laengle, U. W., Trendelenburg, A. U., Markstein, R., Nogues, V., Provencher-Bollinger, A., and Roman, D. (2006b). GLC756 decreases TNF-alpha via an alpha2 and beta2 adrenoceptor related mechanism. *Exp Eye Res* 83, 1246-1251.
- Lagreze, W. A., Knorle, R., Bach, M., and Feuerstein, T. J. (1998). Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1063-1066.

- Lai, R. K., Chun, T., Hasson, D., Lee, S., Mehrbod, F., and Wheeler, L. (2002). Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis Neurosci* 19, 175-185.
- Lambert, W. S., Clark, A. F., and Wordinger, R. J. (2004). Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa. *Mol Vis* 10, 289-296.
- 5 Lambiase, A., Aloe, L., Centofanti, M., Parisi, V., Mantelli, F., Colafrancesco, V., Manni, G. L., Bucci, M. G., Bonini, S., and Levi-Montalcini, R. (2009). Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- 10 Lebrun-Julien, F., Duplan, L., Pemet, V., Osswald, I., Sapielha, P., Bourgeois, P., Dickson, K., Bowie, D., Barker, P. A., and Di Polo, A. (2009). Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci* 29, 5536-5545.
- Lee, S. H., Chun, W., Kong, P. J., Han, J. A., Cho, B. P., Kwon, O. Y., Lee, H. J., and Kim, S. S. (2006). Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. *J Pineal Res* 40, 79-85.
- 15 Leinders-Zufall, T., Rand, M. N., Waxman, S. G., and Kocsis, J. D. (1994). Differential role of two Ca(2+)-permeable non-NMDA glutamate channels in rat retinal ganglion cells: kainate-induced cytoplasmic and nuclear Ca<sup>2+</sup> signals. *J Neurophysiol* 72, 2503-2516.
- Levin, L. A., and Peeples, P. (2008). History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care* 14, S11-14.
- 20 Li, S. Y., Fu, Z. J., Ma, H., Jang, W. C., So, K. F., Wong, D., and Lo, A. C. (2009). Effect of lutein on retinal neurons and oxidative stress in a model of acute retinal ischemia/reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 836-843.
- Li, X., Qian, S. H., and Sun, X. H. (2008). [Protection of autoimmunity induced by copolymer-1 on optic nerve: experiment with rat glaucoma models]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88, 2152-2154.
- 25 Libby, R. T., Gould, D. B., Anderson, M. G., and John, S. W. (2005). Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 15-44.
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370-8377.
- 30 Lipton, S. A. (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16, 527-532.
- Lipton, S. A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5, 160-170.
- 35 Liu, J., Head, E., Gharib, A. M., Yuan, W., Ingersoll, R. T., Hagen, T. M., Cotman, C. W., and Ames, B. N. (2002). Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2356-2361.
- Liu, X., Rasmussen, C. A., Gabelt, B. T., Brandt, C. R., and Kaufman, P. L. (2009). Gene therapy targeting glaucoma: where are we? *Surv Ophthalmol* 54, 472-486.
- 40 Lorenzo, A., and Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12243-12247.
- Luo, X., Heidinger, V., Picaud, S., Lambrou, G., Dreyfus, H., Sahel, J., and Hicks, D. (2001). Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1096-1106.
- 45 Mabuchi, F., Tang, S., Kashiwagi, K., Yamagata, Z., Iijima, H., and Tsukahara, S. (2007). The OPA1 gene polymorphism is associated with normal tension and high tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 143, 125-130.
- Mandal, M. N., Patlolla, J. M., Zheng, L., Agbaga, M. P., Tran, J. T., Wicker, L., Kasus-Jacobi, A., Elliott, M. H., Rao, C. V., and Anderson, R. E. (2009). Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 46, 672-679.
- 50 Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994). Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 1632-1636.
- 55 Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184, 1155-1160.
- Matteucci, A., Frank, C., Domenici, M. R., Balduzzi, M., Paradisi, S., Carnovale-Scalzo, G., Scordia, G., and Malchiodi-Albedi, F. (2005). Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on

- N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase. *Exp Brain Res* 167, 641-648.
- Matthews, R. T., Ferrante, R. J., Klivenyi, P., Yang, L., Klein, A. M., Mueller, G., Kaddurah-Daouk, R., and Beal, M. F. (1999). Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 157, 142-149.
- 5 Matthews, R. T., Yang, L., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., Kaddurah-Daouk, R., and Beal, M. F. (1998). Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18, 156-163.
- McInlay, T. R., Gionfriddo, J. R., Dubielzig, R. R., Powell, C. C., and Madl, J. E. (2004). Evaluation of glutamate loss from damaged retinal cells of dogs with primary glaucoma. *Am J Vet Res* 65, 776-786.
- 10 McKinnon, S. J., Lehman, D. M., Kerrigan-Baumrind, L. A., Merges, C. A., Pease, M. E., Kerrigan, D. F., Ransom, N. L., Tahzib, N. G., Reitsamer, H. A., Levkovitch-Verbin, H., et al. (2002a). Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1077-1087.
- McKinnon, S. J., Lehman, D. M., Tahzib, N. G., Ransom, N. L., Reitsamer, H. A., Liston, P., LaCasse, E., Li, Q., Korneluk, R. G., and Hauswirth, W. W. (2002b). Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model. *Mol Ther* 5, 780-787.
- 15 Mittag, T. W., Danias, J., Pohorenc, G., Yuan, H. M., Burakgazi, E., Chalmers-Redman, R., Podos, S. M., and Tatton, W. G. (2000). Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3451-3459.
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I. R., and Schwartz, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nature medicine* 5, 49-55.
- 20 Moalem, G., Yoles, E., Leibowitz-Amit, R., Muller-Giloi, S., Mor, F., Cohen, I. R., and Schwartz, M. (2000). Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves. *J Neuroimmunol* 106, 189-197.
- Moreno, M. C., Sande, P., Marcos, H. A., de Zavalía, N., Keller Sarmiento, M. I., and Rosenstein, R. E. (2005). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *Faseb J* 19, 1161-1162.
- 25 Mosinger, J. L., Price, M. T., Bai, H. Y., Xiao, H., Wozniak, D. F., and Olney, J. W. (1991). Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp Neurol* 113, 10-17.
- Murphy, M. P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1411, 401-414.
- 30 Nakajima, Y., Inokuchi, Y., Nishi, M., Shimazawa, M., Otsubo, K., and Hara, H. (2008). Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in vivo. *Brain Res* 1226, 226-233.
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., and Hara, H. (2009a). Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. *Phytother Res* 23, 1431-1438.
- 35 Nakajima, Y., Shimazawa, M., Otsubo, K., Ishibashi, T., and Hara, H. (2009b). Zeaxanthin, a retinal carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress. *Curr Eye Res* 34, 311-318.
- Nakazawa, T., Takahashi, H., Nishijima, K., Shimura, M., Fuse, N., Tamai, M., Hafezi-Moghadam, A., and Nishida, K. (2007). Pitavastatin prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death by suppressing leukocyte recruitment. *J Neurochem* 100, 1018-1031.
- 40 Nakazawa, T., Takahashi, H., and Shimura, M. (2006). Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain Res* 1093, 141-149.
- Nash, M. S., Wood, J. P., Melena, J., and Osborne, N. N. (2000). Flupirtine ameliorates ischaemic-like death of rat retinal ganglion cells by preventing calcium influx. *Brain Res* 856, 236-239.
- Naskar, R., Quinto, K., Romann, I., Schuettauf, F., and Zurakowski, D. (2002). Phenytoin blocks retinal ganglion cell death after partial optic nerve crush. *Exp Eye Res* 74, 747-752.
- 45 Naskar, R., Vorwerk, C. K., and Dreyer, E. B. (2000). Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1940-1944.
- Neacsu, A., Oprean, C., Curea, M., Tuchila, G., and Trifu, M. (2003). [Neuroprotection with carotenoids in glaucoma]. *Oftalmologia* 59, 70-75.
- Neckers, L. (2007). Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 32, 517-530.
- 50 Negishi, H., Xu, J. W., Ikeda, K., Njelekela, M., Nara, Y., and Yamori, Y. (2004). Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 134, 38-42.
- Neufeld, A. H. (2004). Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma. *Brain Res Bull* 62, 455-459.
- 55 Neufeld, A. H., and Liu, B. (2003). Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. *Neuroscientist* 9, 485-495.
- Neufeld, A. H., Sawada, A., and Becker, B. (1999). Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9944-9948.

- Nickells, R. W. (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1, S151-161.
- Nucci, C., Gasperi, V., Tartaglione, R., Cerulli, A., Terrinoni, A., Bari, M., De Simone, C., Agro, A. F., Morrone, L. A., Corasaniti, M. T., et al. (2007a). Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2997-3004.
- 5 Nucci, C., Tartaglione, R., Cerulli, A., Mancino, R., Spano, A., Cavaliere, F., Rombola, L., Bagetta, G., Corasaniti, M. T., and Morrone, L. A. (2007b). Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *Int Rev Neurobiol* 82, 397-406.
- 10 Ogueta, S. B., Schwartz, S. D., Yamashita, C. K., and Farber, D. B. (1999). Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1906-1911.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Opere, C. A., Zheng, W. D., Zhao, M., Lee, J. S., Kulkarni, K. H., and Ohia, S. E. (2006). Inhibition of potassium- and ischemia-evoked [3H] D-aspartate release from isolated bovine retina by cannabinoids. *Curr Eye Res* 31, 645-653.
- 15 Osborne, N. N. (2008). Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Progress in brain research* 173, 339-352.
- Osborne, N. N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J. H., Wood, J. P., and Nash, M. S. (1999). Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1, S102-128.
- 20 Osborne, N. N., Wood, J. P., Cupido, A., Melena, J., and Chidlow, G. (2002). Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against ischemia-excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1456-1464.
- Otori, Y., Wei, J. Y., and Barnstable, C. J. (1998). Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 972-981.
- 25 Pang, I. H., Wexler, E. M., Nawy, S., DeSantis, L., and Kapin, M. A. (1999). Protection by eliprodiol against excitotoxicity in cultured rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1170-1176.
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G., et al. (2003). Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* 278, 28220-28228.
- 30 Pastorino, J. G., Simbula, G., Yamamoto, K., Glascott, P. A., Jr., Rothman, R. J., and Farber, J. L. (1996). The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 271, 29792-29798.
- Pease, M. E., Zack, D. J., Berlinicke, C., Bloom, K., Cone, F., Wang, Y., Klein, R. L., Hauswirth, W. W., and Quigley, H. A. (2009). Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2194-2200.
- 35 Pellegrini, J. W., and Lipton, S. A. (1993). Delayed administration of memantine prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Ann Neurol* 33, 403-407.
- Pepys, M. B. (2006). Amyloidosis. *Annual review of medicine* 57, 223-241.
- 40 Qu, J., Wang, D., and Grosskreutz, C. L. (2010). Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res*.
- Quaranta, L., Bettelli, S., Uva, M. G., Semeraro, F., Turano, R., and Gandolfo, E. (2003). Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. *Ophthalmology* 110, 359-362; discussion 362-354.
- 45 Quigley, H. A. (2005). Glaucoma: macrocosm to microcosm the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2662-2670.
- Quigley, H. A., and Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90, 262-267.
- 50 Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., and Zack, D. J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 774-786.
- Ray, K., Mukhopadhyay, A., and Acharya, M. (2003). Recent advances in molecular genetics of glaucoma. *Mol Cell Biochem* 253, 223-231.
- Razmara, A., Duckles, S. P., Krause, D. N., and Procaccio, V. (2007). Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 1176, 71-81.
- 55 Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 348, 1333-1341.
- Rhone, M., and Basu, A. (2008). Phytochemicals and age-related eye diseases. *Nutrition reviews* 66, 465-472.

