

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

“MECANISMOS DE DEGENERACIÓN  
RETINAL PRODUCIDOS POR EXPOSICIÓN  
CONSTANTE A LUZ DE BAJA  
INTENSIDAD”

Bióloga María Mercedes Benedetto

Directora

Doctora María Ana Contín

**Directora de tesis**

Prof. Dra. María Ana Contín

**Comisión de tesis**

Prof. Dra. Miriam B. Virgolini

Prof. Dra. María C. Sánchez

Prof. Dr. Mario E. Guido

**Evaluador externo**

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1.1 Organización Estructural de la Retina .....</b>	<b>- 6 -</b>
1.1.1 Retina Neural.....	- 7 -
1.1.2 Epitelio Pigmentario.....	- 9 -
<b>1.2 Fotorreceptores, Fotopigmentos y Mecanismo de Fototransducción .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.2.1 Fotorreceptores y Fotopigmentos .....	- 10 -
1.2.3 Fotorreceptores no visuales .....	- 17 -
<b>1.3 Degeneración Retinal.....</b>	<b>- 18 -</b>
1.3.1 Degeneración Retinal por Exposición a Luz .....	- 18 -
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>- 24 -</b>
1.4.1 Objetivo General.....	- 24 -
1.4.2 Objetivos Específicos .....	- 24 -
<b>CAPITULO II- MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>2.1 Animales .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>2.2 Daño Retinal por Luz .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>2.3 Diseño Experimental .....</b>	<b>- 27 -</b>
2.3.1 Grupos Control .....	- 27 -
2.3.2 Grupos con Degeneración Retinal.....	- 27 -
<b>2.4 Inmunohistoquímica (IHQ) .....</b>	<b>- 28 -</b>
2.4.1 Extracción del tejido.....	- 29 -
2.4.2 Fijación y Crioprotección .....	- 29 -
2.4.3 Obtención de Criosecciones Retinales.....	- 29 -

2.4.4 Inmunotinción.....	- 29 -
2.4.5 Microscopia Confocal.....	- 30 -
2.4.6 Inmunohistoquímica para Gránulos de Estrés .....	- 30 -
2.4.7 Cuantificación del Número de Núcleos en Capas Retinales.....	- 31 -
2.4.8 Flat Mounts de Retina.....	- 31 -
<b>2.5 Determinación de la Fragmentación del ADN .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>2.6 Electroretinografías .....</b>	<b>- 32 -</b>
2.6.1 Preparación de los animales .....	- 32 -
2.6.2 Registro de las señales .....	- 33 -
2.6.3 Protocolo de descanso .....	- 34 -
<b>2.7 Identificación de Proteínas por Western Blot .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>2.8 Extracción de ARN.....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>2.9 Tratamiento con DNasa.....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>2.10 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....</b>	<b>- 38 -</b>
2.10.1 Transcripción Reversa .....	- 38 -
2.10.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	- 39 -
<b>2.11 Determinación de la formación de Especies Reactivas del Oxígeno Intracelulares ...</b>	<b>- 40 -</b>
<b>2.12 Actividad Enzimática de Catalasa .....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>2.13 Extracción de Ácidos Grasos de Retina Total y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....</b>	<b>- 43 -</b>
2.13.1 Obtención de Esteres Metílicos de Ácidos Grasos .....	- 43 -
2.13.2 Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas.....	- 44 -
2.13.3 Identificación y Cuantificación.....	- 45 -
<b>2.14 Obtención y Caracterización de Cultivos Primarios de Células Ganglionares de ratas.....</b>	<b>- 46 -</b>
-	
2.14.1 Obtención .....	- 46 -
2.14.2 Caracterización .....	- 46 -

2.16 Análisis Estadístico .....	- 47 -
<b>CAPÍTULO III- RESULTADOS.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>3.1 Estudio de los efectos de la exposición constante a luces LED en ratas albinas Wistar - Caracterización del modelo de DR.....</b>	<b>- 50 -</b>
3.1.1 Determinación del Número de Núcleos de la Capa Nuclear Externa.....	- 50 -
3.1.2 Determinación del Número de Núcleos de la Capa de Células Ganglionares.....	- 53 -
<b>3.2 Estudio de la funcionalidad de la retina de animales expuesto a diferentes días de luz constante.....</b>	<b>- 56 -</b>
3.2.1 Protocolo de Descanso.....	- 61 -
<b>3.3 Estudio de los efectos del modelo de DR sobre diferentes tipos de Opsinas.....</b>	<b>- 62 -</b>
3.3.1 Análisis de Rodopsina .....	- 62 -
3.3.2 Análisis de Melanopsina (OPN4).....	- 65 -
3.3.3 Análisis de Neuropsina (OPN5) .....	- 66 -
<b>3.4 Caracterización del Mecanismo de Muerte Celular .....</b>	<b>- 70 -</b>
3.4.1 Análisis de Expresión de Caspasa 3 .....	- 70 -
3.4.1 Determinación de la actividad enzimática de Caspasa 3 .....	- 71 -
<b>3.5 Estudio del Estado Redox en retinas de animales expuestos a luz constante .....</b>	<b>- 72 -</b>
3.5.1 Determinación de los niveles de Especies Reactivas del Oxígeno .....	- 73 -
3.5.2 Estudio de la Actividad de la Enzima Antioxidante Catalasa .....	- 73 -
3.5.3. Estudio de la Formación de Gránulos de Estrés en retina .....	- 75 -
<b>3.6 Identificación y Cuantificación de Ácidos Grasos presentes en retinas de animales.... expuestos a luz constante.....</b>	<b>- 78 -</b>
3.6.1. Identificación .....	- 79 -
3.6.2. Cuantificación.....	- 80 -
<b>CAPÍTULO IV- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>4.1 Discusión.....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>4.2 Conclusiones Finales.....</b>	<b>- 92 -</b>

<b>CAPÍTULO V-ANEXOS</b> .....	<b>- 95 -</b>
A.1 Caracterización de los Mecanismos de Muerte Celular. Resultados Preliminares .....	- 95 -
A.1.1 Perfil de Expresión de ARNm de Proteínas Proapoptóticas (Caspasa-8 y Bax) .....	- 95 -
A.1.2 Perfil de Expresión de ARNm de la Proteína Antiapoptótica Bcl2 .....	- 97 -
A.1.3 Perfil de Expresión de ARNm de Proteínas involucradas en el mecanismo de Necroptosis (RIPK1 y RIPK3).....	- 99 -
A.2 Obtención y Caracterización de Cultivos Primarios de Células Ganglionares de Retinas de ratas .....	- 101 -
<b>CAPÍTULO VI-BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>- 104 -</b>

## RESUMEN

La retina de vertebrados es un circuito neuronal complejo responsable de transducir la luz en un patrón de impulsos eléctricos hacia el cerebro. Este tejido cumple dos funciones principales, las funciones visuales a través de los fotorreceptores clásicos conos y bastones, y las funciones no visuales a través de una población de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles. Cualquier proceso patológico que provoca la muerte de células retinales induciendo la pérdida de estructura y/o función del tejido se conoce como Degeneración Retinal. Existen factores que modifican la velocidad de los mecanismos de degeneración, entre los que se encuentran la duración, la intensidad y la historia de exposición a la luz. Debido a esto, el daño retinal por exposición a luz es empleado como modelo para el estudio de algunas degeneraciones retinales humanas que surgen a causa de injurias ambientales, envejecimiento o desordenes genéticos. Se ha demostrado que el tipo de fuente de iluminación (fluorescente, incandescente o LED) afecta de manera diferencial a la retina, siendo la más nociva la de mayor energía que dentro del espectro visible corresponde a la luz azul. Las luces LED emiten niveles más altos de luz azul a la retina que las fuentes de luz domésticas convencionales.

En función de estos antecedentes, en este trabajo de tesis se caracterizaron los mecanismos de degeneración retinal desencadenados en retinas de ratas albinas Wistar como consecuencia de la exposición constante a luz blanca LED de baja intensidad. Los resultados encontrados demuestran que los eventos generales promovidos por la exposición a luz inducen una remodelación profunda de la retina, afectando la funcionalidad de este tejido y produciendo muerte de fotorreceptores clásicos. Además, se produce un desbalance del estado redox celular, variación en la composición de ácidos grasos y modificaciones en la fosforilación de Rodopsina, como consecuencia de la exposición a luz. Por otro lado, si bien las células ganglionares y de la capa nuclear interna no presentan mecanismo de muerte celular inmediata, se produce un remodelado a nivel de la retina interna lo que podría indicar cambios en la funcionalidad de las mismas repercutiendo en la sincronización de los ritmos circadianos. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten considerar al modelo propuesto como una herramienta útil para estudiar y dilucidar los eventos de degeneración retinal desencadenados como consecuencia de la exposición constante a luces LED de baja intensidad.

# **ABSTRACT**

The vertebrate retina is a complex neuronal circuit responsible for transducing light in a pattern of electrical impulses to the brain. This tissue fulfils two main functions, visual functions through the classic photoreceptors cones and rods and non-visual functions through a population of intrinsically photosensitive ganglion cells. Any pathological process that causes the death of retinal cells inducing the loss of tissue structure and / or function is known as Retinal Degeneration. There are factors that modify the speed of the mechanisms of degeneration, among which are the duration, intensity and history of light exposure. Due to this, light induced retinal degeneration is used as a model for the study of some human retinal degenerations that arise due to environmental injuries, aging or genetic disorders. It has been shown that the type of illumination source (fluorescent, incandescent or LED) differentially affects the retina, being the most harmful the blue light. In this sense, LED lights emit higher levels of blue light to the retina than conventional domestic light sources.

Based on this background, here we characterized the mechanisms of retinal degeneration triggered as a consequence of the constant exposure to low intensity LED white light. The results show that the general events promoted by exposure to light induce a deep retinal remodelling of the retina, affecting the functionality of this tissue and producing death of classical photoreceptors. In addition, there is an imbalance of the cellular redox state, variation in the fatty acid composition and modifications in the phosphorylation of Rhodopsin, as a consequence of exposure to light. On the other hand, although the ganglion cells and the inner nuclear layer do not present a mechanism of cell death, a remodelling occurs at the level of the inner retina, which could indicate changes in the functionality of the same, rebounding in the synchronization of the circadian rhythms.

Overall, the results obtained allow us to consider the proposed model as a useful tool to study and elucidate the events of retinal degeneration triggered as a result of constant exposure to low intensity LED lights.

# ABREVIATURAS

- °C: Grados Centígrados
- **µm**: Micrómetro
- **µV**: Microvoltios
- **APS**: Persulfato de amonio
- **Arr**: Arrestina
- **CAT**: Catalasa
- **CC**: Cilio de Conexión
- **CCG**: Capa de Células Ganglionares
- **CG**: Células Ganglionares
- **CNE**: Capa Nuclear Externa
- **CNI**: Capa Nuclear Interna
- **CPE**: Capa Plexiforme Externa
- **CPI**: Capa Plexiforme Interna
- **DHA**: Ácido Docosahexaenoico
- **DMRE**: Degeneración Macular Relacionada con la Edad
- **DO**: Densidad Óptica
- **DR**: Degeneración Retinal
- **EP**: Epitelio Pigmentario
- **GABA**: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- **GC**: Guanilato Ciclasa
- **GDP**: Guanosín Difosfato
- **Glu**: Glutamato
- **GMPc**: Guanosín Monofosfato Cíclico
- **GPCR**: Receptores acoplados a Proteína G
- **GTP**: Guanosín Trifosfato
- **IHQ**: Inmunohistoquímica
- **IP**: Ioduro de Propidio
- **ipRGCs**: Células Ganglionares Intrínsecamente Fotosensibles
- **K**: Lisina
- **kDa**: Kilodalton
- **LCPUFA**: Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
- **LED**: Light Emitting Diode
- **MGCs**: Células Gliales de Müller
- **MII**: Metarodopsina II
- **ms**: Milisegundos
- **NO**: Nervio Óptico

- **NTC:** Control sin Templado
- **ON:** Over Night
- **OPN3:** Encefalopsina
- **OPN4:** Melanopsina
- **OPN5:** Neuropsina
- **PAGC:** Proteína Activadora de Guanilato Ciclasa
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PDE:** Fosfodiesterasa
- **PKC:** Proteína Kinasa C
- **PUFAs:** Ácidos Grasos Poliinsaturados
- **RHIM:** Motivo de Interacción Homotípica RIP
- **RIP:** Receptor Interacting Proteins
- **RK:** Rodopsina Kinasa
- **ROS:** Especies Reactivas del Oxígeno
- **RP:** Retinitis Pigmentosa
- **SE:** Segmento Externo
- **Ser:** Serina
- **SG:** Gránulos de Estrés
- **SI:** Segmento Interno
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **T°:** Temperatura
- **Tbp:** Tata Binding Protein
- **TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labelling.
- **ZT:** Zeitgeber Time

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

# CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## 1.1 Organización Estructural de la Retina

El sistema nervioso central (SNC) recibe información, la cual debe ser procesada y transmitida exitosamente. Esquemáticamente se puede pensar en diferentes organizaciones estructurales que comprenden en primer lugar a los receptores (neuronas sensoriales) que reciben la información y la transmiten al hacer contacto (sinapsis) con otras células (organización 2) y éstas últimas con otro grupo de células secundarias (organización 3) y así sucesivamente, formando una estructura de células interconectadas que llevan la información hasta un grupo de células efectoras que la reciben y son capaces de producir una respuesta. El sistema visual es un claro ejemplo de este esquema; siendo la retina la parte encargada de recibir la información lumínica (luz), la cual llega a las células sensoriales (fotorreceptores), en donde la organización 2 está contenida en otras células de la retina (interneuronas) que envían la información a la tercera organización, las células ganglionares (CG), las cuales a través del nervio óptico (NO) envían la información a la siguiente organización. En el quiasma óptico todas las fibras del NO se entrecruzan total o parcialmente al lado contrario, donde se unen a las fibras que proceden de la retina temporal para formar las llamadas “cintillas ópticas”. Las fibras de esta última hacen sinapsis con la siguiente organización ubicada en el cerebro, llamada cuerpo geniculado lateral (cuarta organización) cuyas fibras geniculocalcarinas van, por medio de la radiación óptica, hacia la corteza visual primaria (organización cinco) en el área calcarina del lóbulo occipital<sup>1</sup>.

Cicero (106–43 AC) fue el primero en declarar “*ut imago est animi voltus sic indices oculi*”, es decir, el rostro es una imagen de la mente, siendo los ojos su intérprete<sup>2</sup>. La retina de vertebrados es responsable de detectar, preprocesar y enviar la información visual hacia el cerebro<sup>3</sup>. Durante el desarrollo embrionario, tanto la retina como el nervio óptico se extienden desde el diencéfalo y, por lo tanto, se consideran parte del SNC. Como una extensión del mismo, la retina muestra similitudes con el cerebro y la médula espinal en términos de anatomía, funcionalidad, respuesta a insultos e inmunología<sup>2</sup>.

La retina de vertebrados es una estructura en capas que está altamente organizada a nivel celular y tisular y presenta una distribución aleatoria “tipo mosaico” de células del mismo

tipo; fenómeno conocido como laminación retinal<sup>3</sup>; el cual es un sello distintivo del tejido retinal a lo largo de las diferentes especies de vertebrados.

Este tejido está compuesto por una gran variedad de células que forman circuitos morfológica y funcionalmente distintos los cuales funcionan de forma paralela y combinada, para producir una salida visual compleja. La organización básica de la retina se conserva a través de los vertebrados, y está conformada por seis clases principales de neuronas (retina neural), el Epitelio Pigmentario (EP) y las células gliales de Müller (MGCs) que junto a los astrocitos y la vasculatura retinal, brindan soporte metabólico y homeostático al tejido<sup>4</sup>.

### **1.1.1 Retina Neural**

La retina neural está compuesta por seis tipos principales de neuronas; los fotorreceptores clásicos y las células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares.

Los cuerpos celulares de estas neuronas se encuentran en las denominadas capas nucleares, mientras que los procesos y contactos sinápticos en las llamadas capas plexiformes. Por lo tanto, desde el EP hacia el interior del ojo, la retina se encuentra segmentada en una capa nuclear externa (CNE), la cual consta de los cuerpos celulares de los fotorreceptores clásicos, una capa nuclear interna (CNI) la cual contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas y una capa celular ganglionar (CCG) la cual contiene células amácrinas desplazadas y células ganglionares. Estas tres capas celulares están separadas por la capa plexiforme externa (CPE) que se sitúa entre la CNE y CNI, la cual es el sitio de sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares, interplexiformes y horizontales y la capa plexiforme interna (CPI) ubicada entre CNI y la CCG, la cual es el sitio de sinapsis de las células bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares<sup>1</sup> (Figura 1).

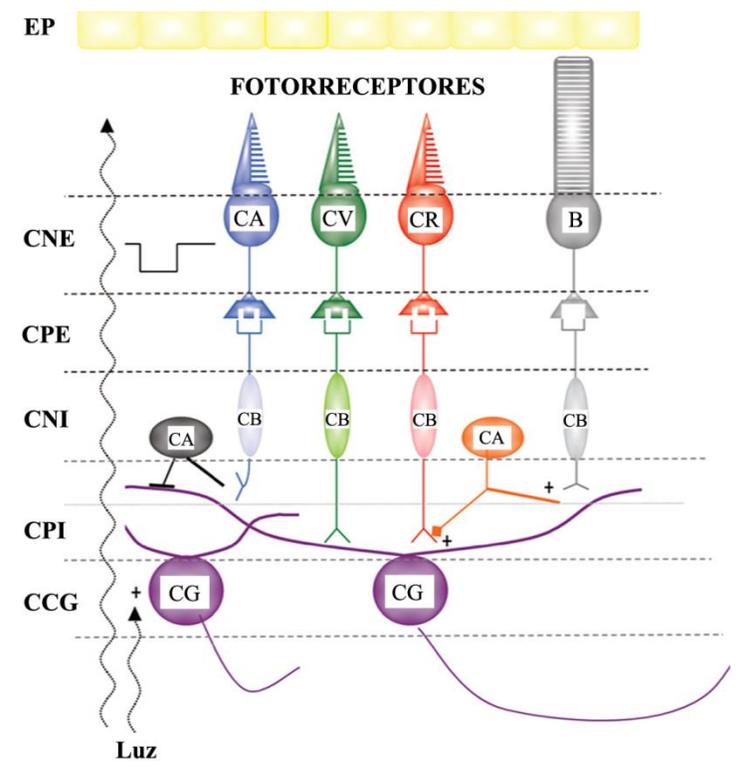
Los fotorreceptores clásicos pueden clasificarse ampliamente en bastones y conos, y son los encargados de realizar el proceso de fototransducción, donde la luz (fotones) se transforma en una señal nerviosa que se envía al cerebro a través del nervio óptico para su integración e interpretación<sup>5</sup>. Los bastones presentan una gran sensibilidad a la luz, pudiendo detectar incluso un único fotón incidente. Estos fotorreceptores son responsables de la visión nocturna (escotópica), contribuyendo a la visión solo en condiciones bastante

restringidas, luego de un período prolongado (a menudo decenas de minutos) a niveles de luz tenue, presentando una agudeza espacial y una velocidad de respuesta bajas<sup>6</sup>. Los conos son 100 veces menos sensibles que los bastones, pero muestran una agudeza espacial y una cinética de respuesta mucho más rápida durante la fototransducción. Además, cada tipo de cono es más sensible a una longitud de onda específica, por lo que son responsables de la visión en colores (fotópica). En los fotorreceptores de vertebrados, un fotón absorbido desencadena una cascada de señalización intracelular que hiperpolariza la membrana y retarda temporalmente la liberación continua de vesículas llenas de Glutamato (Glu) desde los terminales presinápticos de los fotorreceptores. La señal evocada por la luz en los fotorreceptores es receptada por una población de neuronas postsinápticas denominadas células bipolares; algunas de las cuales expresan receptores ionotrópicos glutamatergicos, los cuales son despolarizados por la liberación continua de este neurotransmisor en la oscuridad<sup>7</sup>.

Las células horizontales son interneuronas GABAérgicas que reciben información de conos y bastones, modulando la salida de la información de los mismos. Estas cumplen varios roles en el procesamiento visual temprano, contribuyendo a la mejora del contraste, la oposición del color y la generación de campos receptivos de centro-periferia en conos y células bipolares<sup>8</sup>. Otra población de interneuronas de la retina está compuesta por células amacrinas<sup>9</sup>. La mayor parte de estas, son neuronas sin axones y su falta de polaridad definida hace que sea difícil reconocer los sitios de entrada y salida de los estímulos. Estas neuronas presentan una gran diversidad estructural ya que se retroalimentan con las células bipolares de las que reciben un impulso, hacen sinapsis con las CG y, además, hacen sinapsis entre sí<sup>10</sup>. Finalmente, la población de CG, está formada por neuronas que reciben la información visual que recibe el ojo y la envían hacia el cerebro, donde será procesada<sup>11</sup>. Además, las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs, de sus siglas en Inglés), un subconjunto de CG que proyectan al núcleo supraquiasmático en el hipotálamo y otras áreas no visuales, cumplen funciones en las llamadas tareas no formadoras de imágenes<sup>12,13,14</sup>.

### 1.1.2 Epitelio Pigmentario

El EP es una monocapa de células pigmentadas de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espesor que aparece en la parte externa de la retina. Las células del EP contienen un pigmento denominado Melanina el cual absorbe luz impidiendo su reflexión por todo el globo ocular. El EP cumple otras funciones importantes tales como la de almacenar grandes cantidades de vitamina A, a partir de la cual se forma el componente no proteico (retinal) de los cuatro tipos de pigmentos visuales que existen en los fotorreceptores del ojo humano. En este tejido se produce también la regeneración de dichos retinales lo que constituye un paso importante para el desarrollo de la sensibilidad y adaptación a la luz. Además, las células del EP eliminan los residuos de los SE a través de la fagocitosis diaria de sus extremos<sup>15</sup>.



**Figura 1** | Esquema ilustrativo de un corte transversal de retina de primate mostrando el circuito retiniano estructurado en capas. EP: Epitelio Pigmentario, CNE: Capa Nuclear Externa, CPE: Capa Plexiforme Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CPI: Capa Plexiforme Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares. Adaptada de Benarroch y col., 2011<sup>16</sup>.

## **1.2 Fotorreceptores, Fotopigmentos y Mecanismo de Fototransducción**

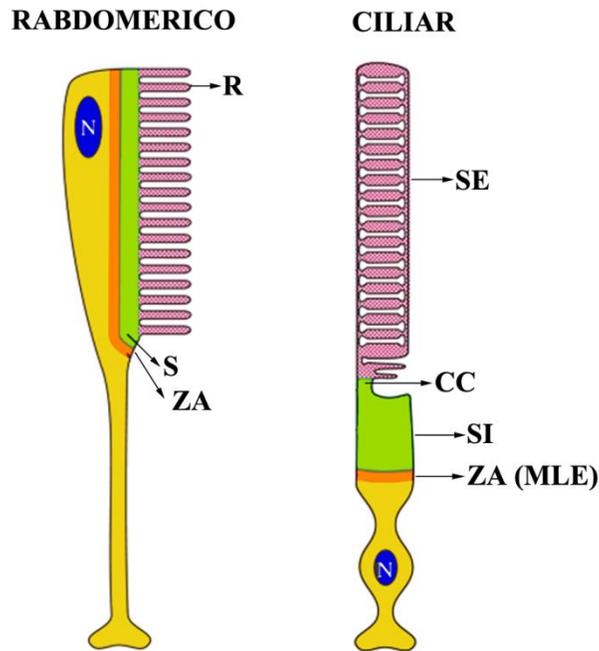
### **1.2.1 Fotorreceptores y Fotopigmentos**

Los fotorreceptores son neuronas polarizadas, con compartimentalización subcelular específica y estructuras para la síntesis y el tráfico de proteínas, responsables de generar una señal en respuesta a un estímulo lumínico. Cada fotorreceptor contiene un segmento externo (SE) que aloja la maquinaria de fototransducción, un segmento interno (SI) donde se sintetizan las proteínas y un terminal sináptico para la transmisión de señales. Los SE e internos están unidos por un cilio de conexión (CC), correspondiente a la zona de transición de los cilios primarios<sup>17</sup>.

Es ampliamente conocido que las células fotorreceptoras se dividen en dos tipos principales; fotorreceptores rabdoméricos presentes en los ojos de invertebrados (protostomados) y fotorreceptores ciliares presentes en la retina de los vertebrados<sup>18</sup>. Estas células presentan una dicotomía estructural la cual parece ser bastante estricta y la distribución de ambos tipos celulares a lo largo de las especies no es al azar<sup>19</sup>. Los fotorreceptores rabdoméricos tienen especializaciones apicales (rabdomeros) en forma de lamela en donde se almacenan los fotopigmentos, mientras que en los fotorreceptores ciliares, los fotopigmentos son almacenados en plegamientos especializados de la membrana denominados túbulos<sup>20</sup> (Figura 2).

La capacidad fotorreceptora de estas células se debe a la presencia de receptores específicos, los fotopigmentos, los cuales están compuestos por una región proteica (opsina) y un cromóforo 3-hidroxi-11-cis-retinal (retinal derivado de proteína-A). Éste, en solución acuosa, absorbe a un máximo de longitud de onda de 440 nm ( $\lambda_{\max}$  440 nm), pero unido a una opsina tiene un mayor rango de absorción que va desde  $\lambda$  360-560 nm, fenómeno conocido como “ajuste espectral”.

Las opsinas son moléculas esenciales que median la capacidad de los animales para detectar y utilizar la luz para diversas funciones biológicas. Estas son miembros de la superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR, de sus siglas en inglés) las cuales son proteínas con siete hélices transmembrana que participan en un conjunto diverso de funciones de señalización (Figura 3).

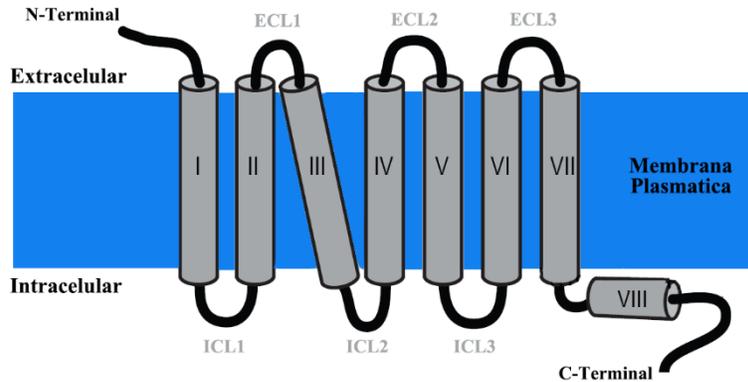


**Figura 2|** Morfología de Fotorreceptores Rabdomericos y Ciliares. R, rabadomero; s, tallo; ZA, zonula adherens; SE, segmento externo; CC, cilio de conexión; SI, segmento interno; MLE, membrana limitante externa; N, núcleo. Adaptada de Lamb y col., 2013<sup>18</sup>.

Dentro de la superfamilia de GPCR, las opsinas forman una gran subclase monofilética de proteínas que se caracterizan por la presencia de una lisina en la séptima hélice transmembrana que sirve como sitio de unión covalente a un cromoforo; lo que les confiere fotosensibilidad<sup>21</sup>.

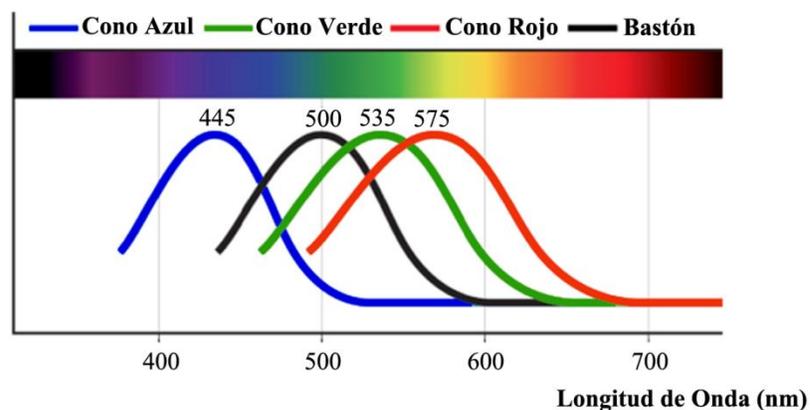
### 1.2.1.1 Fotorreceptores y Fotopigmentos en Vertebrados Superiores

En vertebrados superiores los fotorreceptores conos y bastones son del tipo ciliar y son células morfológica y funcionalmente diferentes. En el año 1886, Schultze y col., propusieron la teoría dual de la visión, la cual asegura que los bastones median la percepción de la luz a niveles tenues de iluminación mientras que los conos están especializados en la percepción a niveles de luz brillante y la visión del color<sup>22</sup>.



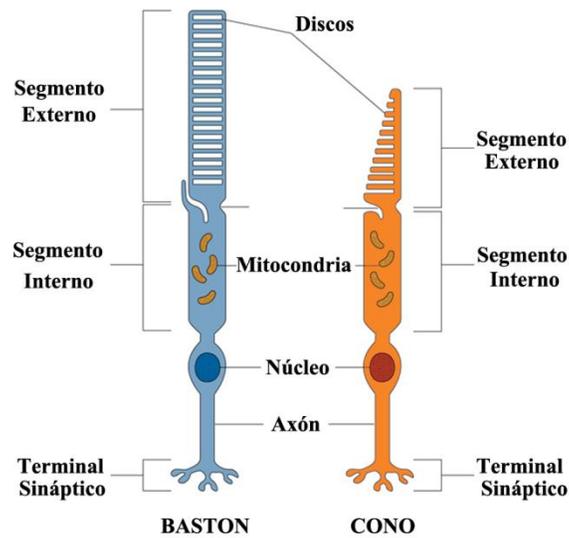
**Figura 3** | Esquema de la topología bidimensional de un GPCR. La misma consta de siete dominios helicoidales transmembrana (I a VII), un extremo N-terminal extracelular, tres bucles extracelulares (ECL) y tres bucles intracelulares (ICL) y un dominio helicoidal intracelular adicional (VIII) paralelo a la membrana seguido por el extremo C-terminal. Adaptada de Audet y col., 2018<sup>23</sup>.

Al ser morfológica y funcionalmente muy diferentes, los fotorreceptores proporcionan la capacidad de cubrir grandes amplitudes de intensidades lumínicas [(alrededor de 10 unidades logarítmicas de diferencia, (Figura 4)].



**Figura 4** | Espectro de absorción de los pigmentos visuales de conos y Rodopsina. La absorción máxima de los pigmentos visuales azul, verde y rojo es, 445, 535 y 575 nm respectivamente, mientras que la de la Rodopsina es de 500 nm. Adaptada de Salesse y col., 2017<sup>24</sup>.

El SE de los fotorreceptores es el sitio especializado para detectar la señal de un fotón y el SI contiene el núcleo y otras organelas necesarias para el metabolismo celular. Debido a su diferencia filogenética, conos y bastones presentan una morfología diferenciada en el SE; los bastones presentan discos de membrana rodeadas por una membrana plasmática mientras que, en conos, la membrana plasmática se invagina repetidamente para formar una estructura de laminillas estrechamente apiladas<sup>25</sup> (Figura 5).



**Figura 5|** Esquema ilustrativo de la morfología de Conos y Bastones.

Rodopsina es el receptor visual presente en los discos membranosos de los bastones la cual presenta un rango de absorción de  $\lambda_{\max}$  460-530 (Figura 6). El mismo está compuesto por una proteína (opsina) de aproximadamente 40 kDa covalentemente unida al cromóforo 11-cis retinal<sup>25</sup>. Rodopsina pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y presenta una estructura formada por siete dominios transmembrana (H1 a H7) con un residuo de lisina (K-296) en el dominio H7, sitio de unión covalente al cromóforo. Además, presenta residuos serinas y treoninas en el carboxilo terminal, los cuales son fosforilados de manera dependiente de la luz.



### 1.2.2.1 Activación

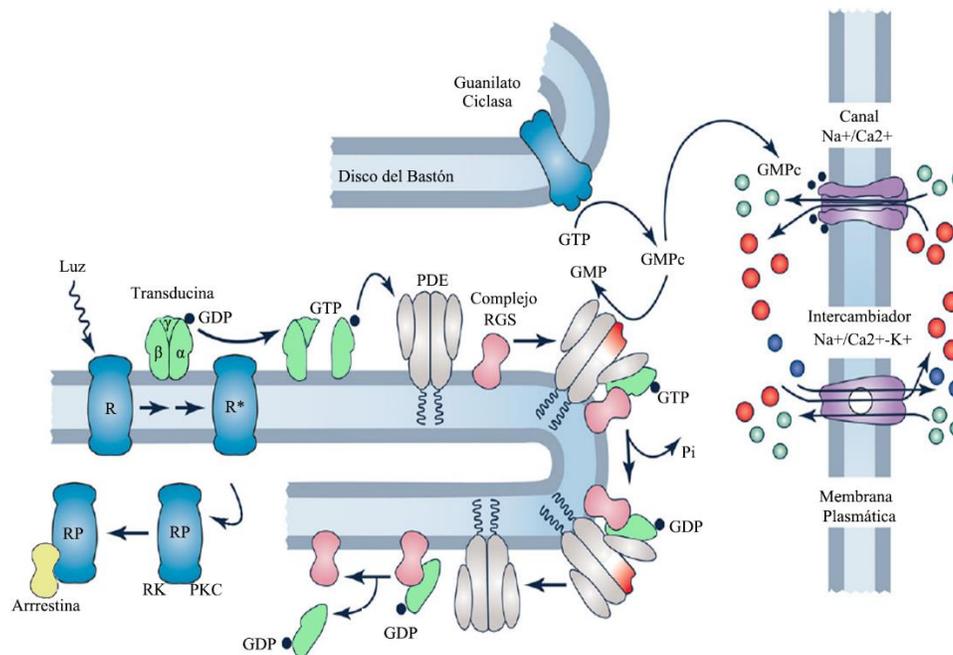
La absorción de un fotón por el 11-*cis-retinal* desencadena su isomerización a *todo-trans-retinal*. Esta isomerización lleva rápidamente a la formación de una serie de compuestos intermedios espectralmente diferentes de Rodopsina hasta llegar a su forma activa, la Metarodopsina II (Meta II)<sup>28</sup>. Los cambios conformacionales en MII le permiten reconocer, unirse y activar a una GTPasa heterotrimerica denominada proteína G o Transducina la cual presenta tres subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ <sup>29</sup>. La transducina intercambia GDP por GTP en su subunidad  $\alpha$  separándose de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Luego, la subunidad  $\alpha$  se une y activa a la fosfodiesterasa (PDE), una holoenzima que comprende dos subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$  reguladas por dos subunidades inhibitorias  $\gamma$ . Esta unión produce la disminución de GMPc citoplasmático, lo cual produce el cierre de receptores regulados por la concentración de este nucleótido provocando una disminución en la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$ . La disminución del influjo de iones de cargas positivas provoca que el voltaje intracelular se vuelva más negativo; hiperpolarizando la célula. Esta respuesta negativa es opuesta a las respuestas de depolarización provocadas por estímulos en otras células sensoriales. La hiperpolarización es transmitida al terminal sináptico del fotorreceptor, disminuyendo la liberación de Glu<sup>24</sup>.