- Rodriguez-Tebar, A., Jeffrey, P. L., Thoenen, H., and Barde, Y. A. (1989). The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev Biol* 136, 296-303.
- 5 Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G. R., Nikolics, K., and Winslow, J. W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4, 767-773.
- Rudzinski, M., Wong, T. P., and Saragovi, H. U. (2004). Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol* 58, 341-354.
- Russelakis-Carneiro, M., Silveira, L. C., and Perry, V. H. (1996). Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *J Neurocytol* 25, 393-402.
- 10 Russo, R., Cavaliere, F., Berliocchi, L., Nucci, C., Gliozzi, M., Mazzei, C., Tassorelli, C., Corasaniti, M. T., Rotiroti, D., Bagetta, G., and Morrone, L. A. (2008). Modulation of pro-survival and death-associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade. *J Neurochem* 107, 1347-1357.
- Salt, T. E., and Cordeiro, M. F. (2006). Glutamate excitotoxicity in glaucoma: throwing the baby out with the bathwater? *Eye (London, England)* 20, 730-731; author reply 731-732.
- 15 Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin*, 4th edn (Stockholm: Swedish Pharmaceutical Society).
- Sappington, R. M., Sidorova, T., Long, D. J., and Calkins, D. J. (2009). TRPV1: Contribution to Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Increased Intracellular Ca<sup>2+</sup> with Exposure to Hydrostatic Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 717-728.
- 20 Sattler, M. B., Merkler, D., Maier, K., Stadelmann, C., Ehrenreich, H., Bahr, M., and Diem, R. (2004). Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2, S181-192.
- Schnebelen, C., Pasquis, B., Salinas-Navarro, M., Joffre, C., Creuzot-Garcher, C. P., Vidal-Sanz, M., Bron, A. M., Bretilon, L., and Acar, N. (2009). A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.
- 25 Schori, H., Kipnis, J., Yoles, E., WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wheeler, L. A., and Schwartz, M. (2001). Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3398-3403.
- 30 Schuettauf, F., Naskar, R., Vorwerk, C. K., Zurakowski, D., and Dreyer, E. B. (2000). Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4313-4316.
- Schuettauf, F., Zurakowski, D., Quinto, K., Varde, M. A., Besch, D., Laties, A., Anderson, R., and Wen, R. (2005). Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243, 1036-1042.
- 35 Schwartz, M. (2001). Physiological approaches to neuroprotection. boosting of protective autoimmunity. *Surv Ophthalmol* 45 Suppl 3, S256-260; discussion S273-256.
- Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Stames, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., et al. (1999). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11458-11463.
- 40 Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Okuno, T., Nakajima, Y., Sakaguchi, G., Kato, A., Oku, H., Sugiyama, T., Kudo, T., Ikeda, T., et al. (2008). Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling. *J Neurochem* 107, 279-290.
- 45 Shimazawa, M., Nakajima, Y., Mashima, Y., and Hara, H. (2009). Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res* 1251, 269-275.
- Simpkins, J. W., Wen, Y., Perez, E., Yang, S., and Wang, X. (2005). Role of nonfeminizing estrogens in brain protection from cerebral ischemia: an animal model of Alzheimer's disease neuropathology. *Ann N Y Acad Sci* 1052, 233-242.
- 50 Singer, C. A., Rogers, K. L., Strickland, T. M., and Dorsa, D. M. (1996). Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212, 13-16.
- Siu, A. W., Ortiz, G. G., Benitez-King, G., To, C. H., and Reiter, R. J. (2004). Effects of melatonin on the nitric oxide treated retina. *Br J Ophthalmol* 88, 1078-1081.
- 55 Siu, A. W., and To, C. H. (2002). Nitric oxide and hydroxyl radical-induced retinal lipid peroxidation in vitro. *Clin Exp Optom* 85, 378-382.
- Skradski, S., and White, H. S. (2000). Topiramate blocks kainate-evoked cobalt influx into cultured neurons. *Epilepsia* 41 Suppl 1, S45-47.
- Solberg, Y., Rosner, M., Turetz, J., and Belkin, M. (1997). MK-801 has neuroprotective and antiproliferative

- effects in retinal laser injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1380-1389.
- Sommer, A. (1989). Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107, 186-188.
- Soti, C., Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P., and Ferdinandy, P. (2005). Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British journal of pharmacology* 146, 769-780.
- 5 Sribnick, E. A., Ray, S. K., Nowak, M. W., Li, L., and Banik, N. L. (2004). 17beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res* 76, 688-696.
- Sugden, D., Pickering, H., Teh, M. T., and Garratt, P. J. (1997). Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity. *Biol Cell* 89, 531-537.
- 10 Sun, F. Y., Lin, X., Mao, L. Z., Ge, W. H., Zhang, L. M., Huang, Y. L., and Gu, J. (2002). Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. *J Pineal Res* 33, 48-56.
- Tajes Orduña, M., Pelegri Gabalda, C., Vilaplana Hortensi, J., Pallas Lliberia, M., and Camins Espuny, A. (2009). An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis. *J Pineal Res* 46, 262-267.
- 15 Tamura, Y., Sato, Y., Yokota, T., Akaike, A., Sasa, M., and Takaori, S. (1993). Ifenprodil prevents glutamate cytotoxicity via polyamine modulatory sites of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1017-1025.
- Tang, Q., Hu, Y., and Cao, Y. (2006). Neuroprotective effect of melatonin on retinal ganglion cells in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26, 235-237, 253.
- 20 Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R. M., Sud, A., Podos, S. M., and Mittag, T. W. (2001). Maintaining mitochondrial membrane impermeability. an opportunity for new therapy in glaucoma? *Surv Ophthalmol* 45 Suppl 3, S277-283; discussuin S295-276.
- Teiten, M. H., Reuter, S., Schmucker, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells. *Cancer Lett* 279, 145-154.
- 25 Tezel, G. (2006). Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 25, 490-513.
- Tezel, G., Chauhan, B. C., LeBlanc, R. P., and Wax, M. B. (2003). Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3025-3033.
- 30 Tezel, G., Hernandez, R., and Wax, M. B. (2000). Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Archives of ophthalmology* 118, 511-518.
- Tezel, G., Li, L. Y., Patil, R. V., and Wax, M. B. (2001). TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1787-1794.
- 35 Tezel, G., Seigel, G. M., and Wax, M. B. (1998). Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2277-2287.
- Tezel, G., and Yang, X. (2004). Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4049-4059.
- 40 Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Cai, J., Kain, A. D., Powell, D. W., Kuehn, M. H., and Pierce, W. M. (2009). Hemoglobin expression and regulation in glaucoma: insights into retinal ganglion cell oxygenation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 907-919.
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Peng, Y., Sun, S. L., and Sun, D. (2007). Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 705-714.
- 45 Tezel, G., Yang, X., Yang, J., and Wax, M. B. (2004). Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res* 996, 202-212.
- Thiagarajan, G., Chandani, S., Harinarayana Rao, S., Samuni, A. M., Chandrasekaran, K., and Balasubramanian, D. (2002). Molecular and cellular assessment of ginkgo biloba extract as a possible ophthalmic drug. *Exp Eye Res* 75, 421-430.
- 50 Thomas, S. C., Ryan, M. A., Shanley, T. P., and Wong, H. R. (1998). Induction of the stress response with prostaglandin A1 increases 1-kappaBalpha gene expression. *Faseb J* 12, 1371-1378.
- Tsuda, K. (2004). Neuroprotective effects of MK-801 and catecholamine release in the central nervous system. *Stroke* 35, e96.
- Vallazza-Deschamps, G., Fuchs, C., Cia, D., Tessier, L. H., Sahel, J. A., Dreyfus, H., and Picaud, S. (2005). Diltiazem-induced neuroprotection in glutamate excitotoxicity and ischemic insult of retinal neurons. *Doc Ophthalmol* 110, 25-35.
- 55 Verwey, N. A., Schuitemaker, A., van der Flier, W. M., Mulder, S. D., Mulder, C., Hack, C. E., Scheltens, P., Blankenstein, M. A., and Veerhuis, R. (2008). Serum amyloid p component as a biomarker in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26, 522-527.
- Villemagne, V. L., Pike, K. E., Darby, D., Maruff, P., Savage, G., Ng, S., Ackermann, U., Cowie, T. F., Currie,