### 1.2.2.2 Modulación y terminación

Luego del estímulo lumínico, el fotorpigmento debe inactivarse rápidamente, para ello rodopsina es fosforilada en el carboxilo terminal. En mamíferos, dependiendo de la especie, hay seis o siete sitios potenciales de fosforilación en el C-terminal<sup>30</sup> sin embargo, serinas 332, 334 y 338 (Ser<sup>332</sup>, Ser<sup>334</sup> y Ser<sup>338</sup>) fueron identificados como los mayores sitios de fosforilación *in vivo*<sup>31</sup>. La Rodopsina Kinasa (RK) fosforila rodopsina en sitios Ser<sup>338</sup>, mientras que proteína kinasa C (PKC) fosforila rodopsina en el sitio Ser<sup>334</sup>. En oscuridad RK esta inhibida por una proteína denominada Recoverina, la cual es inhibida por las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Una vez fosforilada, Rodopsina es reconocida por Arrestina (Arr) la cual se une a ésta bloqueando su sitio de interacción con Proteína G y liberando así el cromóforo<sup>32,33</sup>. De esta forma, la disminución de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular provocada por el cierre de receptores dependientes de GMPc juega un papel fundamental en la terminación del proceso. Además, la concentración de GMPc es restablecida por la

enzima Guanilato Ciclasa (GC) la cual es activada por una proteína activadora (PAGC, de sus siglas en inglés). PAGC, a su vez, se activa cuando disminuyen las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, es decir, luego del estímulo lumínico.

Otro mecanismo esencial en la recuperación y modulación de la fototransducción es la regeneración del cromóforo que fue isomerizado hacia su conformación *trans*; este mecanismo se conoce como ciclo visual de los retinoides e involucra enzimas que se encuentran tanto en los fotorreceptores como en el EP. Esta regeneración comprende varios pasos enzimáticos en los cuales *todo trans retinal* pasa a *todo trans retinol* que luego se convierte en *11 cis retinol* por la enzima Isomerasa y, por último, *11 cis retinol* se convierte en *11 cis retinal* que se combina con la opsina para formar nuevamente el fopigmento<sup>20</sup> (Figura 7).



**Figura 7** |Esquema representativo de la fototransducción en bastones. R, Rodopsina; R\*, Rodopsina Activada; RP, Rodopsina Fosforilada; GTP, Guanosin Trifosfato; GDP, Guanosin Difosfato; cGMP, Guanosín Monofosfato Cíclico; GMP, Guanosin Monofosfato; PDE, fosfodiesterasa; RK, Rodopsina Quinasa; PKC: Proteína Quinasa C; Complejo RGS, grupo de tres proteínas incluyendo aquella que acelera la hidrólisis de GTP por la subunidad  $\alpha$  de transducina; Pi, fosfato inorgánico. Adaptada de Fain y col., 2011<sup>34</sup>.

### 1.2.3 Fotorreceptores no visuales

Sumado a conos y bastones, el ojo de mamíferos contiene una tercera clase de fotorreceptores; las ipRGCs, un subconjunto de CG que proyectan hacia el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo y otras áreas no visuales del cerebro<sup>12,13,14</sup>. Estas células desempeñan un papel en las llamadas “vías no formadoras de imágenes” las cuales son respuestas fisiológicas a la luz que no requieren la formación de imágenes por el sistema visual<sup>35</sup>. Dentro de estas respuestas se pueden nombrar la puesta en hora de los ritmos circadianos o sincronización, la supresión de la síntesis de Melatonina, el sueño, el reflejo pupilar y la relajación de la vasculatura retinal dependiente de la luz<sup>36</sup>. Estas células, que fueron identificadas por primera vez en melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*<sup>37</sup>, expresan el ftopigmento melanopsina (OPN4) y, por lo tanto, responden directamente a la luz. En las ipRGCs de vertebrados mamíferos y no mamíferos que expresan OPN4, la luz provoca la despolarización celular, desencadenando trenes de potenciales de acción durante el estímulo<sup>12</sup>. Estas células tienen origen filogenético del tipo rdbomérico (invertebrados) dado que provienen de un ancestro común con estos fotorreceptores y que el mecanismo molecular de fototransducción que opera en estas células involucra una cascada de fosfoinosítidos que produce la depolarización celular, de forma similar a lo que ocurre en la cascada visual de invertebrados<sup>38,39,40,41</sup> descrita por primera vez en nuestro laboratorio<sup>42,43</sup>. Además, las ipRGCs pueden reciclar el cromóforo en ausencia de EP y son altamente resistentes a los niveles bajos de Vitamina A<sup>36,44</sup>.

Además de OPN4, la retina interna puede expresar otros ftopigmentos y fotoisomerasas como la Encefalopsina / Panopsina (OPN3), Neuropsina (OPN5), Peropsina, Receptor Acoplado a la Proteína G Retiniana (RGR, de sus siglas en Inglés) y Opsina de cono<sup>45,46,47,48,49,50,44</sup>.

OPN5 se ha identificado en la CCG de retinas de ratas Wistar<sup>51</sup>, lo que indica que puede ser una clase novedosa de célula fotorreceptora. Ésta, es una opsina no visual acoplada a G<sub>i</sub> sensible a los rayos UV ( $\lambda$  máxima, 380 nm), y se ha reportado que entrena los osciladores circadianos retinales a ciclos de luz/ oscuridad independientemente de los bastones, conos y OPN4<sup>52</sup>. Además, OPN5 media la fotorrecepción extraretinal en la córnea y posiblemente también en otros tejidos<sup>53</sup>.

### **1.3 Degeneración Retinal**

Se entiende por degeneración retinal (DR) al proceso patológico que provoca la muerte de células retinales induciendo la pérdida de estructura y/o función del tejido. Existe una gran heterogeneidad genética y alélica en los diversos tipos de DR y, las mismas se suelen clasificar según la edad de inicio, estudios electrofisiológicos y psicofísicos<sup>54</sup>. Tanto la extensión como la velocidad de la degeneración dependen de factores genéticos intrínsecos y extrínsecos como la duración, la intensidad y la historia de exposición a la luz. Si bien los cuadros clínicos de las DR son a menudo similares y a pesar de las múltiples mutaciones genéticas que pueden causarlas, todas las DR tienen el mismo resultado; la muerte de células retinales<sup>55</sup>.

#### **1.3.1 Degeneración Retinal por Exposición a Luz**

Si bien el ojo ha desarrollado mecanismos muy precisos de adaptación a la luz y posee varias maquinarias de protección frente a ciertos tipos de exposición a luz, la exposición prolongada o intensa puede causar la muerte de células fotorreceptoras y, como consecuencia, degeneración del tejido; principalmente en animales nocturnos. Se sabe además que la exposición a luz puede modificar el curso de algunas DR<sup>56</sup>; por lo que el daño retinal por luz sirve como modelo para el estudio de DR humanas que surgen a causa de injurias ambientales, envejecimiento o desordenes genéticos<sup>57</sup>.

La luz es la parte visible de la radiación electromagnética en el rango de longitudes de onda de 380–780nm (luz violeta a roja), donde las longitudes de onda cortas transportan más energía que las largas. En los organismos vivos, la energía de la radiación electromagnética se transfiere al tejido y puede producir lesiones a través de mecanismos fototérmicos, fotoquímicos y fotomecánicos. En resumen, el daño fototérmico ocurre cuando la velocidad de la luz liberada es más rápida que la difusión térmica; lo que promueve un aumento de la temperatura del tejido. El tiempo de exposición que produce este tipo de daño es de alrededor de 0.1 y 1.0 s. Así, un aumento de 10 °C de la temperatura en la retina induce la desnaturalización de las proteínas, lo que resulta en daño térmico. Por otra parte, el daño fotomecánico se produce cuando la energía luminosa se deposita antes de que se produzca la relajación mecánica.

### 1.3.1.1 Daño Fotoquímico

En la retina, las lesiones producidas por el daño fotoquímico resultan independientes de las producidas por los daños fototérmicos y fotomecánicos.

El daño fotoquímico puede ocurrir cuando la energía almacenada en un fotón de luz induce cambios en las moléculas irradiadas, como cambios en los orbitales de electrones o ruptura directa de enlaces. Por ejemplo, la transferencia secuencial de energía de un fotón a una molécula fotosensible y luego al oxígeno causa cambios en los orbitales de electrones, creando formas reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete ( $O_2^*$ ). La reacción subsiguiente del  $O_2$  con las moléculas circundantes puede romper sus enlaces moleculares, proceso denominado fotooxidación. Si muchos de estos eventos ocurren en conjunto, eventualmente pueden resultar en daño o muerte celular.

El mecanismo del daño fotoquímico depende del tipo particular de moléculas que actúan como fotosensibilizadores y la energía fotónica (relacionada con la longitud de onda) requerida para inducir un cambio químico<sup>58</sup>. En este sentido, la luz absorbida por un cromóforo inicia reacciones químicas que pueden resultar en la transferencia de energía (protones o electrones) a otras moléculas que pueden volverse químicamente reactivas, proceso conocido como "estrés oxidativo". Una de las principales causas del estrés oxidativo en la retina es la exposición a luz ambiental no natural, donde la gravedad del daño fotoquímico se ve influida por factores tales como el tiempo de exposición, la intensidad (alta, moderada o baja), distribución de la energía radiante en el espectro visible, temperatura corporal, fase circadiana, edad y diversas condiciones ambientales.

La inducción de DR por exposición a luz, es ampliamente utilizada para estudiar los mecanismos de muerte celular, principalmente en modelos de mamíferos nocturnos. Esto representa una ventaja frente a modelos genéticos de DR ya que la misma puede ser manipulada de acuerdo a las necesidades del experimentador. Estos mecanismos de DR suelen proceder en etapas que van desde la inducción de la muerte hasta la remoción de los desechos celulares producidos<sup>59</sup> (Figura 8). El daño retinal por luz sirve, además, como modelo para el estudio de DR humanas que surgen a causa de injurias ambientales, envejecimiento o desordenes genéticos<sup>57</sup>.



**Figura 8|** Representación esquemática de las etapas involucradas en la DR producida por exposición a luz. M: Macrófago. Adaptada de Wenzel y col., 2005<sup>60</sup>.

El daño retinal por luz, de forma amplia, puede dividirse en dos clases; daño por exposición a luz brillante y daño por exposición a luz de baja intensidad. En términos generales estos tipos de daño retinal difieren debido a que el daño producido por luz brillante desencadena la muerte de las células fotorreceptoras a través de un mecanismo que requiere únicamente la activación de rodopsina; mientras que la muerte desencadenada por la exposición a luz de baja intensidad se produce por la activación del fotopigmento y posterior transducción de señales<sup>61</sup>.

### 1.3.1.2 Daño por Exposición a Luz Brillante o de Alta Intensidad

Existen numerosos trabajos relacionados al fenómeno de DR por exposición a luz brillante, los cuales tienen en común utilizar modelos de exposición en los que todas las poblaciones de células visuales se ven afectadas en un lapso de tiempo corto. En relación a esto, Noell y col.,<sup>62</sup> propusieron la existencia de dos mecanismos de daño retinal; uno mediado por la luz azul y el otro mediado por el pigmento visual. Estos autores demostraron que en ciertas

condiciones, como la luz por encima de una intensidad definida, se inician una serie de reacciones que requieren la activación de rodopsina<sup>62</sup>. En este sentido, Williams y col., utilizando un modelo de ratas albinas las cuales fueron expuestas a luz con filtros lumínicos de interferencia diferentes, mostraron daño retinal con una distribución no uniforme a través del tejido; concluyendo que estos fenómenos estaban mediados por rodopsina<sup>63</sup>. Además, usando un modelo de ratón que carece de cantidades medibles de rodopsina funcional *rpe (-/-)*, Grimm y col., demostraron que la exposición a luz no induce apoptosis, lo que indica que el fotorreceptor de rodopsina es el principal mediador del daño<sup>64</sup>. Tanto Remé y col., quienes estudiaron la apoptosis de células fotorreceptoras por exposición a luz azul y brillante, evaluando también el papel de Rodopsina; Organisciak y col., quienes evaluaron el impacto de la luz brillante en la DR en ciertos modelos genéticos animales y los efectos protectores de antioxidantes exógenos y factores neurotróficos, como Grimm y col., quienes describieron los métodos para exposiciones a corto plazo a luz blanca brillante de espectro completo y mediante exposiciones cortas a luz azul o verde monocromática de alta energía; coinciden en que estos mecanismos son dramáticos y de corto plazo, involucrando una DR donde están involucrados los SE<sup>65,57</sup>.

### **1.3.1.3 Daño por Exposición a Luz Tenue o de Baja Intensidad**

Trabajos pioneros en la temática de DR promovida por luz de baja intensidad son los de Noell y col., quienes en el año 1966 describieron por primera vez que ratas albinas mantenidas a luz de baja intensidad presentan muerte de fotorreceptores clásicos con una concomitante disminución en las señales de los electroretinogramas (ERG)<sup>62</sup>. Posteriormente Shear y col., demostraron que la estimulación continua con luz a 750 lux produce una desorganización progresiva de la retina con un daño irreversible en el EP y las células fotorreceptoras. Sin embargo, estos autores demostraron que, si la exposición se hacía en períodos de tiempos más cortos, los cambios estructurales retinales eran reversibles<sup>66</sup>. Otros estudios, revelaron la degradación en los discos de membrana de los SE de los fotorreceptores, ribosomas anormales, cambios estructurales en las mitocondrias y presencia de cuerpos autofágicos, sugiriendo que la activación excesiva de rodopsina sobrepasa la capacidad metabólica de las células, produciendo la muerte debido a que las células no pueden mantener su equilibrio anabólico<sup>67,68,69</sup>.

Se considera que el umbral de intensidad lumínica que produce este tipo de daño se encuentra alrededor de 270 lux y existen evidencias de que el mecanismo de muerte que se desencadena en los bastones es dependiente de la activación de Rodopsina y posterior activación de la cascada de fototransducción<sup>61</sup>.

Se ha demostrado también, que el tipo de fuente de iluminación (fluorescente, incandescente o LED) afecta de manera diferencial a la retina, siendo la más nociva la de mayor energía que dentro del espectro visible corresponde a la luz azul. Esta longitud de onda produce efectos fototóxicos en la retina promoviendo la acumulación de lipofuscina (derivado del cormóforo), la formación de radicales libres y posterior estrés oxidativo entre otros<sup>70</sup>. Estudios que evalúan el efecto de la exposición a luces LED (con alta componente de luz azul) en animales albinos, demuestran que la exposición a este tipo de iluminación es más nociva que a luces fluorescentes a la misma intensidad<sup>71</sup> demostrando que además de la población de fotorreceptores visuales, también están afectadas las células del EP<sup>71</sup>. Es importante destacar que la exposición a luz en exceso puede acelerar el curso de algunas DR entre las que se puede nombrar la Retinitis Pigmentosa (RP) y la Degeneración Macular relacionada con la edad (DMRE)<sup>72,73,74</sup>.

RP comprende un grupo de distrofias retinales en los que, en la mayoría de los casos, los bastones son los más afectados, causando daños visuales que van desde disfunciones retinales leves (ceguera nocturna y campo visual lateral reducido) hasta ceguera total<sup>75,76</sup>. Ciertos errores en el mecanismo de fototransducción son característicos de esta DR. En este sentido, cuando la mutación se produce en un componente clave de la fototransducción o hay deficiencia de vitamina A en la ingesta, se puede producir la activación continua de la fototransducción. Esto provoca finalmente la muerte del fotorreceptor como si la célula estuviera continuamente expuesta a la luz<sup>77,65,78</sup>. La DMRE es una de las causas más comunes de cegueras irreversibles que afecta a alrededor de 50 millones de personas en el mundo. Esta es una enfermedad altamente compleja y, si bien hay factores genéticos que determinan su aparición, los riesgos se ven incrementados con la edad, enfermedades cardiovasculares, consumo de tabaco y en ciertas condiciones ambientales, entre otros<sup>79</sup>. Se conocen dos tipos de DMRE; la seca; caracterizada por la muerte de los fotorreceptores y la húmeda en la cual la macula es dañada por un proceso de angiogénesis<sup>80</sup>. Una de las principales causas de la muerte de los fotorreceptores es el estrés oxidativo. Si bien las

células retinales tienen mecanismos de reparación de este proceso, con la edad y la aparición de los factores de riesgo, la capacidad antioxidante falla incrementando la muerte celular<sup>81</sup>. La muerte de los fotorreceptores podría ser una de las principales causas de DMRE seca y, tanto factores genéticos, como factores de riesgo ambientales, podrían provocar la progresión de la enfermedad.

En función de que los nuevos dispositivos LED son ampliamente utilizados en la actualidad y, considerando que las regulaciones y estándares actuales de uso de estos dispositivos se han establecido sobre la base de la exposición aguda y no tienen en cuenta los efectos de la exposición prolongada, comprendemos que se requieren estudios sobre los efectos de la exposición a largo plazo y bajos niveles de intensidad con este tipo de iluminación para determinar qué efectos ocasionan en el ojo.

## **1.4 Objetivos**

En base a los antecedentes y al marco teórico presentado anteriormente y, teniendo en cuenta la necesidad de dilucidar cuales son los mecanismos que se desencadenan a nivel retinal como consecuencia de la exposición constante a luz LED de baja intensidad, los objetivos planteados para este trabajo de tesis fueron:

### **1.4.1 Objetivo General**

Estudiar el mecanismo de DR desencadenado por la activación constante del proceso de fototransducción, en un modelo de muerte celular producida por luz tenue.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- 1) Caracterizar el modelo de DR, previamente descrito en nuestro laboratorio, en ratas albinas Wistar machos mediante la cuantificación del número de núcleos de la CNE y CCG, el análisis estructural mediante microscopia electrónica de transmisión y la determinación de la muerte de células retinales mediante la técnica de TUNEL.
- 2) Evaluar el estado funcional general de la retina, mediante la obtención de señales electroretinográficas escotópicas en animales expuestos a luz por diferentes días.
- 3) Estudiar los efectos del modelo de DR sobre Rodopsina, Melanopsina y Neuropsina, opsinas predominantes en las neuronas bajo estudio.
- 4) Dilucidar qué mecanismos están involucrados en la muerte de los Fotorreceptores.
- 5) Determinar si existe un desbalance redox, mediante la cuantificación de ROS y la actividad enzimática de CAT.
- 6) Evaluar los efectos del modelo de DR sobre la composición retinal de ácidos grasos.

# **CAPITULO II**

## **MATERIALES Y METODOS**

## **CAPITULO II- MATERIALES Y METODOS**

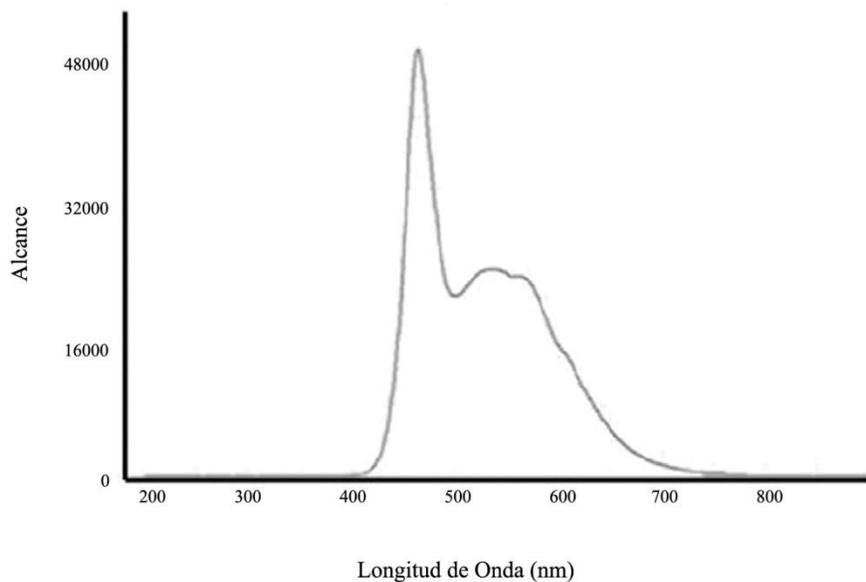
### **2.1 Animales**

En este trabajo de tesis se utilizaron ratas albinas Wistar macho (*Rattus norvegicus*) de 12-15 semanas de edad, las cuales fueron mantenidas en un bioterio climatizado, con agua y comida (Batistela y Cía., Córdoba, Argentina) *ad libitum*. Desde su nacimiento hasta el momento de su uso, los animales fueron expuestos a las condiciones de iluminación del bioterio (Luz blanca fluorescente de aproximadamente 50 Lux de intensidad), en ciclos de luz: oscuridad (12:12 h), con un ciclo de encendido a ZTO (6 am) y apagado a ZT12 (6 pm); (ZT: Zeitgeber time).

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con el protocolo establecido por ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), el cual fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Ordenanza 6/16, Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

### **2.2 Daño Retinal por Luz**

La degeneración retinal fue inducida por exposición de los animales a luz LED (Light-Emitting Diode, de sus siglas en inglés) blanca fría (EVERLIGHT Electronic Co., Ltd., T-13/4 3294-15 / T2C9-1HMB) a una intensidad de 200 lux. Para tal fin, se diseñaron cajas de estimulación las cuales presentan este tipo de iluminación fijada en su parte superior interna. La distribución del espectro de la fuente de luz LED fue determinada mediante un espectrómetro (AvaSpec-HS1024x58/122TECAvantes BV, Países Bajos, Europa) y se expresó como alcance  $V_s$  longitud de onda ( $\lambda$ ) (Figura 9). Además, la iluminación al nivel de los ojos de los animales se midió utilizando un luxómetro digital LED (Modelo 401036; Extech Instruments Corp., Waltham, MA, EE. UU).



**Figura 9|** Distribución espectral de la fuente de luz LED, expresada como Alcance Vs Longitud de onda.

## 2.3 Diseño Experimental

Los animales fueron divididos aleatoriamente en los grupos experimentales que se detallan a continuación:

### 2.3.1 Grupos Control

**LD:** Animales expuestos a luces LED con un ciclo de luz (200 lux): oscuridad (0 lux), (12:12 h) durante 7 días.

**DD:** Animales expuestos a oscuridad constante durante cuatro días.

**RT:** Animales expuestos a luz blanca fluorescente con un ciclo de luz (aproximadamente 50 lux): oscuridad (0 lux), (12:12 h) desde su nacimiento hasta las 12-15 semanas de edad.

### 2.3.2 Grupos con Degeneración Retinal

**LL2:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 2 días.

**LL4:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 4 días.

**LL5:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 5 días.

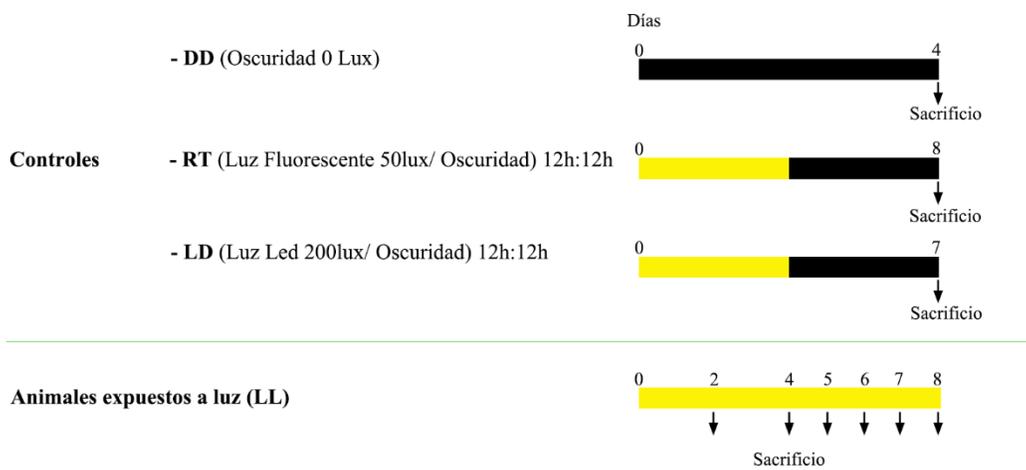
**LL6:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 6 días.

**LL7:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 7 días.

**LL8:** Animales expuestos a luz LED blanca (200 lux) durante 8 días.

Una vez finalizado el protocolo de degeneración, los animales fueron sacrificados bajo una atmosfera de CO<sub>2</sub> a ZT6 (12 am).

En el siguiente esquema se representa el protocolo de trabajo utilizado.



## 2.4 Inmunohistoquímica (IHQ)

### Reactivos:

- Buffer de bloqueo: BSA 3% (p/v), Suero de caballo 2% (v/v); Tritón x-100 0,05% (v/v); Azida Sódica 0,2 % (p/v) en PBS 1X.
- Medio de montaje: MOWIOL (Calbiochem) 2,4g; Tris 0,2M pH 8,5 12ml, Thimerosal 1%, Azida Sódica 0,02%.
- DAPI (3 μM).
- Ioduro de Propidio (IP), 1 % (v/v).

- Paraformaldehído [(PFA), (Merck)] 4% (p/v) en PBS 1X (100 mM, pH 7,3).
- PBS-T: Tween 20, 0, 1 % (v/v) en PBS 1X.
- Metanol (J.T. Baker®).
- OCT: Optimal Cutting Temperature Compound (Tissue-Tek® Sakura).

## **Protocolos:**

### **2.4.1 Extracción del tejido**

Posterior al sacrificio de los animales se extrajeron los globos oculares con pinza y tijera de punta curva, se lavaron con PBS 1X y se almacenaron en tubos tipo Eppendorf con el mismo buffer, a 4 °C.

### **2.4.2 Fijación y Crioprotección**

Los globos oculares se fijaron en PFA 4% ON (Over Night, de sus siglas en inglés) a 4 °C y, posteriormente, se lavaron con PBS 1X 3 veces por 5 min. Luego fueron crioprotejidos en Sacarosa al 10, 20 y 30 % durante 1, 2 y 3 h respectivamente. Finalmente, fueron montados en OCT y almacenados a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **2.4.3 Obtención de Criosecciones Retinales**

Los cortes histológicos se realizaron a lo largo del meridiano horizontal (nasal-temporal) en criostato (Cryostat HM525 NX-Thermo Scientific). El espesor de los mismos dependió del experimento a realizar y se especificará en cada caso.

### **2.4.4 Inmunotinción**

Los cortes se incubaron con PBS 1X durante 10-15 min a T° ambiente, se permeabilizaron con Tritón 0,1% por 5 min y se bloquearon 30-60 min con buffer de bloqueo. Posteriormente se incubaron a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1). Luego se lavaron 5 veces por 3 min con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario [1/1000 (v/v), Alexa Fluor, ThermoFisher Scientific o Jackson ImmunoResearch] por 1 h a T° ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavaron con PBS 1X por 10 min, se marcaron con DAPI o IP por 10 min y se montaron en Mowiol. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

<b>Anticuerpo (Marca)</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Dilución (v/v)</b>	<b>Tiempo de Incubación</b>
$\alpha$ -OPN4 (Abcam)	Conejo	1/500	1 ON
$\alpha$ -OPN5 (NOVUS Biologicals)	Conejo	1/200	5 ON
Ret-P1 (Sigma-Aldrich)	Ratón	1/5000	1 ON
$\alpha$ -Phospho-Ser <sup>334</sup> (Assay Biotech)	Conejo	1/1000	1 ON
$\alpha$ -Tubulina (Sigma-Aldrich)	Ratón	1/3000	60 min
$\alpha$ -eIF3 (Santa Cruz Biotechnology)	Cabra	1/300	4 h

**Tabla 1** | Anticuerpos primarios utilizados para Inmunohistoquímica. Para cada uno se indica el hospedador, el peso molecular en kDa, la dilución empleada y el tiempo de incubación.

#### 2.4.5 Microscopia Confocal

Las inmunotinciones fueron visualizadas y fotografiadas en un Microscopio Confocal (Olympus FV1200, Japan). La magnificación y el número de imágenes tomadas se indican en cada caso.

A continuación, se detallan dos técnicas que siguen los lineamientos generales previamente descritos para IHQ pero que presentan algunas modificaciones.

#### 2.4.6 Inmunohistoquímica para Gránulos de Estrés

Los cortes se incubaron con PBS 1X durante 10-15 min a T° ambiente, se permeabilizaron con Tritón 0,5% por 90 min y se bloquearon ON con buffer de bloqueo, a 4 °C.

Posteriormente se incubaron 4 h a 4 °C con el anticuerpo  $\alpha$ -eIF3. Luego se lavaron 3 veces por 10 min con PBS-T 1X y una vez con PBS 1X y se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario (Dy Light 549, Jackson Immunoresearch) y DAPI por 1 h a T° ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavaron 5 veces por 3 min con PBS 1X y se montaron en Mowiol. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

#### **2.4.7 Cuantificación del Número de Núcleos en Capas Retinales**

Para la cuantificación del número de núcleos de las diferentes capas retinales, las secciones se tiñeron con DAPI durante 10 min y se fotografiaron mediante microscopia confocal. El número de núcleos se determinó utilizando el PlugIn "Automatic Nuclei Counter" del software ImageJ (Versión 4.1.5, [National Institutes of Health](#)).

#### **2.4.8 Flat Mounts de Retina**

Una vez enucleados los ojos, los mismos fueron fijados con PFA 4% por 15 min a T° ambiente y lavados con PBS 1X a 4 °C por 5-10 min. Luego, bajo lupa, se extrajo la retina y se agregó Metanol frío por 20 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS 1X y se procedió con el protocolo especificado para IHQ. El tejido se trabajó en placas multiwell hasta el momento de tomar las microfotografías. En este punto el mismo fue transferido a un portaobjetos y mantenido en PBS 1X.

### **2.5 Determinación de la Fragmentación del ADN**

#### **Reactivos:**

- Kit TUNEL: In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics Corp).
- DNasa: RQ1 RNase-Free DNase (Promega).
- Buffer de incubación: Tris-HCl 400 Mm pH 7,9; NaCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM.
- Medio de montaje: MOWIOL (Calbiochem) 2,4g; Tris 0,2M pH 8,5 12ml, Thimerosal 1%, Azida Sódica 0,02%.
- PFA (Merck) 4% (p/v) en PBS 1X (100 mM, pH 7,3).
- DAPI (3  $\mu$ M).

**Protocolo:**

La fragmentación del ADN se determinó mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labelling, de sus siglas en inglés) utilizando un Kit comercial. Para esto, se trabajó con cortes de retina (según se describió en la sección 2.4.3) los cuales fueron fijados con PFA 4% por 20 min a T° ambiente, lavados con PBS 1X 30 min y permeabilizados con una mezcla de Tritón 0,1% (v/v) y Citrato de sodio 0,1% (v/v) por 30 min en hielo. Luego, las muestras se incubaron con 50 µl de la mezcla de reacción del kit, en cámara húmeda por 90-120 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces con PBS 1X por 10 min y se incubaron con DAPI por 10 min. Finalmente, se lavaron con PBS 1X por 30 seg, con H<sub>2</sub>O Mili Q por 30 seg y se montaron en Mowiol. Como controles negativos se utilizaron muestras de animales control a las que se les agregaron 50 µl de PBS 1X en vez de mezcla de reacción. Como controles positivos se utilizaron muestras de animales control a las cuales, previo al tratamiento con la mezcla de reacción, se las trató con DNAsa 0,3 % (v/v) en buffer de incubación por 60 min a T° ambiente y se las lavó dos veces con PBS 1X por 5 min. Finalmente, las muestras fueron visualizadas y fotografiadas mediante microscopia confocal (Olympus FV1200, Japan).

**2.6 Electrorretinografías****Reactivos:**

- Hidrocloruro de ketamina (Brouwer, Argentina).
- Clorhidrato de xilazina (König, S.A.).
- Tropicamida (Alcon Laboratories).
- Proparacaína anestésica tópica (Alcon Laboratories)

**Protocolo:****2.6.1 Preparación de los animales**

Las señales electroretinograficas (ERG) se obtuvieron de acuerdo a los protocolos de la ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) para ERG

escotópicas<sup>82</sup>. Para ello, los animales se adaptaron a la oscuridad por 20 min y se prepararon para el registro bajo luz roja tenue. Luego, se anestesiaron con una mezcla de Hidrocloruro de ketamina y Clorhidrato de xilazina 3:1 (v/v) por vía intraperitoneal (200 µl /100 g peso corporal) lo que permitió tener un tiempo aproximado de anestesia de 60 min, preservando el reflejo pupilar y de parpadeo del animal. Diez minutos antes de la colocación de los electrodos, las pupilas se dilataron con una gota de Tropicamida al 0,5% y luego se aplicó proparacaína anestésica tópica al 0,5% para asegurar una buena interfaz electrodo córnea y evitar el parpadeo.

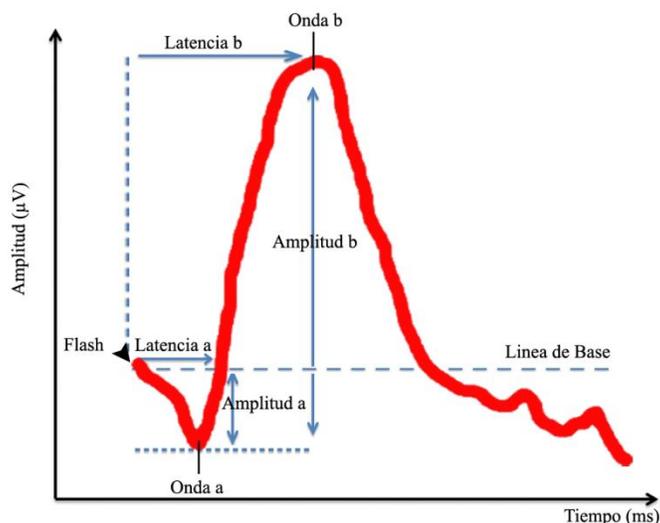
Los electrodos corneales monopolares, empleados para el registro de las señales se fabricaron de forma manual con alambre de plata maleable. Además, se utilizaron electrodos monopolares de aguja como electrodos de referencia y tierra.

Los electrodos corneales fueron colocados en la conjuntiva bulbar para evitar artefactos de movimiento, mientras que los de referencia y tierra se colocaron por vía subcutánea en la oreja y la cola del animal respectivamente. Luego de la colocación de los electrodos y anterior al registro, lo animales se adaptaron 10 min a la oscuridad.

### **2.6.2 Registro de las señales**

Las señales se registraron en un equipo de adquisición BIO-PC (Akonic BIOPC, Buenos Aires, Argentina) en ambos ojos de forma simultánea. Para esto, se tomaron 10 respuestas a flashes de luz blanca fría de  $\approx 7000\text{K}$  (5 ms, 0,1 Hz) provenientes de un fotoestimulador LED (BIO-PC 4001 MINI-FH, Akonic BIOPC, Buenos Aires, Argentina) de campo completo, el cual fue acoplado al máximo de su intensidad (3 candelas/ m<sup>2</sup>, sin filtro) y colocado a aproximadamente 20 cm de la cabeza del animal. Luego, las respuestas se amplificaron, filtraron (filtro low-pass de 1.5Hz, filtro high-pass de 300Hz y filtro Notch activado de 50 Hz) y promediaron. La impedancia de los electrodos se mantuvo siempre por debajo de 5K $\Omega$ . Los parámetros determinados fueron las amplitudes en microvoltios ( $\mu\text{V}$ ) y los tiempos de latencia en milisegundos (ms) de las ondas “a” y “b”. La amplitud de la onda “a” se midió desde la línea de base del preestímulo inicial hasta el primer valle, y la amplitud de la onda “b”, se midió desde el preestímulo inicial hasta la deflexión positiva máxima, debida a la despolarización de las células bipolares, seguida por la onda “a”. Los tiempos de latencia se midieron desde el momento de la estimulación hasta el punto donde

se toman los valores de amplitud máxima de ambas ondas; llamadas respectivamente "latencia de onda a" y "latencia de onda b" (Figura 11).