- J., Chan, S. G., et al. (2008). Abeta deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 46, 1688-1697.
- Wajant, H., and Scheurich, P. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 19-32.
- 5 Wang, W. P., Iyo, A. H., Miguel-Hidalgo, J., Regunathan, S., and Zhu, M. Y. (2006). Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1084, 210-216.
- Ward, M. S., Khoobehi, A., Lavik, E. B., Langer, R., and Young, M. J. (2007). Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *Journal of pharmaceutical sciences* 96, 558-568.
- 10 Wax, M., and Patil, R. (1994). A rationale for gene targeting in glaucoma therapy. *J Ocul Pharmacol* 10, 403-410.
- Weber, A. J., Chen, H., Hubbard, W. C., and Kaufman, P. L. (2000). Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1370-1379.
- 15 Wheeler, L. A., Lai, R., and Woldemussie, E. (1999). From the lab to the clinic: activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur J Ophthalmol* 9 Suppl 1, S17-21.
- Wiechmann, A. F., Campbell, L. D., and Defoe, D. M. (1999). Melatonin receptor RNA expression in Xenopus retina. *Brain Res Mol Brain Res* 63, 297-303.
- 20 Wiechmann, A. F., and Wirsig-Wiechmann, C. R. (1994). Melatonin receptor distribution in the brain and retina of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain Behav Evol* 43, 26-33.
- WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M., and Wheeler, L. A. (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2849-2855.
- 25 WoldeMussie, E., Yoles, E., Schwartz, M., Ruiz, G., and Wheeler, L. A. (2002). Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma* 11, 474-480.
- Yamamoto, R., Yoneda, S., and Hara, H. (2004). Neuroprotective effects of beta-secretase inhibitors against rat retinal ganglion cell death. *Neurosci Lett* 370, 61-64.
- Yancheva, S., Ihl, R., Nikolova, G., Panayotov, P., Schlaefke, S., and Hoerr, R. (2009). Ginkgo biloba extract EGb 761(R), donepezil or both combined in the treatment of Alzheimer's disease with neuropsychiatric features: a randomised, double-blind, exploratory trial. *Aging Ment Health* 13, 183-190.
- 30 Yang, S. W., Lee, B. R., and Koh, J. W. (2007). Protective effects of epigallocatechin gallate after UV irradiation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Korean J Ophthalmol* 21, 232-237.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H., and Schwartz, M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 21, 3740-3748.
- Yoneda, S., Hara, H., Hirata, A., Fukushima, M., Inomata, Y., and Tanihara, H. (2005). Vitreous fluid levels of beta-amyloid((1-42)) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* 49, 106-108.
- 40 Yoneda, S., Tanaka, E., Goto, W., Ota, T., and Hara, H. (2003). Topiramate reduces excitotoxic and ischemic injury in the rat retina. *Brain Res* 967, 257-266.
- Yu, X., Tang, Y., Li, F., Frank, M. B., Huang, H., Dozmorov, I., Zhu, Y., Centola, M., and Cao, W. (2005). Protection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured human retinal pigment epithelial cells by 17beta-estradiol: a differential gene expression profile. *Mech Ageing Dev* 126, 1135-1145.
- 45 Yuan, L., and Neufeld, A. H. (2001). Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res* 64, 523-532.
- Yucel, Y. H., Gupta, N., Zhang, Q., Mizisin, A. P., Kalichman, M. W., and Weinreb, R. N. (2006). Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Archives of ophthalmology* 124, 217-225.
- 50 Zhang, B., Rusciano, D., and Osborne, N. N. (2008). Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. *Brain Res* 1198, 141-152. Zhang, B., Safa, R., Rusciano, D., and Osborne, N. N. (2007). Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain Res* 1159, 40-53.
- Zhang, L., Rubinow, D. R., Xiang, G., Li, B. S., Chang, Y. H., Maric, D., Barker, J. L., and Ma, W. (2001). Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *Neuroreport* 12, 1919-1923.
- 55 Zhou, X., Li, F., Ge, J., Sarkisian, S. R., Jr., Tomita, H., Zaharia, A., Chodosh, J., and Cao, W. (2007). Retinal ganglion cell protection by 17-beta-estradiol in a mouse model of inherited glaucoma. *Dev Neurobiol* 67, 603-616.

Mecanismo Excitotoxicidad	Diana	Compuesto	Modelo	Referencias
Excitotoxicidad	NMDA-R	Memantina	<i>in vitro</i> (NMDA) <i>in vivo</i> (OHT, aplastamiento del nervio óptico, UEG, DBA/2J, Isquemia)	(Ju et al., 2009; Kim et al., 2002; Lagreze et al., 1998; Pellegrini and Lipton, 1993; WoldeMussie et al., 2002; Yucel et al., 2006)
		MK801	<i>in vitro</i> (Hipoxia, Glutamato) <i>in vivo</i> (NMDA, Quinolinato, Láser, OHT, MCAO, SSP, Axotomía)	(Chaudhary et al., 1998; el-Asrar et al., 1992; Foster et al., 1988; Guo et al., 2006; Russelakis-Carneiro et al., 1996; Solberg et al., 1997; Tamura et al., 1993; Tsuda, 2004)
		Flupritina	<i>in vivo</i> (NMDA, Isquemia)	(Nash et al., 2000)
		DXM	<i>in vitro</i> (Hipoxia) <i>in vivo</i> (Láser, OHT, SSP, Hematoma Subdural)	(Calzada et al., 2002; Duhaime et al., 1996; Goldberg et al., 1987; Guo et al., 2006)
		Eliprodilo	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (NMDA, Isquemia)	(Kapin et al., 1999; Pang et al., 1999)
		Ifenprodilo	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (OHT, SSP)	(Guo et al., 2006; Tamura et al., 1993)
		Inhibidor de p38	<i>in vivo</i> (Axotomía)	(Kikuchi et al., 2000)
		Topiramato	<i>in vitro</i> (Kainato)	(Gibbs et al., 2000; Skradski and White, 2000)
		DNQX	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (Aplastamiento del nervio óptico)	(Otori et al., 1998; Schuettauf et al., 2000)
		Ácido araquidónico	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (Kainato)	(Cunha et al., 2004; Kawasaki et al., 2002)
		LY354740	<i>in vitro</i> (NMDA, Privación de glucosa/oxígeno) <i>in vivo</i> (Isquemia, OHT, SSP)	(Behrens et al., 1999; Guo et al., 2006)
		Flunarizina	<i>in vivo</i> (Axotomía, Isquemia, NMDA)	(Eschweiler and Bahr, 1993; Osborne et al., 2002)
		Diltiazem	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (Isquemia)	(Vallazza-Deschamps et al., 2005)
		Riluzol	<i>in vivo</i> (Axotomía)	(Ettaiche et al., 1999)
Agonista de TRPV1	<i>in vitro</i> (presión hidrostática) <i>in vivo</i> (ratón DBA/2)	(Sappington et al., 2009)		
Canales de Na <sup>+</sup>	Fenitoína	<i>in vivo</i> (Aplastamiento del nervio óptico, OHT)	(Hains and Waxman, 2005; Naskar et al., 2002)	
Receptores de ACh	Galantamina	<i>in vivo</i> (OHT, axotomía del nervio óptico)	(Almasieh et al., 2010)	
Disfunción mitocondrial	ROS	Ácido lipoico	<i>in vivo</i> (Envejecido, Isquemia)	(Chidlow et al., 2002; Hagen et al., 1999; Liu et al., 2002)
		FK506	<i>in vivo</i> (Aplastamiento del nervio óptico)	(Huang et al., 2005)

	ROS, NF-κB	Creatina	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (Modelo animal, MPTP)	(Juravleva et al., 2005; Klivenyi et al., 1999; Matthews et al., 1999; Matthews et al., 1998)
	PI3-Akt, NF-κB	Eritropoyetina	<i>in vivo</i> (Isquemia, Neuritis óptica, Axotomía, Citocinas, DBA/2J)	(Digicaylioglu and Lipton, 2001; Junk et al., 2002; Kilic et al., 2005b; Sattler et al., 2004)
	Mitochondria	EGCG	<i>in vivo</i> (DBA/2J)	(Negishi et al., 2004; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2007)
	PTP	CoQ <sub>10</sub>	<i>in vitro</i> (SS, Antimicina A, Ceramida, UVC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <i>in vivo</i> (Isquemia, NMDA)	(Nakajima et al., 2008; Nucci et al., 2007b; Papucci et al., 2003; Russo et al., 2008)
	Desconocido	Nicotinamida	<i>in vivo</i> (Model animal)	(Beal, 2003)
<b>Plegamiento defectuoso de proteínas</b>	β-amiloide	Rojo Congo	<i>in vivo</i> (OHT, β-amiloide)	(Guo et al., 2007)
		Anti-β-amiloide	<i>in vivo</i> (OHT, β-amiloide)	(Guo et al., 2007)
	β-secretasa	Z-VLL-CHO	<i>in vivo</i> (OHT, β-amiloide)	(Guo et al., 2007)
	HSPs	GGA	<i>in vivo</i> (OHT)	(Ishii et al., 2003)
	NOS	Aminoguanidina	<i>in vitro</i> (Explantos) <i>in vivo</i> (OHT)	(Katsuki et al., 2004; Neufeld, 2004; Neufeld et al., 1999)
<b>Estrés oxidativo</b>		Ginko Biloba	<i>in vitro</i> (Aloxano, Dexametasona, Glutamato) <i>in vivo</i> (OHT)	(Hirooka et al., 2004; Thiagarajan et al., 2002)

Mecanismo	Diana	Compuesto	Modelo	Referencias	
<b>Estrés oxidativo (Continuación)</b>	ROS	Propóleo verde brasileño	<i>in vitro</i> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , SSP, Privación de oxígeno-glucosa/Reoxigenación) <i>in vivo</i> (NMDA)	(Inokuchi et al., 2006; Nakajima et al., 2009a)	
		Carotenoides	<i>in vitro</i> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , SS) <i>in vivo</i> (OHT, Isquemia)	(Li et al., 2009; Nakajima et al., 2009b; Neacsu et al., 2003; Schnebelen et al., 2009; Shimazawa et al., 2009)	
		Melatonina	<i>in vivo</i> (Isquemia, Kainato)	(Cazeville et al., 1997; Tang et al., 2006)	
		Tocoferol	<i>in vitro</i> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <i>in vivo</i> (Isquemia)	(Aydemir et al., 2004; Nakajima et al., 2008)	
<b>Estrategias de inflamación inmunológicas</b>	Múltiple	Agonistas PPAR-γ	<i>in vitro</i> (Glutamato)	(Aoun et al., 2003)	
		Curcumina	<i>in vitro</i> (IS, NMDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <i>in vivo</i> (Modelo animal)	(Abe et al., 1999; Lim et al., 2001; Mandal et al., 2009; Matteucci et al., 2005; Teiten et al., 2009)	
		Pflavastatina	<i>in vivo</i> (NMDA)	(Nakazawa et al., 2007)	
	ROS	GLC756	<i>in vitro</i> (IS) <i>in vivo</i> (IS)	(Laengle et al., 2006a; Laengle et al., 2006b)	
	Proteína básica de mielina	Cop-1	<i>in vivo</i> (OHT, Aplastamiento del nervio óptico, Glutamato)	(Bakalash et al., 2003; Ben Simon et al., 2006; Kipnis et al., 2000; Li et al., 2008; Schori et al., 2001)	
	Desconocido	Agmatina	<i>in vitro</i> (Hipoxia, NMDA, TNFα)	(Hong et al., 2009; Hong et al., 2008; Wang et al., 2006)	
	TrkB, p75	BDNF	<i>in vitro</i> (Retirada de BDNF) <i>in vivo</i> (Axotomía, Retirada del colículo superior, OHT)	(Cui and Harvey, 1995; Harvey et al., 2006; Johnson et al., 1986; Mansour-Robaey et al., 1994; Rodríguez-Tebar et al., 1989)	
	TrkB	Receptor de CNTF	NT-1	<i>in vivo</i> (Aplastamiento del nervio óptico, NMDA)	(Schuetttauf et al., 2005; Senaldi et al., 1999)
			NT-4/5	<i>in vivo</i> (Retirada del colículo superior)	(Cui and Harvey, 1995)
		de CNTF	CNTF	<i>in vivo</i> (OHT)	(Ji et al., 2004; Pease et al., 2009)
GFRA-1, GFRA-2			GDNF	<i>in vivo</i> (OHT)	(Jiang et al., 2007; Jing et al., 1996; Naskar et al., 2000; Ward et al., 2007)
<b>Terapia génica</b>	TrkA	NGF	<i>in vivo</i> (OHT) <i>in vivo</i> (axotomía)	(Colafrancesco et al., 2010; Lambiase et al., 2009; Lebrun-Julien et al., 2009)	
	TrkB, BIRC-4, GDNF	Agonista de TrkA	<i>in vivo</i> (Axotomía, OHT)	(Cheng et al., 2002; McKinnon et al., 2002b; Pease et al., 2009)	
<b>Múltiples mecanismos</b>	Múltiple	Estrogeno	<i>in vitro</i> (Glutamato) <i>in vivo</i> (Ovariectomía, DBA/2J)	(Kumar et al., 2005; Nakazawa et al., 2006; Sribnick et al., 2004)	
		Brimonidina	<i>in vitro</i> (NMDA, Glioxal, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <i>in vivo</i> (Isquemia, Aplastamiento del nervio óptico, OHT)	(Donello et al., 2001; Dong et al., 2008; Hernandez et al., 2008; Knels et al., 2008; Lai et al., 2002; Wheeler et al., 1999; WoldeMussie et al., 2001)	
		Cannabinoides	<i>in vitro</i> (Cloruro potásico, Isquemia) <i>in vivo</i> (NMDA, Isquemia)	(El-Remessy et al., 2003; Nucci et al., 2007a; Opere et al., 2006)	