**Figura 11** | Respuesta electroretinográfica escotópica típica. Se muestran las amplitudes y tiempos de latencia de las ondas "a" y "b".

### 2.6.3 Protocolo de descanso

Para el protocolo de descanso, se definieron 5 grupos experimentales los cuales se detallan a continuación:

- **2 h**: Animales expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 2 h comprendido entre ZT 12 (6 pm) y ZT 14 (8 pm).
- **4 h**: Animales expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 4 h comprendido entre ZT 12 (6 pm) y ZT 16 (10 pm).
- **6 h**: Animales expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 6 h comprendido entre ZT 12 (6 pm) y ZT 18 (12 pm).
- **10 h**: Animales expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 10 h comprendido entre ZT 12 (6 pm) y ZT 20 (4 am).

- **12 h:** Animales expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 12 h comprendido entre ZT 12 (6 pm) y ZT 24 (6 am).

En todos los casos, luego de cumplido el tiempo de exposición a luz, se obtuvieron señales ERG escotópicas de la misma forma que se detalló anteriormente.

## **2.7 Identificación de Proteínas por Western Blot**

### **Reactivos:**

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad).
- Inhibidor de Proteasas (Invitrogen).
- Acrilamida 29,2 % (p/v) –Bisacrilamida 0,8 % (p/v) (Sigma).
- Buffer de siembra: Glicerol 4:10 (v/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 2:10 (v/v); buffer Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; 5:10 (v/v); SDS 8% (p/v); Azul de Bromofenol 0,02 % (v/v) en PBS 1X.
- Buffer de incubación: Leche libre de grasas 2,5 % (p/v) y Tween 20 0,1-0,2 % (v/v) en PBS 1X.
- Buffer de corrida: Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 190 Mm); 0,1 % SDS en H<sub>2</sub>O.
- Buffer de bloqueo: Leche libre de grasas 5% (p/v) en PBS 1X
- Buffer de transferencia: Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 190 mM) 10% (v/v); Metanol 20% (v/v) en H<sub>2</sub>O Mili Q.
- TEMED (Bio-Rad).
- Persulfato de Amonio [(APS), (Amersham<sup>TM</sup>)].
- Marcador de Peso Molecular: ECL<sup>TM</sup> Rainbow<sup>TM</sup> Marker - Full Range (Amersham<sup>TM</sup>).
- PBS-T: PBS 1X, Tween 20, 0, 1 % (v/v).
- Membranas de PVDF (ThermoFisher Scientific)

### **Protocolo:**

Los tejidos fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de PBS 1X con Inhibidor de proteasas y lisados mediante ciclos de ultrasonicación (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer, Illinois, USA).

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford<sup>83</sup>. Posteriormente, los homogenatos fueron resuspendidos en buffer de siembra y calentados a 90 °C durante 5 min. Luego, 20 µg de proteínas y el marcador de peso molecular (1µl) fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% mediante electroforesis (SDS-PAGE) durante 1 h a 120 voltios constantes. Posteriormente se los transfirió a membranas de PVDF, previamente sumergidas en Metanol, durante 40 min a 360 amperios constantes. Luego, las membranas se lavaron 5 veces por 3 min con PBS-T. El bloqueo se realizó por 1 hora a T° ambiente con buffer de bloqueo y se incubó ON a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) en buffer de incubación. Luego, las membranas fueron lavadas con PBS 1X 3 veces por 5 min cada una e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente [1: 25000 (v/v), IRDye Odyssey LI-COR] por 1 h a T° ambiente en oscuridad. Finalmente, las membranas se lavaron con PBS 1X dos veces por 3 min y una vez con H<sub>2</sub>O MiliQ. Para corroborar la presencia de las proteínas en las membranas, las mismas fueron escaneadas en un escáner infrarrojo (Odyssey® Imaging System, LI-COR). En todos los casos, como control de carga se utilizó  $\alpha$ - Tubulina. La cuantificación densitométrica de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el Software ImageJ (versión 4.1.5, National Institutes of Health).

<b>Anticuerpo (Marca)</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>	<b>Dilución (v/v)</b>	<b>Tiempo de Incubación</b>
$\alpha$ -OPN4 (Abcam)	Conejo	52	1/500	1 ON
$\alpha$ -OPN5 (NOVUS Biologicals)	Conejo	40	1/200	5 ON
Ret-P1 (Sigma-Aldrich)	Ratón	36	1/400	2 ON
$\alpha$ -Phospho-Ser <sup>334</sup> (Assay Biotech)	Conejo	39	1/250	2 ON
$\alpha$ -Tubulina (Sigma-Aldrich)	Ratón	55	1/3000	1 h

**Tabla 2** | Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot. Para cada uno se indica el hospedador, el peso molecular en kDa, la dilución empleada y el tiempo de incubación.

## 2.8 Extracción de ARN

### Reactivos:

- Cloroformo (J.T. Baker®).
- Alcohol Isopropilico (J.T. Baker®).
- DEPC (Dietilpirocarbonato).
- H<sub>2</sub>O libre de RNasas (H<sub>2</sub>O DEPC).
- Etanol (EMSURE, Merck) en H<sub>2</sub>O DEPC.
- TRIzol® Reagent (Invitrogen).

### Protocolo:

Los tejidos se homogeneizaron con 1 ml de TRIzol en un homogeneizador de vidrio y teflón y se incubaron por 5 min a T° ambiente. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de Cloroformo,

se agitaron por 10-15 seg y se incubaron por 2-3 min a T° ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Luego se separó la parte acuosa, se le añadió 500 µl de Alcohol Isopropilico 100%, se la incubo a T° ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con 1ml de Etanol 75%, se agitó rápidamente y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4 °C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado, se resuspendió en aproximadamente 20 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y se incubó a 55-60 °C por 15 min. La concentración del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante espectroscopia UV (Epoch, BioTek) y utilizando la fórmula:  $A_{260} \times \text{dilución} \times 50 / \mu\text{g ARN/ ml}$ .

## **2.9 Tratamiento con DNAsa**

### **Reactivos:**

- DNasa: RQ1 RNase-Free DNase (Promega).
- Buffer de reacción DNAsa 10X (Promega).
- Solución Stop (EGTA 200 Mm, pH 8,0; Promega).
- H<sub>2</sub>O DEPC.

### **Protocolo:**

Para la eliminación del ADN contaminante de las muestras de ARN, se agregó 1 µl de buffer de reacción de DNAsa y 1 U de enzima por cada µg de ARN utilizado, en 10 µl de volumen final de H<sub>2</sub>O DEPC y se calentó a 37 °C por 30 min. Finalmente se agregó 1 µl de solución stop y se calentó a 65 °C por 10 min.

## **2.10 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **2.10.1 Transcripción Reversa**

#### **Reactivos:**

- Oligos dT (Biodynamics).

- Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) (Promega).
- Transcriptasa Reversa MMLV (Promega)
- Buffer 5X (Promega)
- H<sub>2</sub>O DEPC.

**Protocolo:**

Para la obtención del ADN copia (ADNc) se agregaron, por cada 2 µg de ARN, 2 µl de oligos dT y se incubó por 5 min a 70 °C. Luego se agregó una mezcla de reacción conteniendo Buffer 5X, dNTPs 10 mM y MMLV (200 U/µg ARN), alcanzando un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O DEPC y se calentó a 42 °C por 1 h y a 95 °C por 30 seg en termociclador (Labnet Multigen Thermal cycler).

**2.10.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

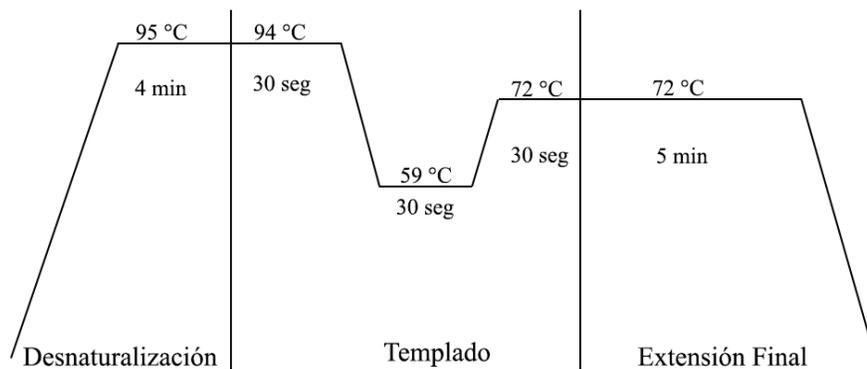
**Reactivos:**

- Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) (Promega).
- Primers 0, 4 µM (Integrated DNA Technologies) (Tabla 4 Materiales y Métodos).
- ADN Polimerasa (Go-Taq, Promega)
- Buffer 5X (Promega).
- Agarosa (Genbiotech).
- Bromuro de Etidio (Bio-Rad).

**Protocolo:**

A 2 µl de ADNc se les agregó una mezcla de reacción conteniendo 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,125 µl de Go-Taq (0.625 U), 5 µl de Buffer 5X y 2 µl de primers (1 µl Forward y 1 µl Reverse) y se llevó a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O DEPC.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Labnet Multigen Thermal cycler), utilizando las condiciones de ciclado que se indican en la figura 12. El número de ciclos empleados para cada gen se indican en la tabla 3.



**Figura 12** | Condiciones de ciclado empleadas en la reacción en cadena de la polimerasa

Los productos de amplificación fueron identificados por electroforesis en gel de Agarosa al 1%, teñidos con Bromuro de Etidio y revelados en un transiluminador UV.

## 2.11 Determinación de la formación de Especies Reactivas del Oxígeno Intracelulares

### Reactivos:

- 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate [(DCFDA, de sus siglas en inglés) (Sigma Aldrich)].
- Azida Sódica (Biopack).
- Tripsina (Life technology, Inc.).
- Inhibidor de Tripsina (STI).
- Peróxido de hidrógeno (Laboratorios Cicarelli).

Gen	Primer	Secuencia 5' -3'	Número de ciclos	Tm °C
Bax	Forward	ACC AGG GTG GCT GGG ATG	33	60
	Reverse	GCC T CA GCC CAT CTT CTT CC		
Bcl2	Forward	GAG TTC GGT GGG GTC ATG TG	35	60
	Reverse	CCA CAA AGG CAT CCC AGC CT		
Caspasa-8	Forward	CAG GTT TCT GCC TAC AGG GTT	35	60
	Reverse	AGG CTC GAG TTG TCT TGC AG		
RipK3	Forward	TGA GCG AGC ATC CTT CCA AA	37	60
	Reverse	ACG CAC CAT TGA GCC ATA AC		
RipK1	Forward	TTG GCA CCA CCA GAT GAC TC	35	60
	Reverse	AGT GGT GTT AGC GAA GAC GG		
Tbp	Forward	AGAACAATCCAGACTAGCGCA	-	60
	Reverse	GGGAACCTTCACATCACAGCTC		

**Tabla 3|** Primers empleados en PCR. Para cada caso se indica la secuencia (forward y reverse), el número de ciclos y la temperatura de melting. Tbp (Tata binding protein, de sus siglas en inglés): gen constitutivo.

### Protocolo:

La determinación de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) intracelulares se realizó utilizando la sonda DCFDA cuya intensidad de fluorescencia es proporcional a la producción de ROS intracelular. Para esto, los ojos fueron enucleados y se conservaron en 100 µl de PBS 1X y Azida Sódica al 0,2% a 4 °C.

Luego, se extrajeron las retinas las cuales fueron disociadas de forma manual con 200  $\mu$ l de Tripsina al 0,25 % (v/v) e incubadas 7 min a 37 °C. Posteriormente el tejido se centrifugó a 3000 rpm por 3 min, se incubó con 200  $\mu$ l de STI por 3 min y se lavó dos veces con PBS 1X. Luego, se resuspendió en 200  $\mu$ l de PBS 1X y se incubó con DCFDA (5  $\mu$ M) por 60 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, se lavó con PBS 1X mediante centrifugación y el precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ l PBS 1X. La intensidad de fluorescencia se midió por Citometría de Flujo (BD FACSCanto II™; BD Biosciences) a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como control positivo se utilizó una muestra de tejido que se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% 15 min antes de agregar la sonda, se centrifugó y se lavó con PBS 1X. Como control negativo se utilizó una muestra a la cual no se le agregó la sonda.

## 2.12 Actividad Enzimática de Catalasa

### Reactivos:

- Buffer fosfato [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1:1, 55)].
- Peróxido de hidrógeno (Laboratorios Cicarelli).

### Protocolo:

La actividad de la enzima Catalasa (CAT) se cuantificó mediante la técnica de Aebi<sup>84</sup>; la cual se basa en que la velocidad de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es directamente proporcional a la actividad de la enzima. Para esto, a 300  $\mu$ l de muestra previamente homogeneizada se le agregó 1,3 ml de Buffer Fosfato (50 mM; pH 7,4) y 1,25 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Luego, las muestras se dejaron reposar por 2 min para que la densidad óptica se estabilice. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 mM), se mezcló y se siguió la disminución en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 min a 240 nm por espectrofotometría (BioSpec-mini, Shimadzu). Finalmente se calculó el valor de “ $\Delta$ ” de la absorbancia por minuto. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford<sup>83</sup> y la cuantificación de la actividad enzimática se realizó partiendo de la fórmula:

$$A = \epsilon * b * c$$

Siendo,

A =  $\Delta$  de la absorbancia por minuto.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40\* 1/M cm).

b = distancia que recorre la luz en la cubeta (cm).

c = concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A partir de esto se llegó a la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta \text{ de Absorbancia. min x Volumen final de la cubeta}}{40 \text{ x Volumen de muestra x mg. de proteínas. ml x 1000}}$$

La actividad enzimática se expresó como U/mg proteína, siendo U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto.

## **2.13 Extracción de Ácidos Grasos de Retina Total y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas**

### **2.13.1 Obtención de Esteres Metílicos de Ácidos Grasos**

#### **Reactivos:**

- Cloroformo HPLC (Merck).
- Metanol HPLC (J.T. Baker®).
- Metóxido de Sodio (Sigma Aldrich).
- Tolueno (Merck).
- Hexano HPLC (Sintorgan).
- H<sub>2</sub>O Mili Q.
- Estándar comercial (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma Aldrich).

La extracción de lípidos totales se realizó según Folch y col.,1957<sup>85</sup>. Para esto, las muestras fueron homogenizadas por ultrasonido por 30 seg (Ultrasonic Homogenizer) en 200 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ y se les agregaron 3 ml de una mezcla de Cloroformo: Metanol 2:1 (v/v) y 600 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ, se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se trabajó con la fase inferior e interfase a las cuales se les adicionó aproximadamente 1,5 ml de una mezcla de Cloroformo: Metanol: H<sub>2</sub>O 3:48:47 (v/v/v), se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Finalmente se descartó la fase superior y el volumen restante se secó con N<sub>2</sub>. Para la obtención de los esteres metílicos de ácidos grasos a las muestras se les adicionó 500 µl de Tolueno y 1 ml de Metóxido de Sodio y se las incubó a 4 °C durante toda la noche para lograr así la metilación de los ácidos grasos<sup>86</sup>. Transcurrida la incubación, se agregó 1 ml de Hexano y 157 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ. Luego se procedió a trabajar con la fase superior en donde se encontraban los ácidos grasos metilados, la cual se secó con N<sub>2</sub> y se resuspendió en 50 µl de Hexano. Las muestras se almacenaron en viales de vidrio gaseados con N<sub>2</sub> a -80 °C hasta su uso.

### **2.13.2 Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas**

El perfil de ácidos grasos en retina total se determinó mediante Cromatografía Gaseosa (CG) acoplada a Espectrometría de Masas por trampa de Iones (SM) (Saturn<sup>®</sup> 2000 GC/MS, Agilent, Santa Clara, USA). En todos los casos se inyectó de forma manual 1 µl de muestra, utilizando un modo sin división (Split Off) por 1 minuto y luego 50 (tasa de división, Split ratio 50); la temperatura del inyector fue de 300 °C. Las condiciones de temperatura de la columna (Agilent HP-5MS, 30 m x diámetro interno 0.250 mm, film 0.25 µm) se especifican en la tabla 4. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C. Como gas portador se utilizó Helio, con un flujo constante de 1ml/min. Las condiciones de la espectrometría de masas fueron las siguientes:

- Detector: Trampa de iones (Ion Trap).
- Temperatura 150 °C.
- Segmento 1: 0.00 min a 3.00 min. Sin ionización.
- Segmento 2: 3.00 min a 45.00 min. Ionización electrónica, corriente emisión de filamento: 15 µA; energía: 70 eV, rango de registro: 40 a 650 m/z (2 análisis);

objetivo de corriente iónica total: 20000; máximo tiempo de ionización: 25000  $\mu$ s; masa de fondo 45 m/z.

T (°C)	Rampa °C / min	Tiempo (min) a T° Fija	Tiempo Total (min)
170		3	3
200	1.2	0	28
240	10	5	37
280	80	5	42
300	80	4	46.75

**Tabla 4** | Condiciones de temperatura de la columna de CG.

Del mismo modo en que se analizaron las muestras de retina pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, se analizó el estándar comercial para la posterior identificación de los diferentes ácidos grasos.