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar una fase de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo el método:
- 5 generar una imagen *in vivo* de células apoptóticas en el ojo de un sujeto, habiéndose administrado al sujeto un marcador apoptótico marcado, y contar el número de células apoptóticas en la imagen, comprendiendo además el método comparar el número de células apoptóticas en la imagen con el número de células apoptóticas en una imagen del ojo del sujeto obtenidas previamente.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa ocular.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la enfermedad neurodegenerativa ocular es glaucoma o neuropatía diabética.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el marcador es una anexina, especialmente anexina V.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etiqueta es una etiqueta optimizada por  
20 longitud de onda.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células apoptóticas son células retinianas, tales como células nerviosas retinianas.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las células apoptóticas son células ganglionares de la retina (RGC), células bipolares, amacrinas, horizontales y/o fotorreceptoras.

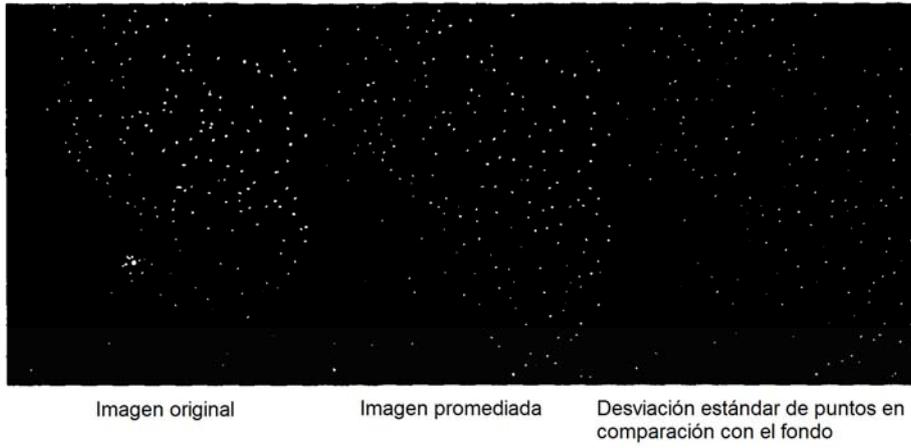


FIG. 1



FIG. 2

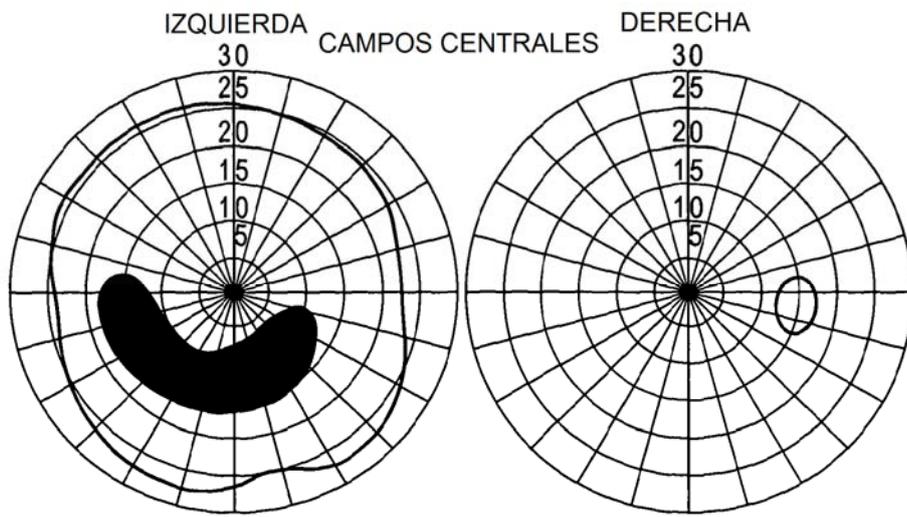


FIG. 3

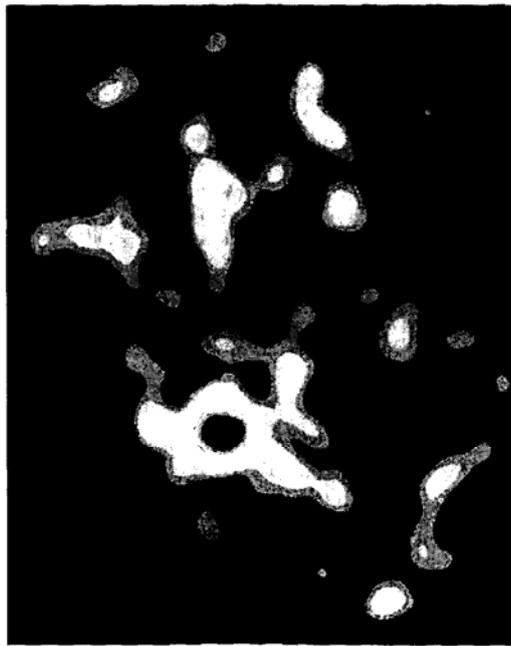
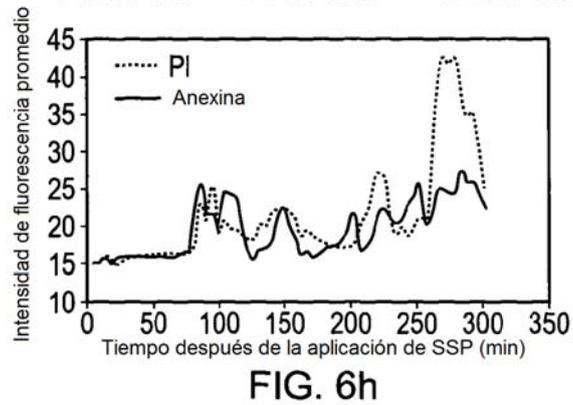
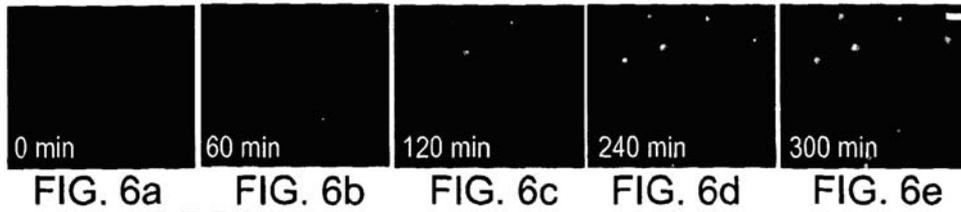
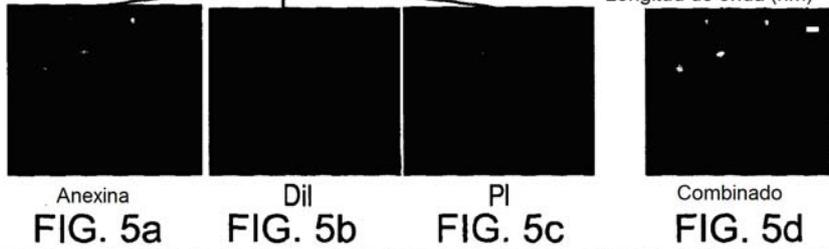
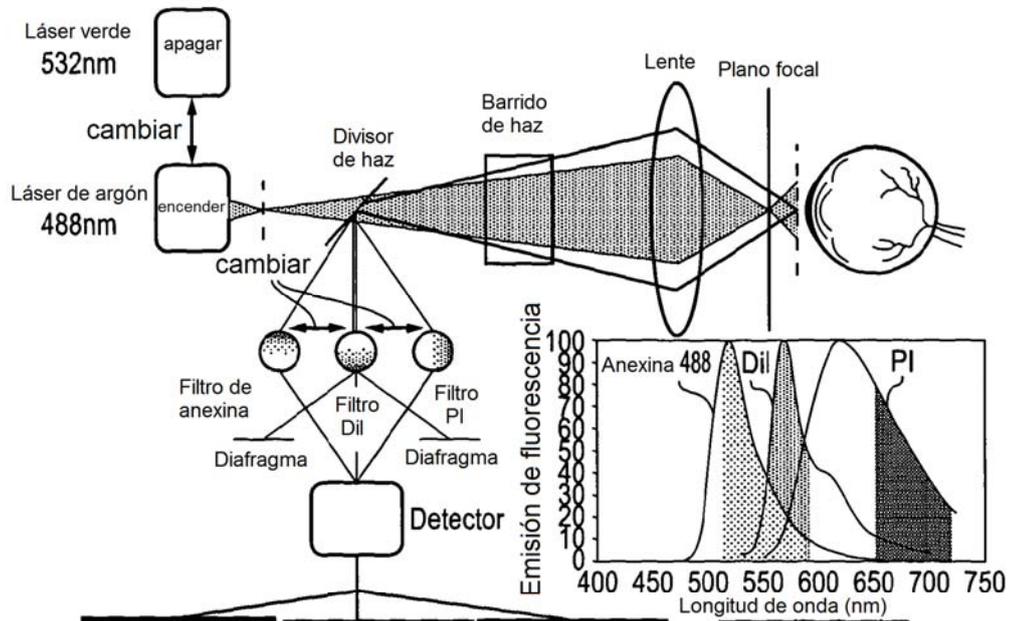
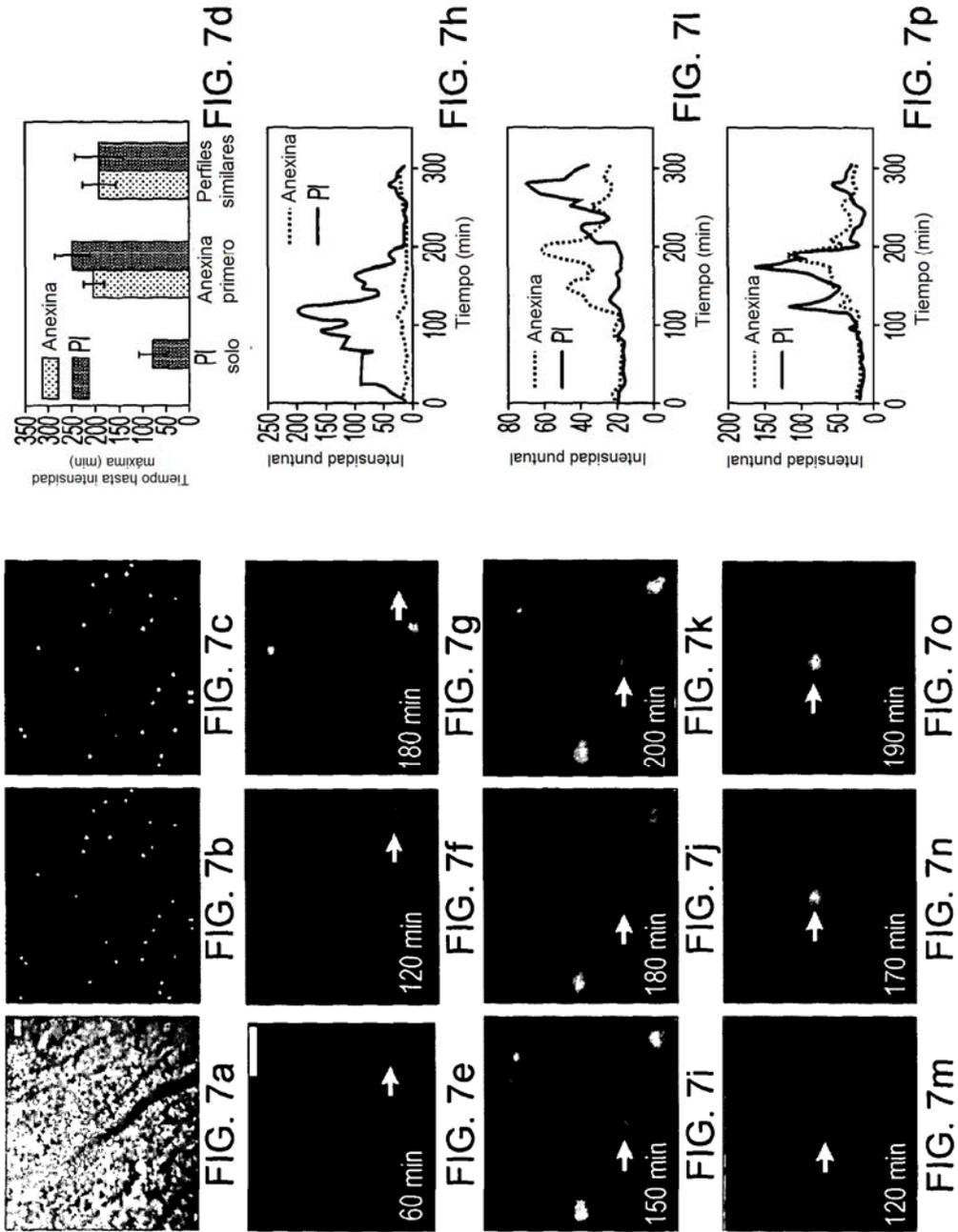
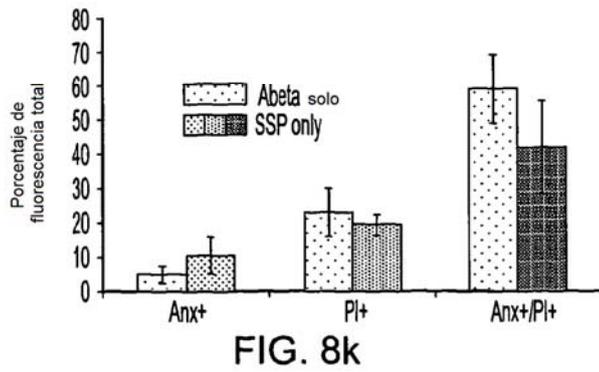
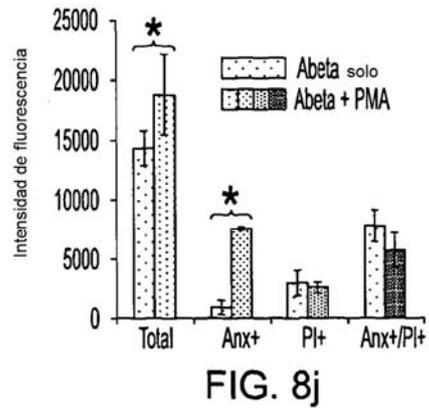
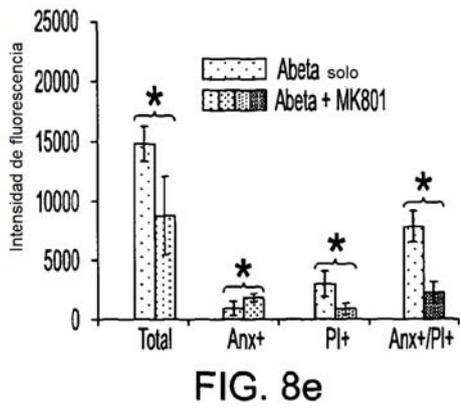
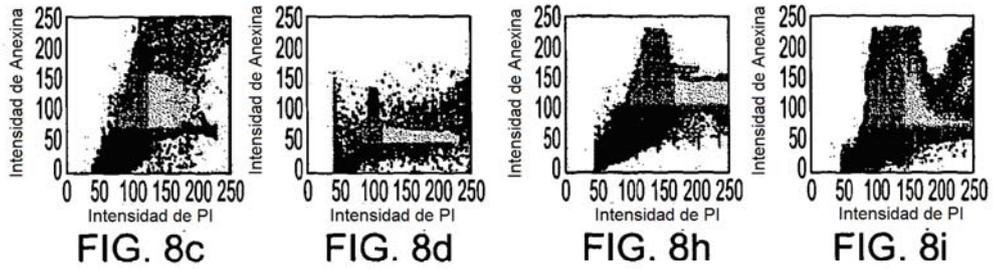
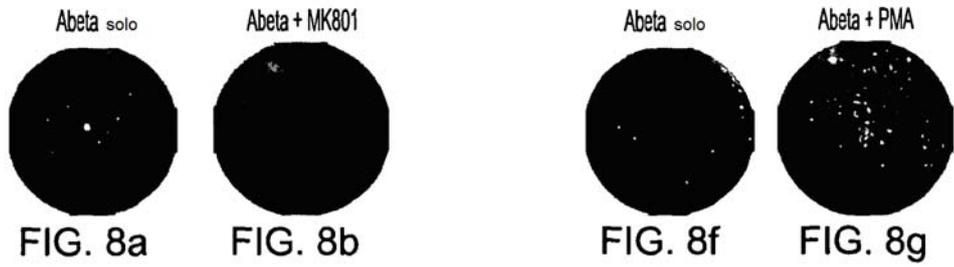
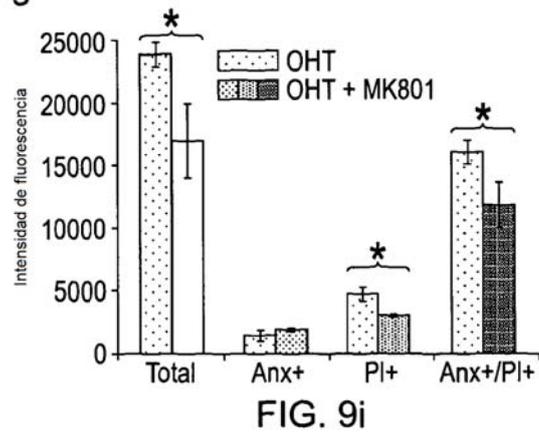
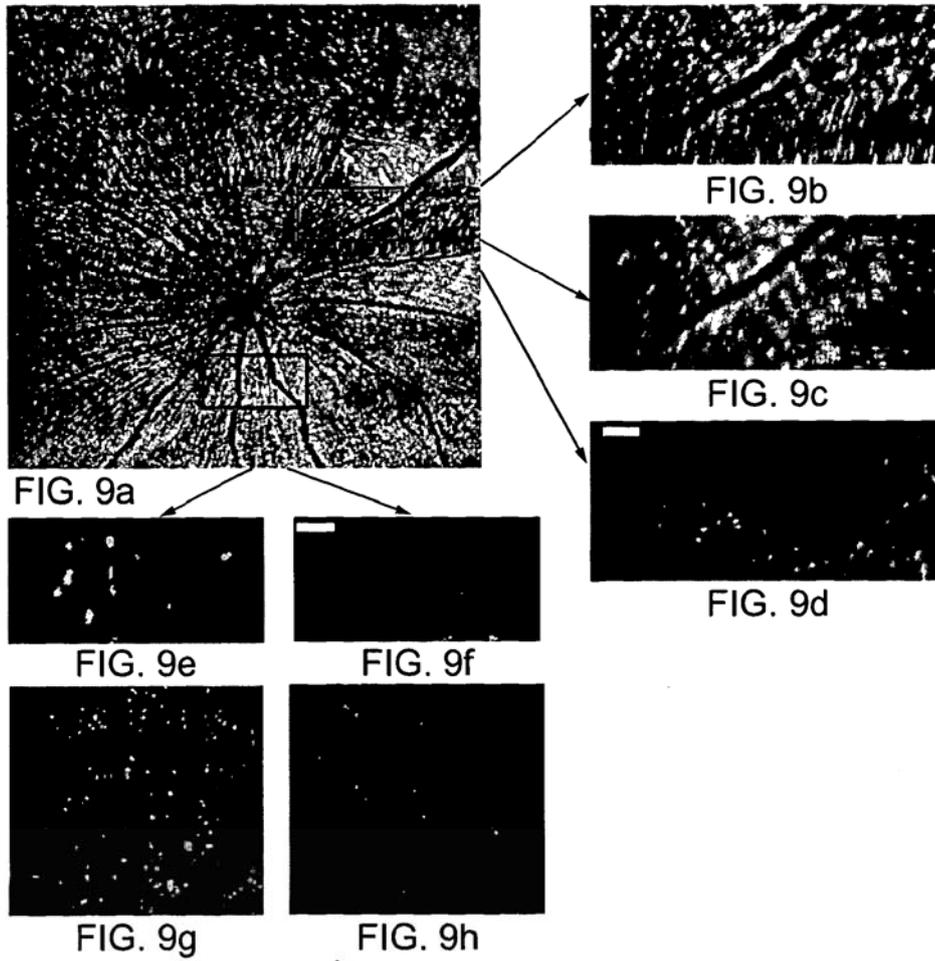