### 2.13.3 Identificación y Cuantificación

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando los softwares Varian MS Workstation, MS Data Review, versión 6.9 (Agilent, Santa Clara, USA, Varian, Inc). Los compuestos fueron identificados comparando sus espectros de masas con los de la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, de sus siglas en inglés); utilizando el software NIST Mass Spectral (MS) Search 2.0. Toda aquella búsqueda que presento un Rmatch por encima de 700 fue considerada como correctamente identificada. Además, también se compararon los tiempos de retención de los ácidos grasos identificados en las muestras analizadas con aquellos identificados en el estándar comercial. Para la cuantificación, como punto de partida se calculó el área bajo la curva de los picos de cada ácido graso identificado y, posteriormente, se calculó el cociente entre el área de cada pico y el área total de todos los picos del cromatograma. Los resultados se expresan como % del total.

## **2.14 Obtención y Caracterización de Cultivos Primarios de Células Ganglionares de ratas**

### **2.14.1 Obtención**

#### **Reactivos:**

- Medio libre de calcio y magnesio (CMF).
- Antibiótico.
- Papaina (P3125 Sigma- Aldrich).
- DNAsa (18047-019 Invitrogen).
- Medio de Incubación: Anfotericina al 0,05% (v/v), Forskolina al 0,1% (v/v), BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) al 0,02% (v/v), B27 al 2% (v/v) y Glutamax al 1% (v/v) en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con antibiótico.

#### **Protocolo:**

Las células fueron aisladas de retinas de ratas de 7 u 8 días de edad (Pn 7-8). Una vez aisladas, las mismas se disgregaron en CMF y Antibiótico de forma manual. Posteriormente, las mismas fueron digeridas con 165 µl de Papaina y DNAsa al 0,4% por 45 min a 37 °C. Luego se resuspendieron en medio de incubación y se incubaron en estufa con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C por 6 días; realizando un cambio de medio al tercer día.

### **2.14.2 Caracterización**

#### **Reactivos:**

- Buffer de bloqueo: BSA 3% (p/v), suero de caballo 2% (v/v); Tritón x-100 0,05% (v/v); Azida Sódica 0,2 % (p/v) en PBS 1X.
- Medio de montaje: MOWIOL (Calbiochem) 2,4g; Tris 0,2M pH 8,5 12ml, Thimerosal 1%, Azida Sódica 0,02%.
- DAPI (3 µM).
- PFA (Merck) 4% (p/v) en PBS 1X (100 mM, pH 7,3)
- PBS-T: Tween 20, 0, 1 % (v/v) en PBS 1X.
- Metanol (J.T. Baker®).

## Protocolo:

La caracterización de los cultivos celulares se realizó mediante inmunocitoquímica (ICQ). Para esto las células, previamente cosechadas, se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con PFA al 4% y Metanol frío por 15 min. Posteriormente se lavaron con PBS 1X frío y se bloquearon con buffer de bloqueo por 45 min. Luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5), se lavaron con buffer de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo secundario y DAPI por una hora en oscuridad. Finalmente, se lavaron con PBS 1X 3 veces por 5 min cada una y se montaron en Mowiol.

<b>Anticuerpo (Marca)</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Dilución (v/v)</b>	<b>Tiempo de Incubación</b>
$\alpha$ -OPN4 (Abcam)	Conejo	1/200	1 ON
$\alpha$ -Brn3 (Abcam)	Ratón	1/200	1 ON

**Tabla 5** | Anticuerpos primarios y secundarios empleados para ICQ, indicando el hospedador, la dilución y el tiempo de incubación.

### 2.16 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza se realizaron mediante los test de Shapiro–Wilks modificado y Levene respectivamente. Cuando los supuestos de distribución normal se cumplían, las comparaciones entre medias se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANAVA) a una vía, con un valor de significancia de 0,05, seguida de un Test a posteriori en los casos que presentaban diferencias entre medias. El Test a Posteriori empleado se especifica en cada caso. En los casos en que los supuestos no se cumplían, se procedió a realizar una

transformación de la variable en cuestión y, si la misma no cumplía con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza, se trabajó con una estadística no paramétrica, mediante el test de Kruskal-Wallis, empleando una comparación de a pares. El análisis de correlación se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  DE o media  $\pm$  EE y el tamaño muestral (n) se indica para cada experimento.

# **CAPITULO III**

## **RESULTADOS**

## **CAPÍTULO III- RESULTADOS**

### **3.1 Estudio de los efectos de la exposición constante a luces LED en ratas albinas Wistar - Caracterización del modelo de DR**

En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis realizado en diferentes poblaciones de neuronas retinales, provenientes de animales expuestos por diferentes días y de manera constante a luz LED; con el fin de caracterizar los efectos del modelo de DR previamente propuesto y descrito en nuestro laboratorio.

#### **3.1.1 Determinación del Número de Núcleos de la Capa Nuclear Externa**

Los fotorreceptores retinales clásicos, conos y bastones, están adaptados de manera única para funcionar bajo un amplio rango de condiciones ambientales de iluminación. Sin embargo, en la mayoría de las especies, la exposición prolongada a luz visible puede desencadenar daño en estas células. En roedores nocturnos, los efectos del daño retinal por luz se producen principalmente en bastones y, por lo tanto, la muerte celular ocurre principalmente en la CNE<sup>87</sup>. Previamente en nuestro laboratorio se demostró, en ratas albinas Wistar hembras de 12-15 semanas de edad, que la exposición constante a luz blanca LED producía muerte de bastones partir del cuarto día de exposición<sup>88</sup>. En función de estos antecedentes, se decidió caracterizar el modelo de DR previamente descrito en nuestro laboratorio en ratas albinas Wistar machos, para determinar si también se desencadenan mecanismos de DR.

Para ello, como punto de partida se procedió a la cuantificación del número de núcleos de la CNE, un marcador clave en modelos de DR. Este análisis, realizado a partir de microfotografías de retinas de los animales expuestos a las diferentes condiciones experimentales, permitió identificar que, luego de 6 días de exposición constante a luz (LL6), el número de núcleos de la CNE disminuye respecto a los grupos control (Figura 13 A).

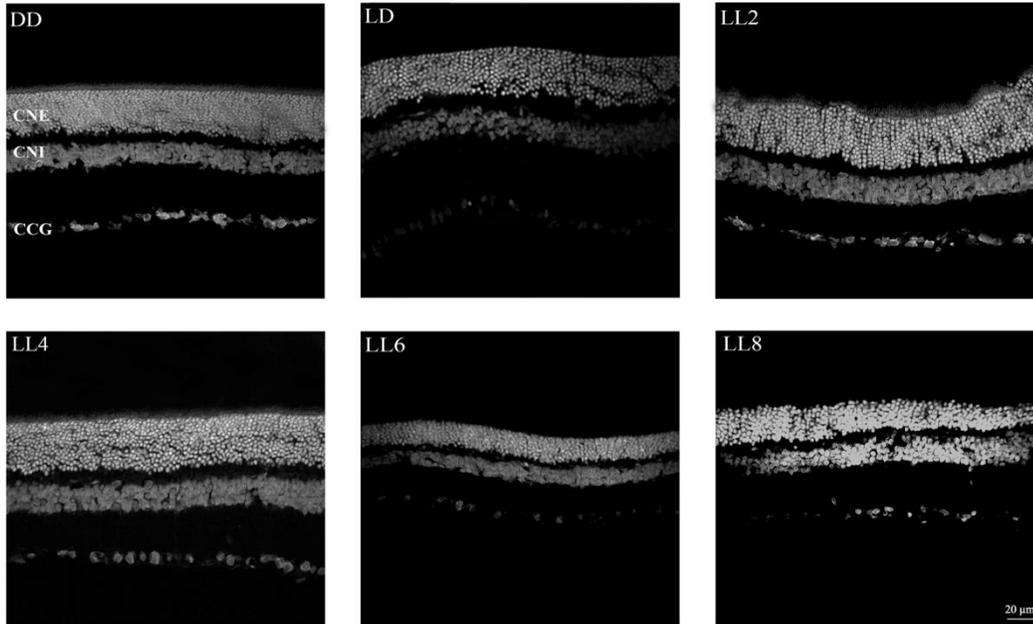
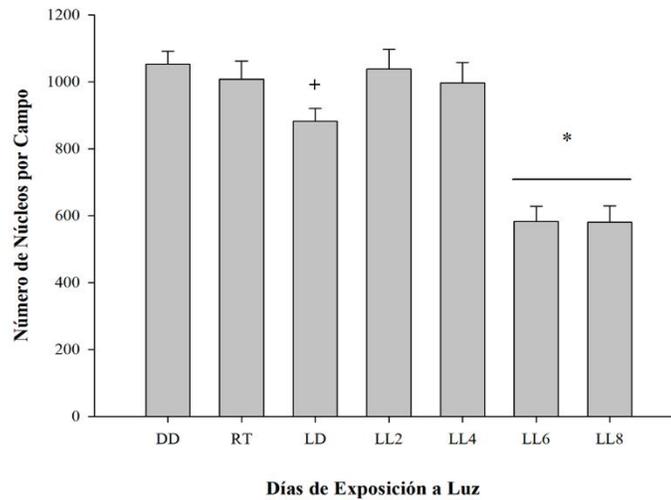
Los resultados del análisis cuantitativo del número de núcleos de cada grupo experimental permitieron identificar que los animales pertenecientes al grupo control LD (expuestos a luces LED en ciclos de luz: oscuridad 12:12 h, por 7 días) presentan una disminución

estadísticamente significativa en el número de núcleos, respecto a aquellos animales control mantenidos en oscuridad constante (DD), pero no respecto al grupo control RT. Esto podría estar evidenciando el comienzo de un proceso de DR en aquellos animales que son mantenidos en ciclos de luz: oscuridad con iluminación LED, pero no en animales mantenidos en ciclos de luz: oscuridad con luces fluorescentes (RT) ( $p < 0.05$  Vs DD, ANAVA a una vía, test post hoc de Duncan). La comparación entre los grupos experimentales y los grupos control permitió identificar que la reducción en el número de núcleos de la CNE resultó estadísticamente significativa a partir del sexto día de exposición constante a luz [ $*p < 0.05$  Vs DD, RT y LD, ANAVA a una vía, test post hoc de Duncan), (Figura 13 B)].

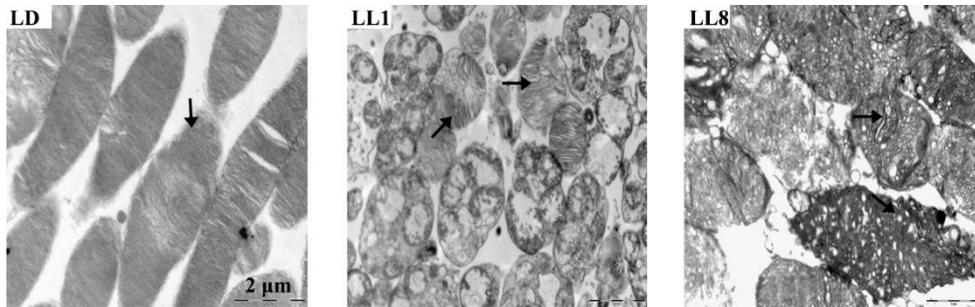
El análisis estructural de la retina mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 14) muestra que a tiempos cortos de exposición a luz (LL1) ya se evidencia un cambio morfológico en los bastones, los cuales presentan sus membranas externas disgregadas con un alto grado de vacuolización celular, siendo mayormente evidenciado a los 8 días (LL8). Posteriormente con el objetivo de evaluar si la reducción del número de núcleos de la CNE se debía a la muerte de células fotorreceptoras, se evaluó, mediante la técnica de TUNEL, si en las mismas existía un proceso de fragmentación del ADN (Figura 15).

Este análisis reveló que únicamente las células de la CNE muestran marcación positiva para TUNEL, lo que indica que la población de conos y bastones se encuentran en un proceso de muerte celular.

Estos resultados demuestran que el modelo de DR propuesto actuaría de forma similar en machos y hembras. Sin embargo, para descartar posibles influencias que pueda tener el ciclo estral de las hembras en cualquier variable analizada; en este trabajo de tesis se decidió utilizar ratas albinas Wistar machos.

**A****B**

**Figura 13|** Efecto de la exposición constante a luz LED sobre el número de núcleos de la CNE en ratas Wistar machos. **A.** Imágenes representativas de cortes de retina de animales control (DD y LD) y expuestos a luz (LL2, 4,6 y 8 días). Los núcleos fueron marcados con DAPI, las imágenes se presentan en blanco y negro. CNE: Capa Nuclear Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares. Barra: 20 µm. Aumento: 20 X. **B.** Número de núcleos por campo. Los datos se presentan como media ± EE. \*=  $p < 0.05$  Vs DD, RT y LD. +=  $p < 0.05$  Vs DD. ANAVA a una vía seguida por test post hoc de Duncan,  $n=3$  animales por grupo.

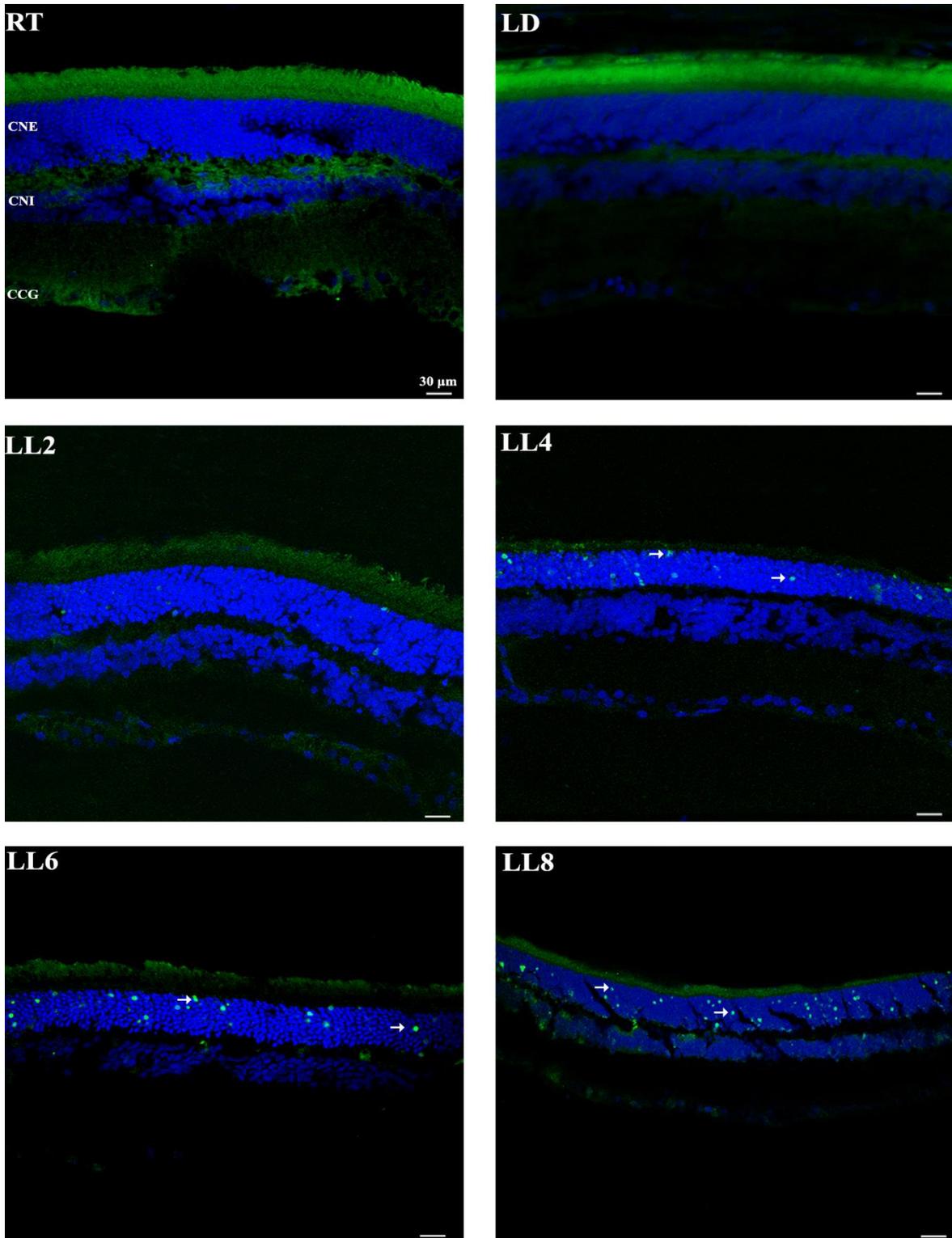


**Figura 14|** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de retinas de animales control (LD) y expuestos 1 y 8 días a luz (LL1-8). Las flechas indican SE de bastones. Barra: 2 µm.

En conjunto, los resultados presentados hasta aquí permitieron demostrar que el modelo de DR produce cambios a nivel de CNE, produciendo muerte de conos y bastones que se hace evidente a partir del sexto día de exposición a luz (LL6). Además, resulta interesante aclarar que la reducción en el número de núcleos de la CNE en animales LD respecto a DD podría estar evidenciando el inicio de una DR, cuya causa podría ser la exposición de estos animales a luces LED, ya que aquellos animales expuestos al mismo ciclo de luz/oscuridad, pero a una fuente de luz fluorescente (RT) no presentan esta disminución.

### 3.1.2 Determinación del Número de Núcleos de la Capa de Células Ganglionares

En mamíferos, la luz actúa directamente sobre la retina, cumpliendo dos funciones principales; una función visual, mediada por conos y bastones y una función no visual también conocida como no formadora de imágenes, a través de las ipRGCs. Dentro de las llamadas funciones no formadoras de imágenes se pueden nombrar la sincronización de los ritmos circadianos, el reflejo pupilar, la secreción de melatonina, la regulación del sueño y la relajación de la vasculatura retinal<sup>89</sup>. Además, recientemente se ha demostrado la participación de las CG en procesos formadores de imágenes<sup>90</sup>.