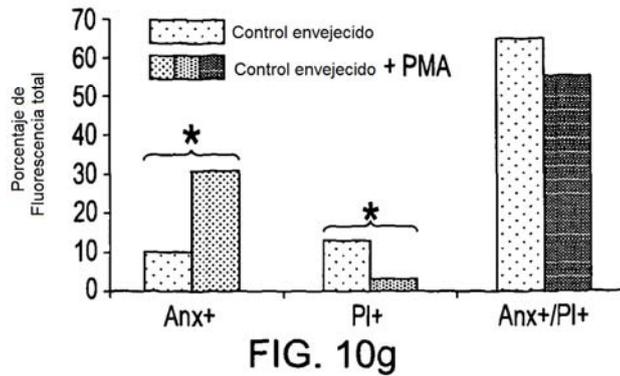
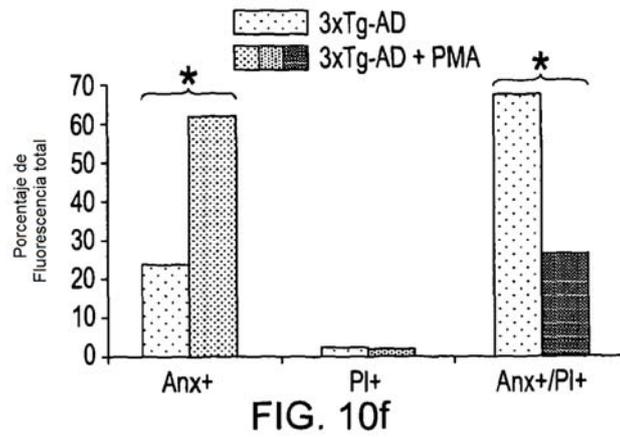
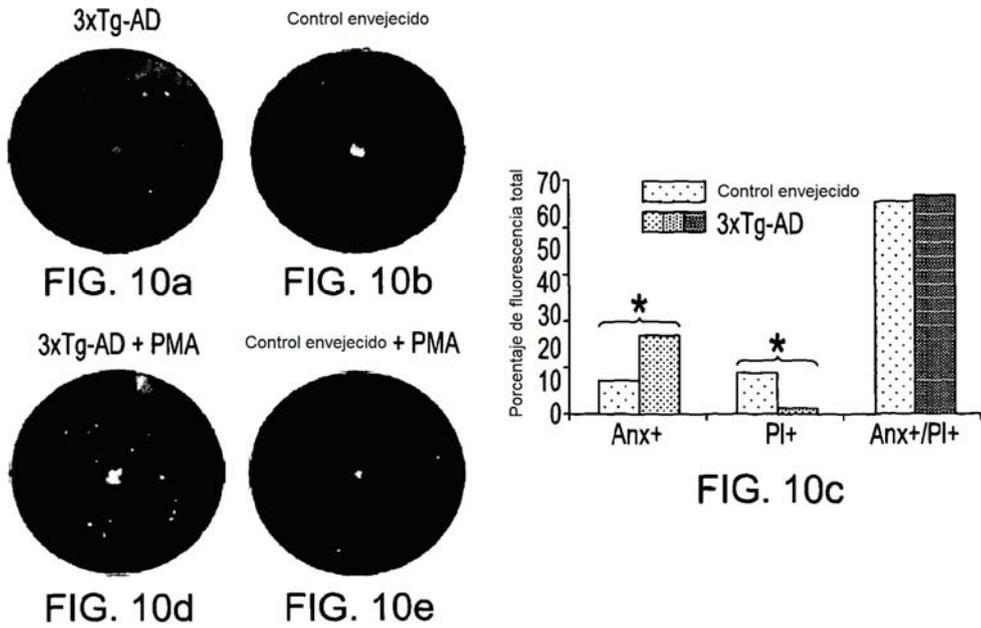
FIG. 4