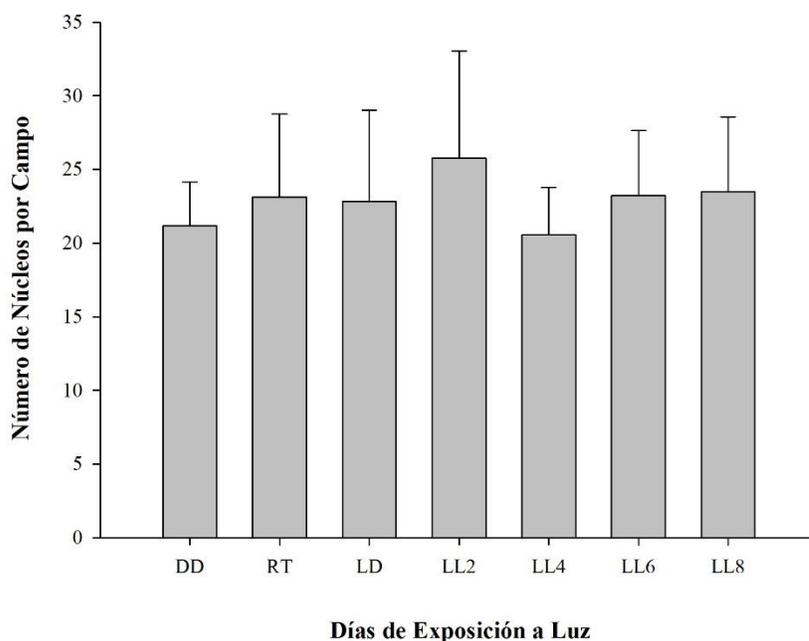


**Figura 15|** Ensayo de TUNEL en retinas de animales control (RT y LD) y expuestos 2, 4, 6 y 8 días a luz (LL 2, 4 6 y 8). Verde: células TUNEL positivas, Azul: tinción nuclear con DAPI. CNE: Capa Nuclear Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares. Las flechas indican células TUNEL positivas. Barra: 30 µm. Aumento: 20 X.

Uno de los interrogantes claves que surgió durante el estudio de la caracterización de los efectos de la exposición a la luz LED constante, fue si la misma afecta la organización, estructura y supervivencia de las CG, sobre todo en aquella población fotosensible.

En función de esto, se decidió estudiar la supervivencia de esta población celular a partir de la cuantificación del número de núcleos de la CCG, de la misma manera que se realizó para la población de fotorreceptores clásicos. La cuantificación se realizó utilizando el mismo grupo de microfotografías a partir de las cuales se cuantificó el número de núcleos de la CNE.

Este análisis permitió demostrar que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de núcleos de la población de CG entre los diferentes grupos experimentales ni respecto a los grupos control (Figura 16).

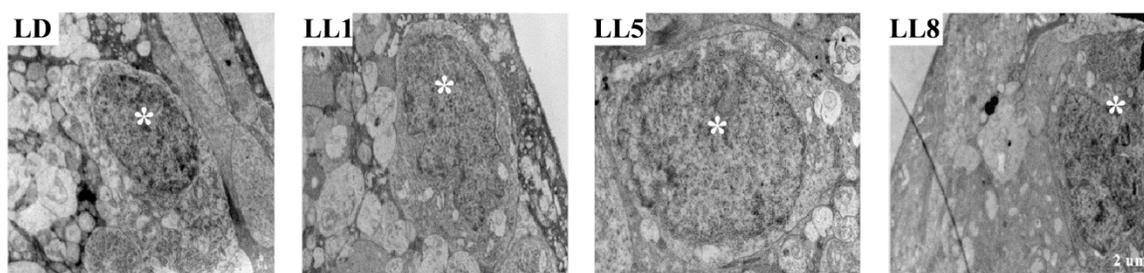


**Figura 16**|Cuantificación del número de núcleos de CG. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. Test no paramétrico de Kruskal- Wallis. n= 5 animales por grupo.

Para evaluar de forma más exhaustiva si esta población celular está sujeta a un proceso de muerte celular que no se revela en la determinación del número de núcleos, se estudió también el mecanismo de fragmentación del ADN mediante el ensayo de TUNEL. En la Figura 15 se presenta una imagen representativa del ensayo de TUNEL realizado para

evaluar la muerte celular en toda la retina, a diferentes días de exposición a la luz constante. Este estudio permitió revelar que la capa de CG no presenta células TUNEL-positivas, evidenciando la ausencia de muerte celular en esta población.

Finalmente, estos resultados se vieron reforzados por el análisis ultraestructural mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, en donde se pudo evidenciar que esta población celular conserva su morfología normal, independientemente del tratamiento con luz (Figura 17).



**Figura 17** | Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de retinas de animales control (LD) y expuestos 1, 5 y 8 días a luz (LL1, 5 y 8). Los \* indican los núcleos de las CG. Barra: 2  $\mu$ m.

Los resultados detallados hasta aquí, indican que la exposición constante a luces LED tiene efectos diferenciales dependientes de la población celular bajo estudio. Teniendo un efecto nocivo sobre la supervivencia de conos y bastones mientras que no afecta la de células ganglionares. No obstante, no se puede descartar que la exposición a luz LED de forma constante por más días desencadene finalmente en la muerte de estas células.

### **3.2 Estudio de la funcionalidad de la retina de animales expuesto a diferentes días de luz constante**

La ERG, es una técnica no invasiva cuyo registro refleja el estado funcional de las capas medias y externas de la retina y su alteración suele ser debida al daño funcional o histológico de esa estructura, constituyéndose en una herramienta útil para diagnósticos precoces de gran importancia<sup>91</sup>. Mediante la utilización de esta herramienta diagnóstica, se

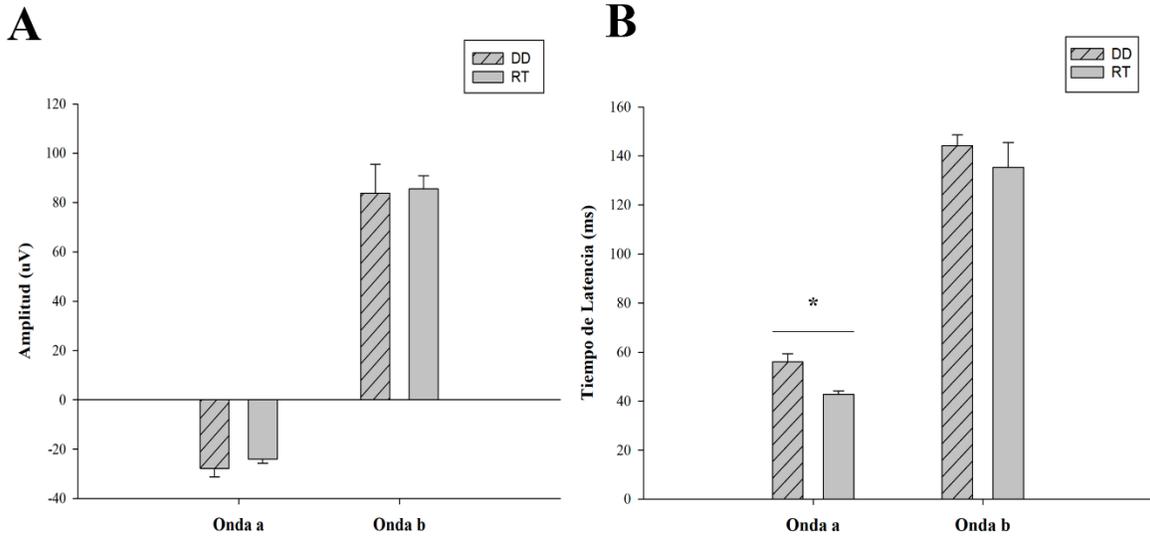
decidió evaluar la funcionalidad de fotorreceptores visuales mediante la obtención de señales electroretinográficas escotópicas en animales expuestos a luz por diferentes días. Los resultados mostrados en esta sección corresponden a los datos obtenidos a partir del análisis de las señales en el dominio de tiempo, el cual permite identificar los principales componentes de las señales ERG; las ondas “a” y “b” correspondientes a la respuesta de células bipolares y bastones respectivamente, por sus amplitudes y tiempos de latencia (Figura 11).

El análisis cuantitativo de la comparación de los parámetros correspondientes a los grupos control (Tabla 6), reflejó una diferencia estadísticamente significativa únicamente en el tiempo de latencia de la onda “a” entre los dos grupos que fueron evaluados, siendo el mismo mayor para el control DD respecto al RT [(ANAVA a una vía, \*p =0.0006, test Post Hoc de Tukey), (Figura 18 A y B)].

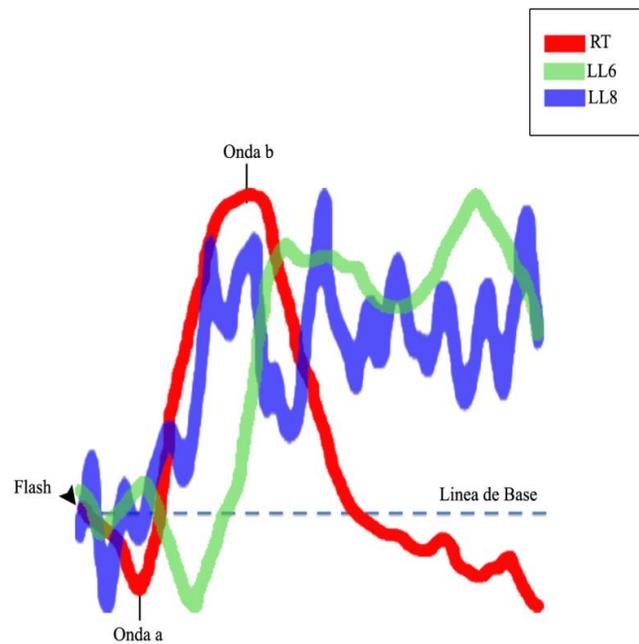
<b>Grupo</b>	<b>Componente</b>	<b>Amplitud (<math>\mu\text{V}</math>)</b>	<b>Tiempo de latencia (ms)</b>
DD (n=7)	Onda-a	-27.82 $\pm$ 8.1	56 $\pm$ 14.18
	Onda-b	83.77 $\pm$ 29.63	135.43 $\pm$ 20.16
RT (n=35)	Onda-a	-24.1 $\pm$ 9.27	42.74 $\pm$ 7.19
	Onda-b	85.55 $\pm$ 31.50	144.26 $\pm$ 27.24

**Tabla 6.** Análisis de señales ERG escotópicas para animales Control DD y RT. Cuantificación de las amplitudes y tiempos de latencia de las ondas “a” y “b”. Los datos se presentan como media  $\pm$  EE.

Luego de comparar los parámetros entre los dos grupos control utilizados, se compararon los grupos experimentales respecto a los grupos control. Este análisis reveló, en líneas generales, que la exposición constante a luz produce una disminución en las amplitudes, mientras que los tiempos de latencia tienden a aumentar, alcanzando ambos parámetros registros abolidos en el dominio del tiempo en animales expuestos 6 y 8 días a luz (Figura 19), de modo que los componentes principales no son fácilmente identificables. Por esta razón no se presentan valores para estos grupos experimentales (Tabla 7).



**Figura 18** | Cuantificación de las amplitudes (A) y tiempos de latencia (B) de las ondas “a” y “b”, para los grupos control DD y RT. El tamaño muestral (n) se especificó en la Tabla 6, para cada grupo. Los datos se presentan como media  $\pm$  EE. \*:  $p = 0.0006$ , ANAVA a una Vía seguida por un test Post Hoc de Tukey.



**Figura 19** | Respuesta electroretinográfica escotópica de animales control (RT) y expuestos 6 y 8 días a luz (LL6 y 8).

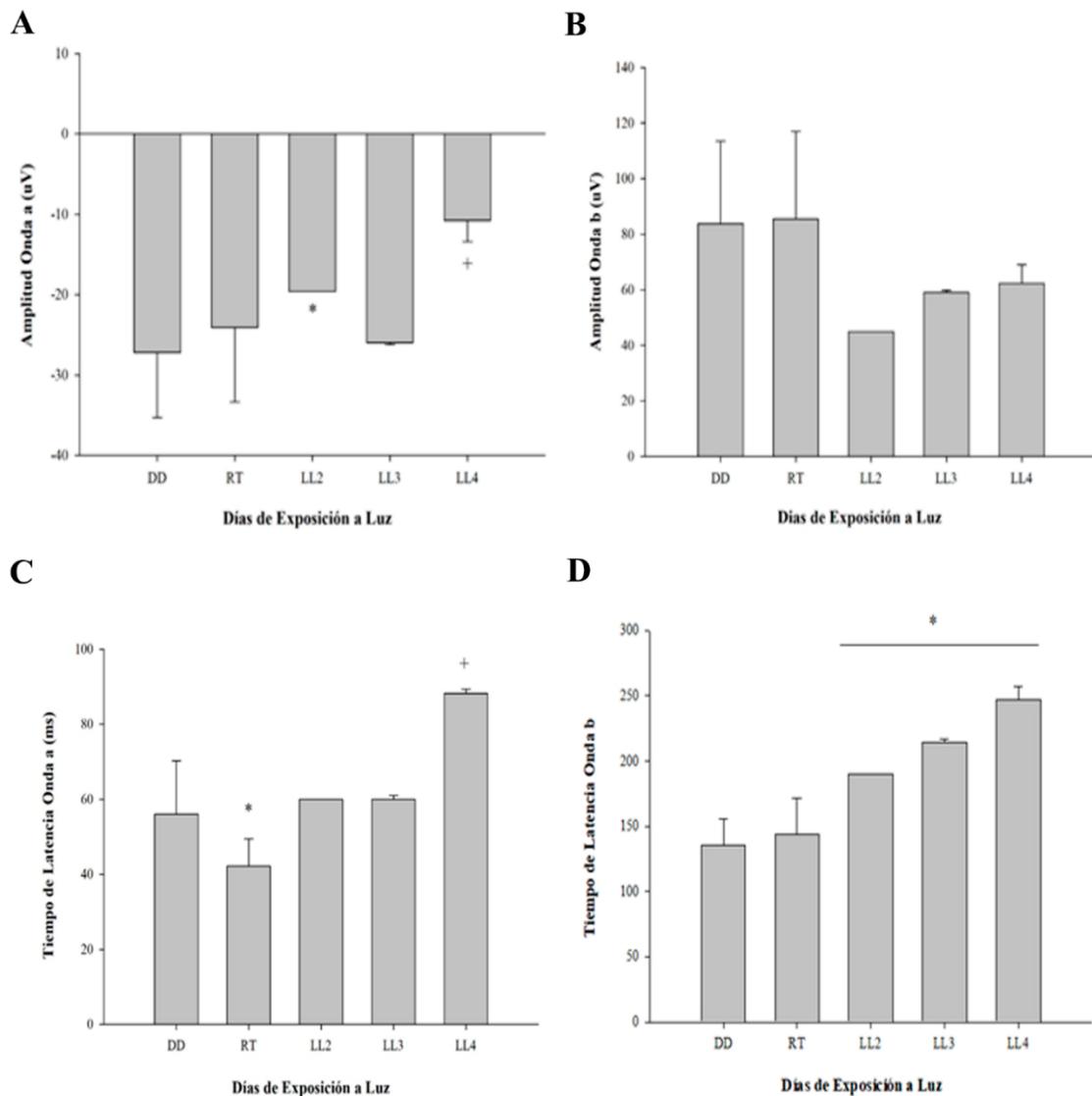
Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en la amplitud de la onda “a” en los registros pertenecientes a animales expuestos por 4 días a luz, respecto a DD y RT (ANAVA a una vía, \*:  $p=0.0030$  Vs DD y RT, test Post Hoc de Tukey). Sin embargo, no se encontraron diferencias para la amplitud de la onda “b” entre los diferentes grupos experimentales [(ANAVA a una vía,  $p<0.05$  Vs DD y RT, test Post Hoc de Tukey), (Figura 20 A y B)].

El análisis de los tiempos de latencia, reveló un aumento para ambas ondas, el cual resultó estadísticamente significativo a partir del cuarto y segundo día de exposición a luz para las ondas “a” y “b” respectivamente, respecto a los grupos control analizados [(ANAVA a una vía,  $p<0.05$  Vs DD y RT, test Post Hoc de Tukey), (Figura 20 C y D)].

Grupo	Componente	Amplitud ( $\mu\text{V}$ )	Tiempo de latencia (ms)
LL1 (n=1)	Onda-a	-19.65	36
	Onda-b	93.1	133
LL2 (n=3)	Onda-a	-20	60
	Onda-b	45	190
LL3 (n=7)	Onda-a	$-25.99\pm 0.2$	$60\pm 0.94$
	Onda-b	$59\pm 0.9$	$214.67\pm 2.31$
LL4 (n=7)	Onda-a	$-10.77\pm 2.62$	$88.2\pm 1.1$
	Onda-b	$62.39\pm 6.63$	$247.33\pm 7.53$

**Tabla 7** | Cuantificación de las amplitudes y tiempos de latencia de las ondas “a” y “b” para animales expuestos a luz de 1 a 4 días (LL1-LL4). El tamaño muestral (n) se especifica en la tabla para cada grupo. Los datos se presentan como media  $\pm$  EE.