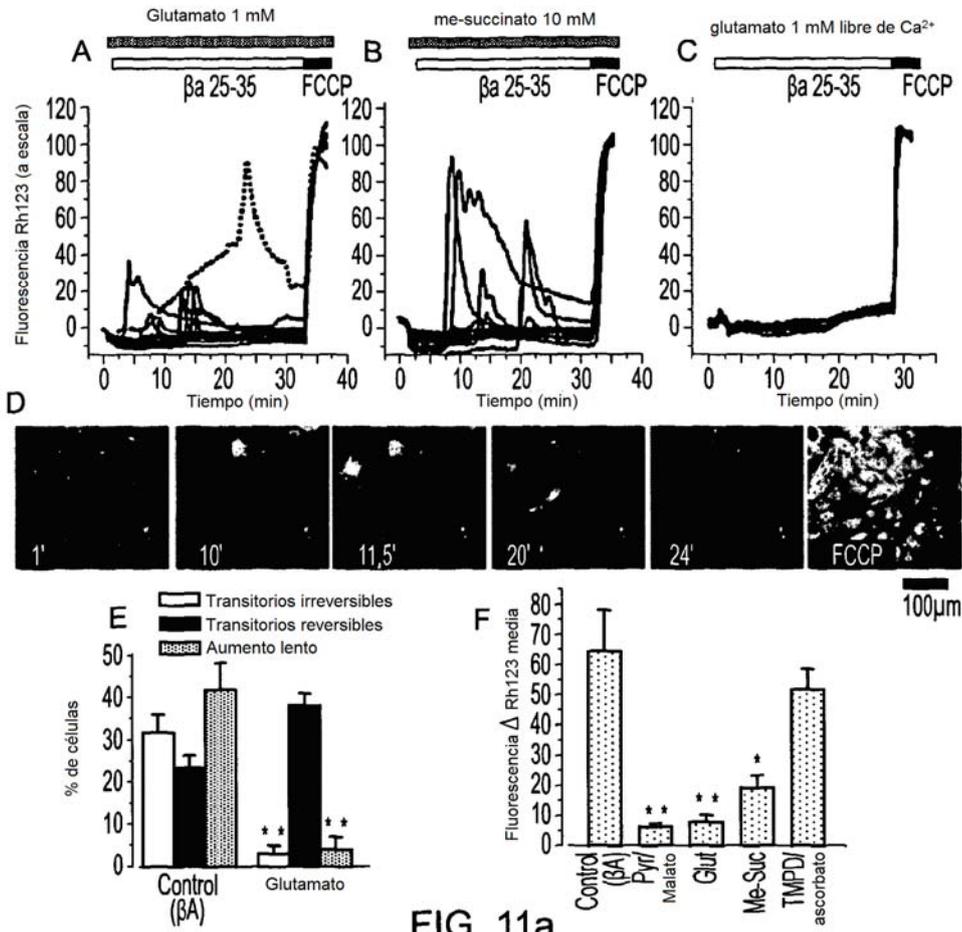


FIG. 11a

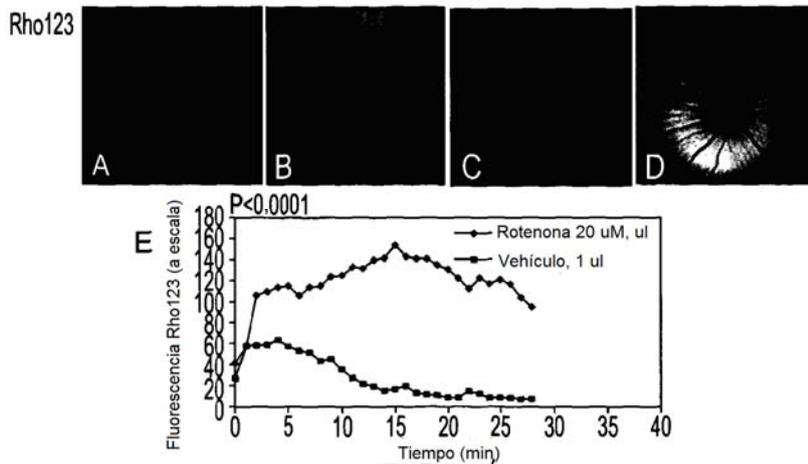


FIG. 11b

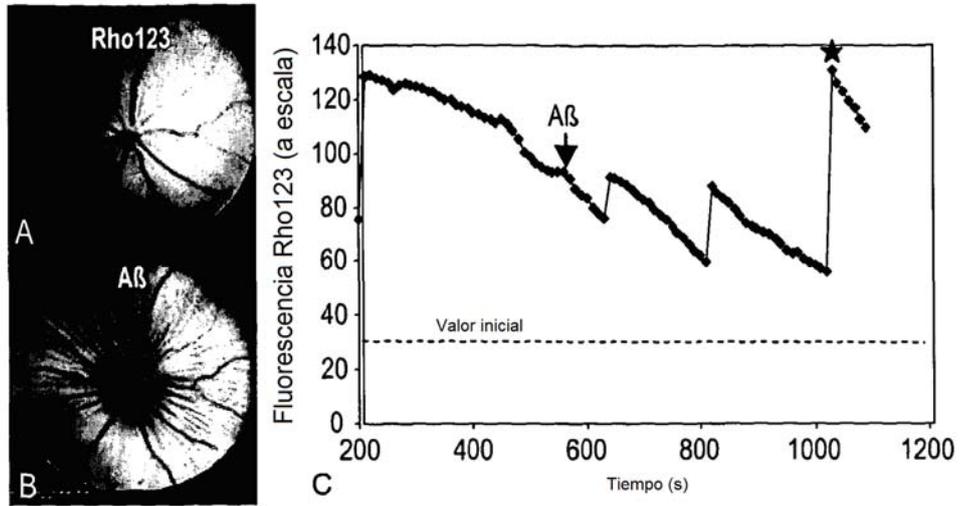


FIG. 11c

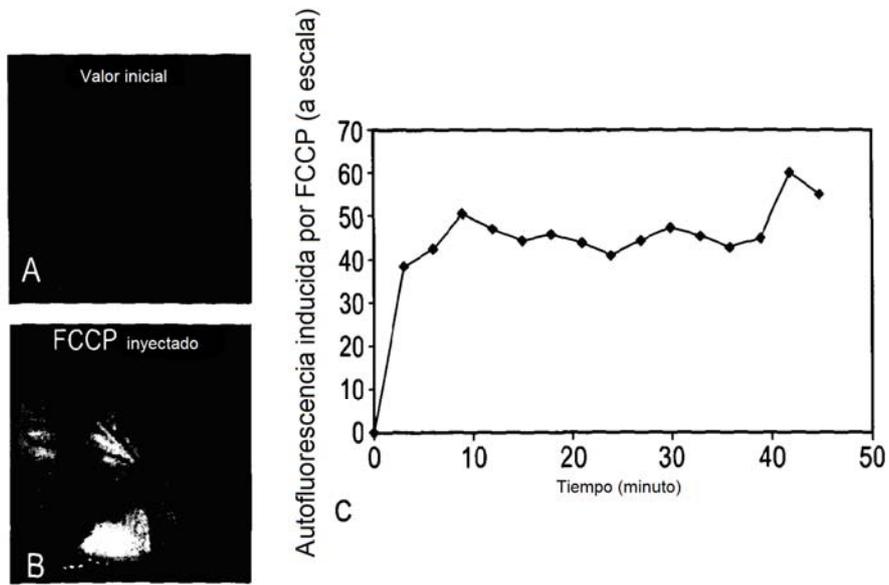


FIG. 11d

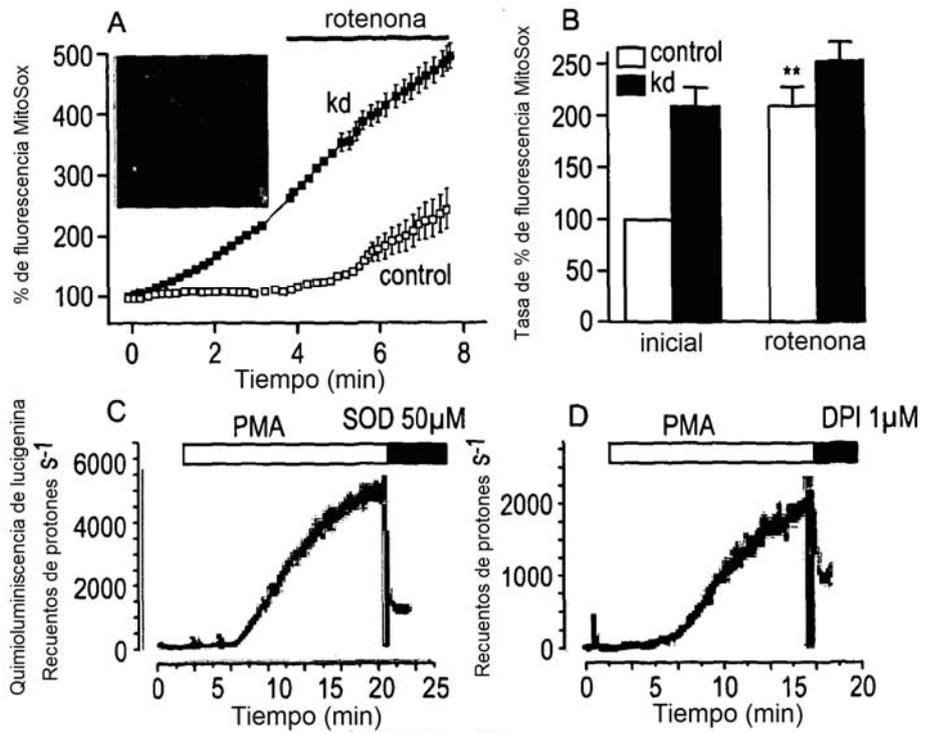


FIG. 12a

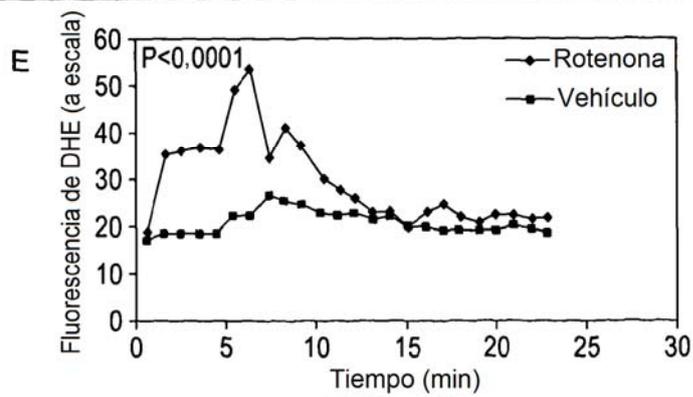


FIG. 12b

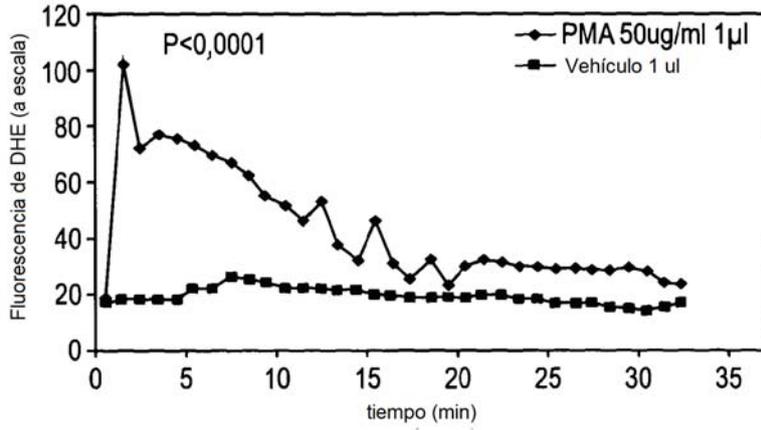
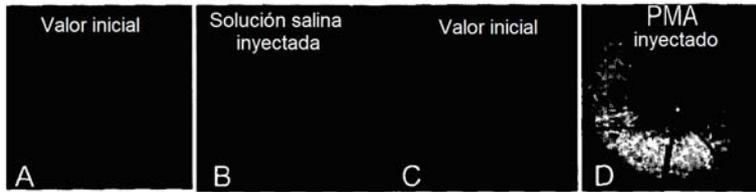


FIG. 12c

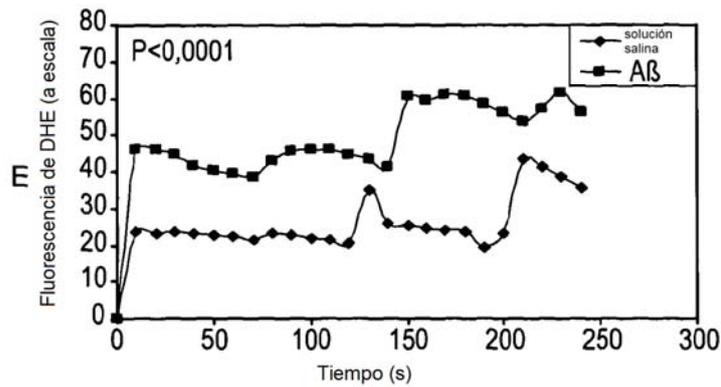
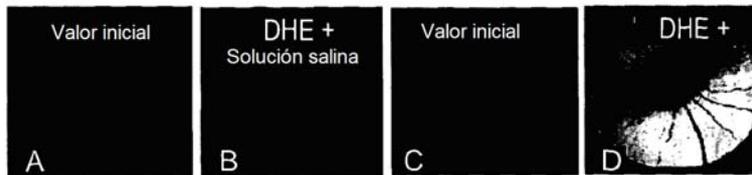


FIG. 12d

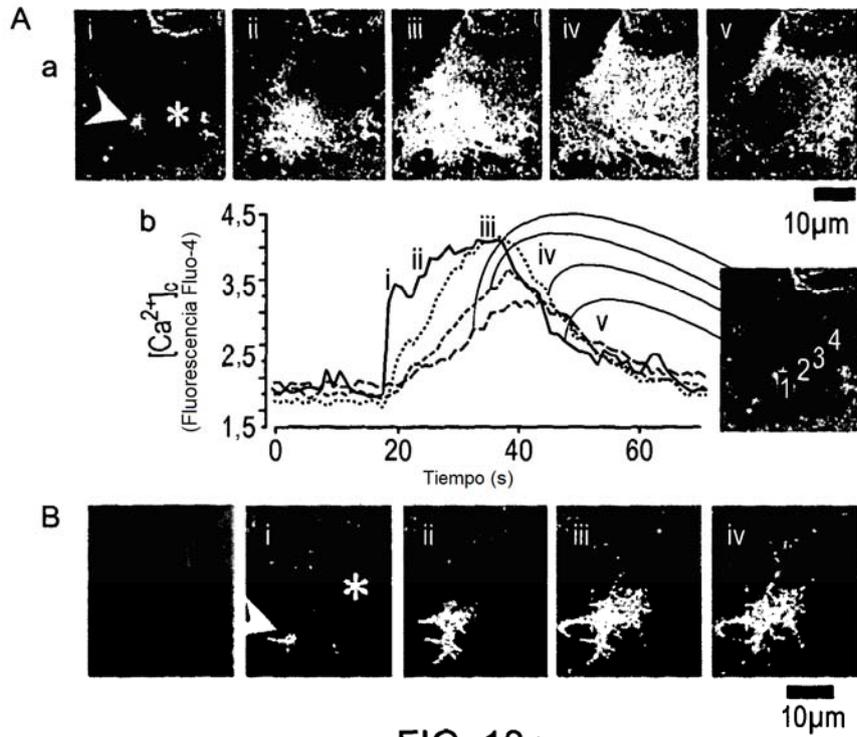


FIG. 13a

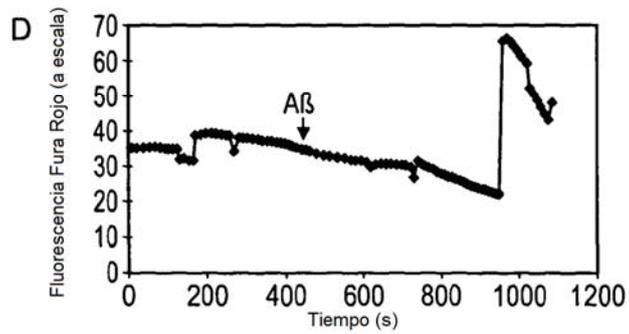


FIG. 13b

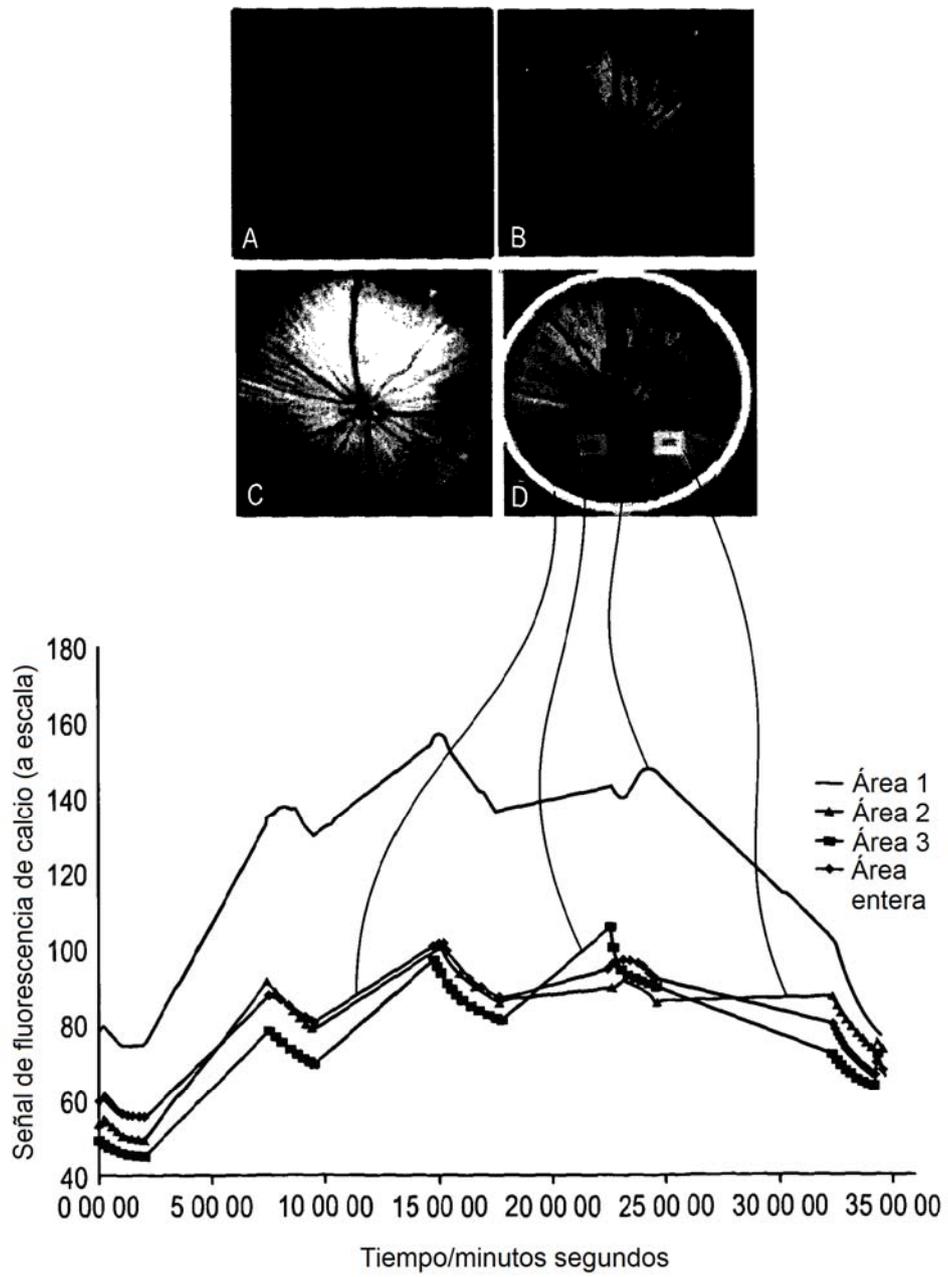


FIG. 13c

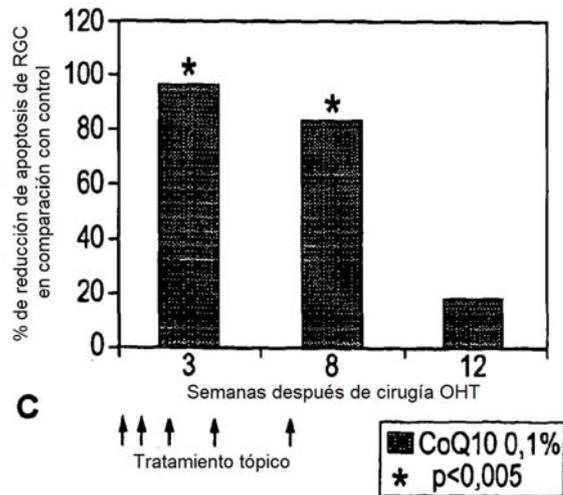
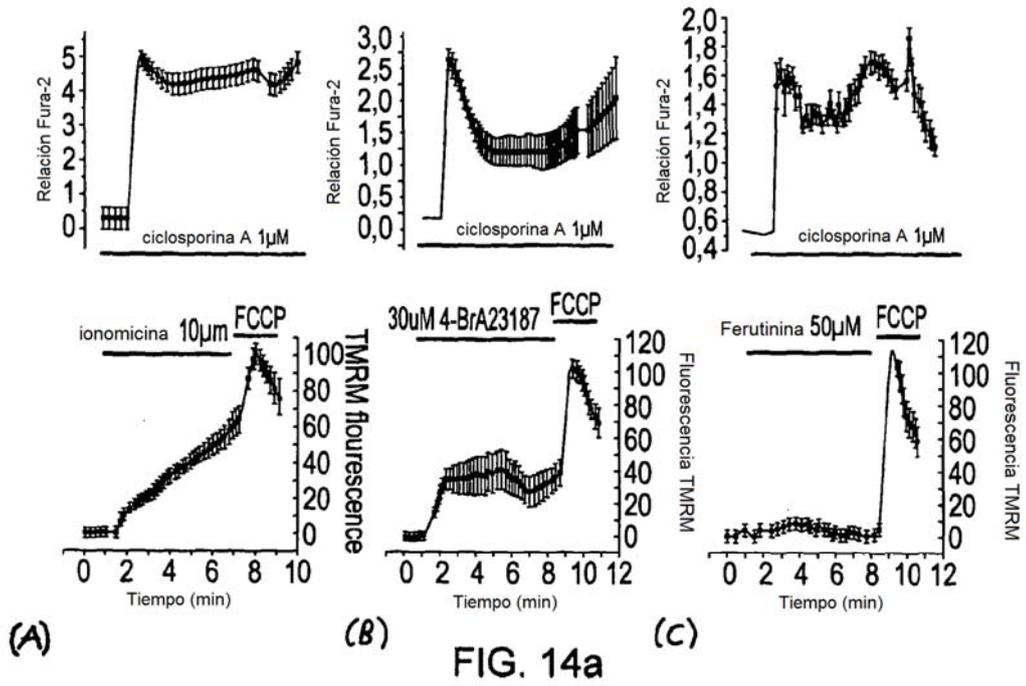


FIG. 14b

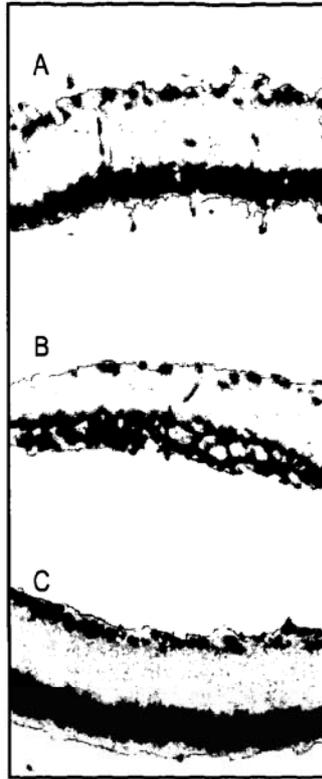


FIG. 14c

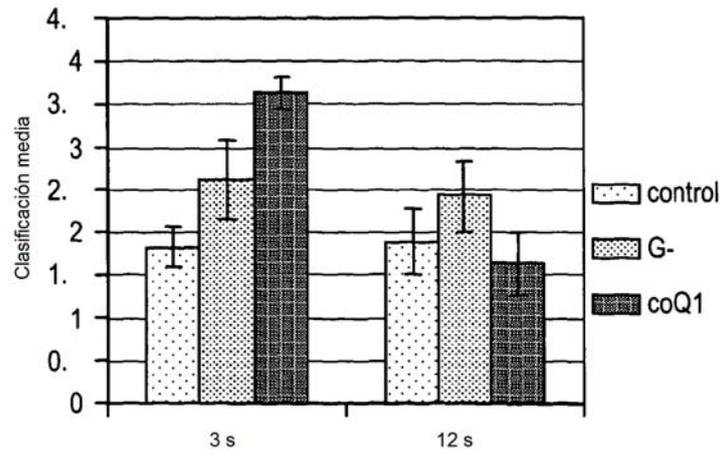


FIG. 14d

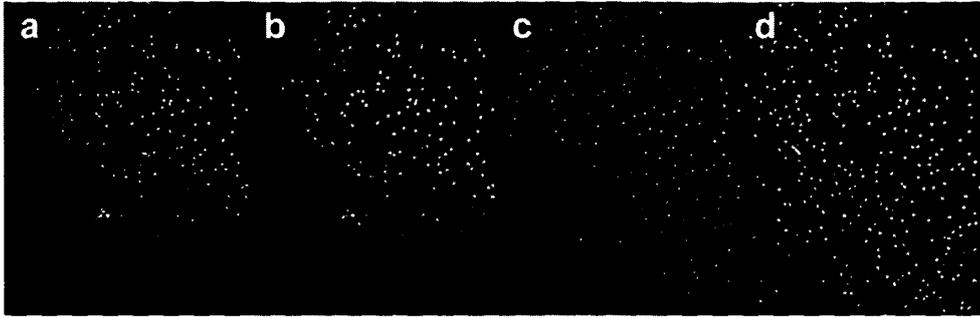


FIG. 15a

FIG. 15b

FIG. 15c

FIG. 15d

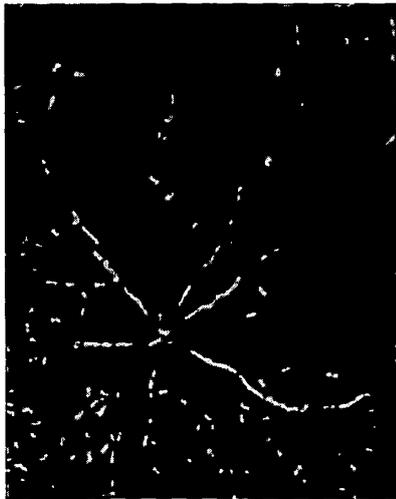


FIG. 15e

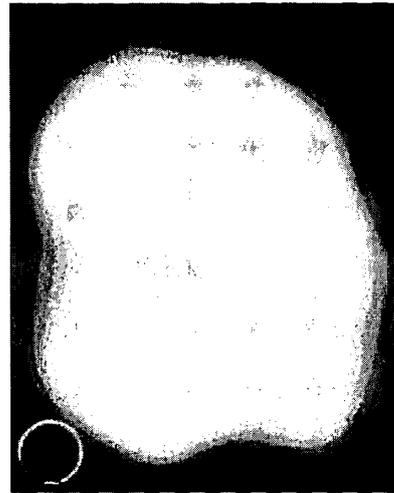


FIG. 15f