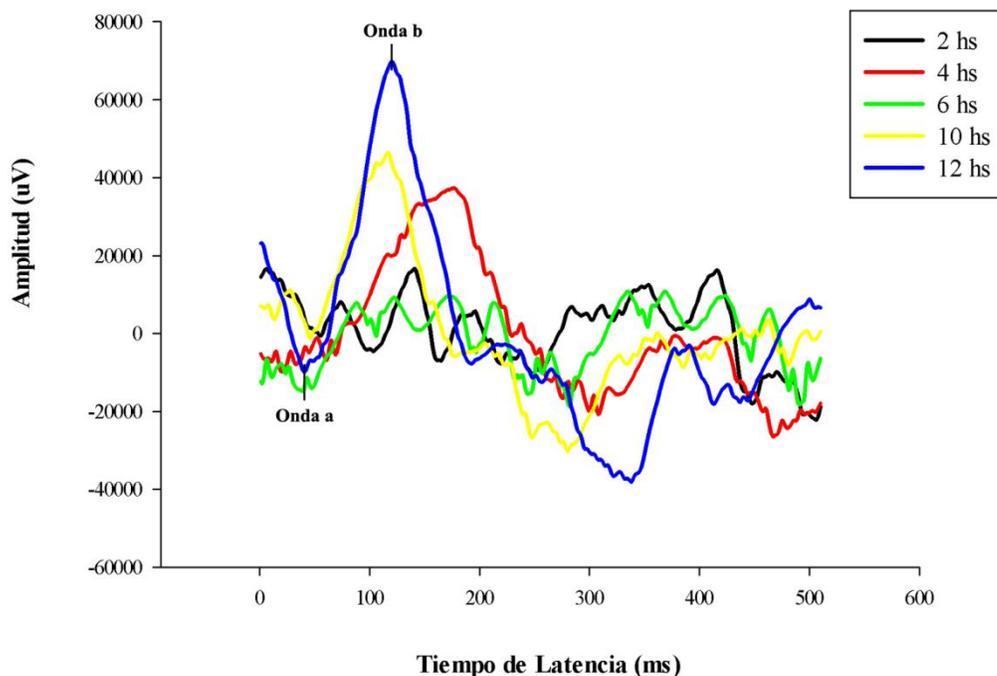
A partir de los resultados detallados en esta sección, se puede concluir que el modelo de DR evaluado, produce daño funcional a nivel de bastones y células de la retina interna. Estas alteraciones se hacen notables principalmente a partir del cuarto día (LL4) de exposición a luz, es decir, previo a que la población de células fotorreceptoras presente una disminución significativa debido a la muerte de las mismas.



**Figura 20** | Cuantificación de las amplitudes y tiempos de latencia de las ondas “a” y “b”, para animales control (RT y DD) y expuestos 3 y 4 días a luz (LL3 y 4 respectivamente). **A.** Amplitud de la onda “a”. **B.** Amplitud de la onda “b”. **C.** Tiempo de latencia de la onda “a”. **D.** Tiempo de latencia de la onda “b”. Los datos se presentan como media  $\pm$  EE. \*=  $p < 0.05$  Vs DD. +=  $p < 0.05$  Vs DD y RT. ANOVA a una vía seguida por test post hoc de Tukey.

### 3.2.1 Protocolo de Descanso

Con el objetivo de determinar la cinética de DR, se analizaron registros ERG escotópicos de animales expuestos a un protocolo de luz con diferentes períodos diarios de oscuridad (ver sección 2.6.3 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 21 los animales pertenecientes al grupo 10 h y 12 h (expuestos 8 días a luz constante, con un período de oscuridad diario de 10 o 12 h respectivamente) presentaron señales ERG típicas, con amplitudes y tiempos de latencia de ambas ondas similares a las obtenidas para los grupos control DD, RT y LD. A medida que el periodo de descanso diario disminuyó, las señales comenzaron a mostrar registros abolidos, que no permitieron identificar ni la amplitud ni el tiempo de latencia de las ondas “a” y “b”.



**Figura 21** | Señales ERG representativas obtenidas para el protocolo de descanso. n= 3 animales por grupo experimental.

### **3.3 Estudio de los efectos del modelo de DR sobre diferentes tipos de Opsinas**

Es conocido que el fenómeno de daño retinal por exposición a luz es un proceso mediado por los pigmentos visuales<sup>63</sup>.

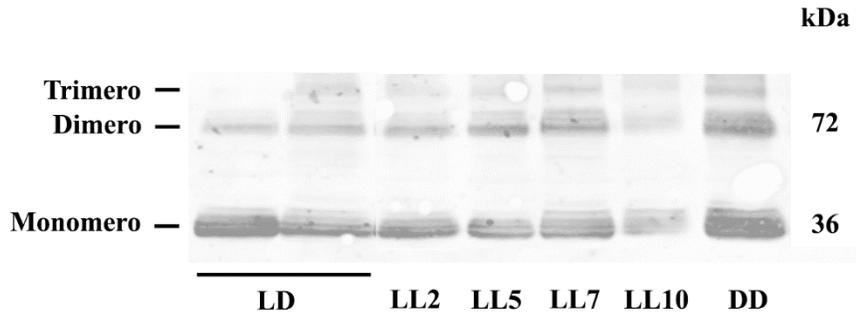
En base a esto y, debido a que el objetivo principal de este trabajo de tesis es estudiar los posibles efectos nocivos de la exposición prolongada a luz, agente activador de los fotorreceptores, se decidió evaluar si ese exceso de estimulación visual tiene efectos sobre Rodopsina, Melanopsina y Neuropsina, todas opsinas predominantes en las neuronas bajo estudio.

#### **3.3.1 Análisis de Rodopsina**

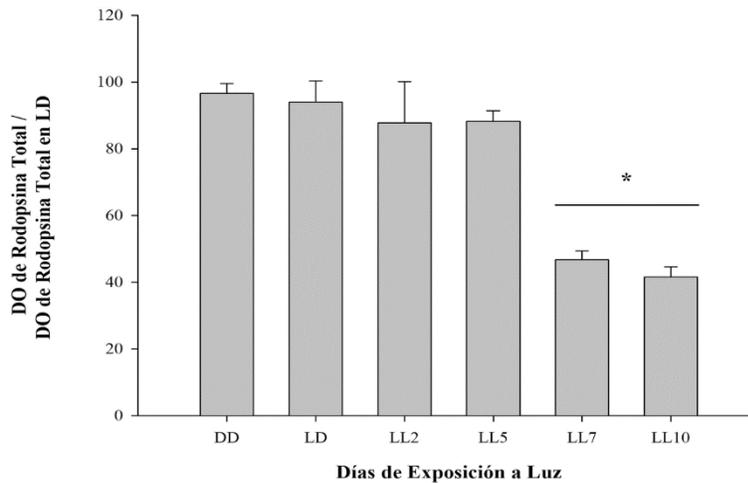
Debido a que el modelo de DR propuesto produce la muerte de bastones, se evaluó el efecto sobre la expresión y fosforilación de Rodopsina. El análisis de la expresión de Rodopsina mediante Western Blot (Figura 22 A) y la posterior cuantificación densitométrica (Figura 22 B), reveló una disminución estadísticamente significativa en animales expuestos a luz por 7 días respecto a los controles DD y LD. Es importante destacar, que esta disminución coincide con la disminución en el número de núcleos de la CNE en este grupo experimental. Esto sugiere que el modelo de DR utilizado no produce efectos sobre la expresión de esta opsina.

Posteriormente se evaluaron los efectos de la exposición a luz en la fosforilación de Rodopsina en el residuo Ser<sup>334</sup> en fracciones de SE y pellet (P). Los resultados de este análisis (Figura 23 A) revelaron un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de opsina fosforilada en dicho residuo, el cual resultó estadísticamente significativo luego de 7 días de exposición constante a luz (Figura 23 B). En mamíferos, dependiendo de las especies, se han identificado seis o siete sitios potenciales de fosforilación de rodopsina<sup>30</sup>, siendo Ser<sup>334</sup> y Ser<sup>338</sup> los principales sitios para la fosforilación *in vivo* de esta opsina<sup>92</sup>. La fosforilación se produce de manera secuencial y se correlaciona con el grado de iluminación, produciendo la unión de la opsina a Arr y la posterior desensibilización del receptor<sup>93</sup>.

**A**

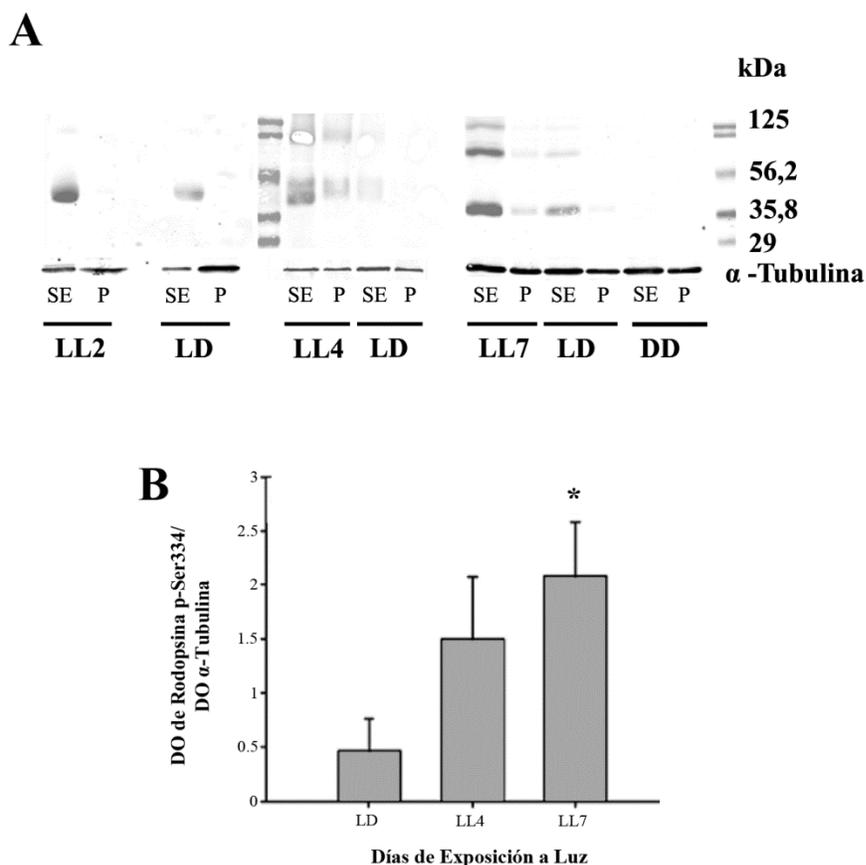


**B**



**Figura 22** | Análisis de la expresión de Rodopsina en retinas de ratas expuestas a luz de baja intensidad. **A.** Expresión de Rodopsina detectada mediante WB con un anticuerpo específico que muestra las bandas de isoformas predichas en diferentes momentos del tratamiento con luz (LL, 1, 2, 5, 7 y 10 días) y controles (DD y LD). En el margen izquierdo se muestran las bandas correspondientes a los diferentes grados de isomerización de la opsina. **B.** Cuantificación de las densidades ópticas (DO) de las bandas correspondientes a las tres isoformas detectadas (Rodopsina total), mostrada como expresión relativa y normalizada respecto al contenido de Rodopsina total en LD. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*=  $p < 0.05$  Vs DD y LD. ANAVA a una Vía seguida por un Test Post Hoc de Duncan.  $n = 5$  animales por grupo.

En base a esto y a los resultados obtenidos luego del estudio de la fosforilación de esta opsina, se puede concluir que el aumento producido como consecuencia de la exposición a luz puede ser un mecanismo de protección, inactivando la opsina al fosforilarse, frente al potencial daño de activación constante del mecanismo de fototransducción.



**Figura 23|** Análisis de la expresión de Rodopsina fosforilada en serina 334 en retinas de ratas expuesta a luz de baja intensidad. **A.** Expresión de Rodopsina fosforilada detectada mediante WB con un anticuerpo específico que muestra las bandas de isoformas predichas en diferentes momentos del tratamiento con luz (LL, 2, 4 y 7 días) y controles (DD y LD), SE: Segmento Externo, P: Pellet. **B.** Cuantificación de la densidad óptica (DO) de la banda correspondiente a Rodopsina p-Ser<sup>334</sup>, mostrada como expresión relativa y normalizada respecto a  $\alpha$ -Tubulina en LD. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*= p=0.015 Vs LD. ANAVA a una Vía seguida por un Test Post Hoc de Duncan. n= 2 animales por grupo de tres experimentos independientes.

### 3.3.2 Análisis de Melanopsina (OPN4)

Las células ipRGCs son, al igual que conos y bastones, células con capacidad fotorreceptora debido a la presencia de Melanopsina (OPN4)<sup>94</sup>. Trabajos previos han demostrado el importante rol que cumplen estas células en funciones visuales no formadoras de imágenes, como la regulación de los ritmos circadianos o el reflejo pupilar<sup>95</sup>. Ciertos estudios, han sugerido además que la subpoblación de ipRGCs, tiene mayor resistencia a ciertos mecanismos de DR, entre los que se incluyen axotomía, excitotoxicidad mediada por NMDA y neuropatías mitocondriales ópticas<sup>95</sup>.

Conociendo que la población de CG no sufre muerte celular y, con el fin de determinar si la población de ipRGCs se ve afectada por nuestro modelo de DR, las retinas de animales expuestos a diferentes días de luz, fueron procesadas para evaluar localización y expresión de OPN4 mediante IHQ y Western Blot respectivamente.

El estudio de la localización de esta opsina reveló que la misma presenta una distribución diferencial en los diferentes grupos experimentales. En los grupos control LD y RT se localizó en los somas y dendritas de las células en estudio, al igual que en los animales expuestos un día a luz (LL1). Por el contrario, en aquellos grupos expuestos 4, 6 y 8 días a luz, la marca positiva desapareció de los procesos neuronales, quedando presente únicamente en los somas y con una mayor intensidad de marcación (Figura 24 A y B). Este resultado sugiere que la exposición a luz, produce un aumento de la expresión de OPN4 en la región del soma celular, así como una disminución en las neuritas indicando una posible internalización de esta opsina hacia el soma o una degradación en las neuritas con un concomitante aumento en la expresión en los somas.

La expresión de OPN4 se evaluó también en “flat mounts” de retinas de animales control (LD) y expuestos por 2 días a luz (Figura 25). Este análisis, al igual que el realizado por IHC, reveló que la redistribución de la opsina se produce a tiempos cortos de exposición a luz.

Con el fin de determinar los niveles de expresión total del fotorpigmento en los diferentes grupos experimentales, se realizó un análisis de la expresión del mismo mediante Western Blot (Figura 26 A) y posteriormente se cuantificó por densitometría (Figura 26 B). Los resultados revelaron un aumento estadísticamente significativo en animales expuestos a luz

por 8 días respecto al control DD (\*=  $p < 0.05$  Vs DD. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

En conjunto estos resultados indican que, si bien la exposición a luz no produce muerte de CG, la subpoblación de ipRGCs se encuentra afectada, hecho que se refleja en los cambios de localización de OPN4 a lo largo de la retina y en el aumento en la expresión de la misma a 8 días de exposición a luz.

### **3.3.3 Análisis de Neuropsina (OPN5)**

En la retina interna se ha reportado que, además de OPN4, se pueden expresar otros fotorreceptores y fotoisomerasas, entre ellas neuropsina (OPN5), la cual fue identificada en CG de ratas Wistar. En cuanto a su función, se la ha reportado como una opsina que media la fotorrecepción extrarretinal en la córnea y quizás en otros tejidos<sup>53</sup> y como participante en el entrenamiento de la retina a ciclos de luz: oscuridad, de forma independiente de conos, bastones y OPN4.

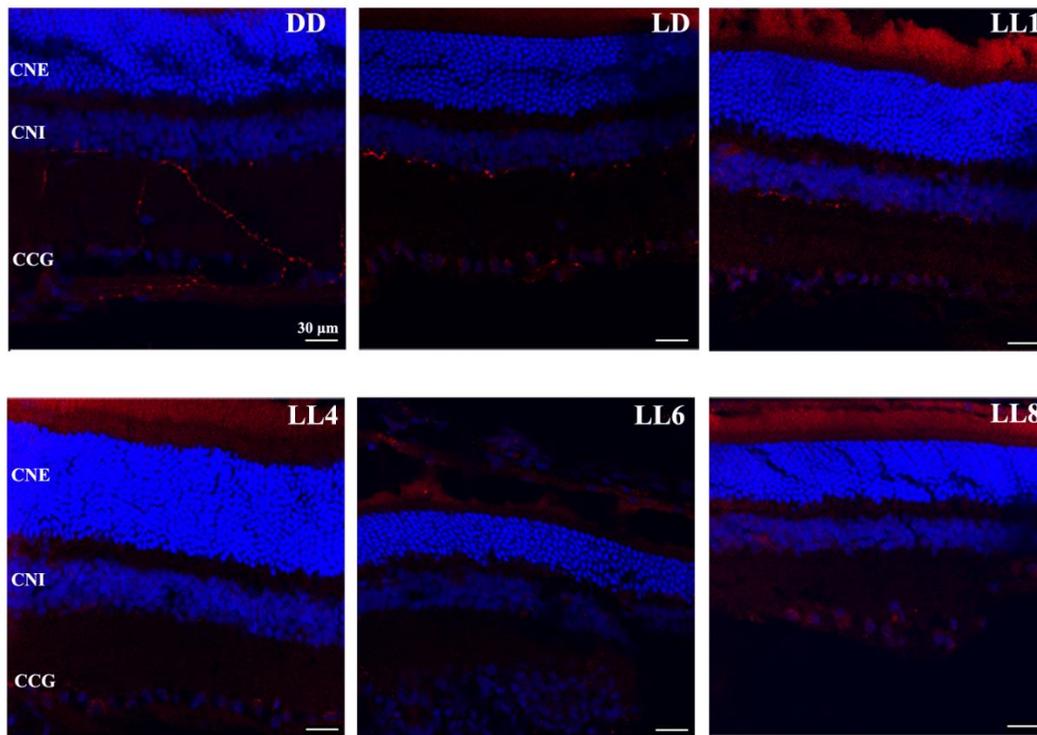
Con el fin de evaluar si el modelo de DR tenía algún efecto sobre esta opsina, se decidió evaluar la localización y expresión de la misma en los diferentes grupos experimentales.

El análisis mediante IHQ reveló presencia de OPN5 en CG, tanto en animales control (LD y DD) como en aquellos expuestos por diferentes días a luz. Además, esta opsina también se localizó en la CNI de retinas de animales expuestos a luz (Figura 27).

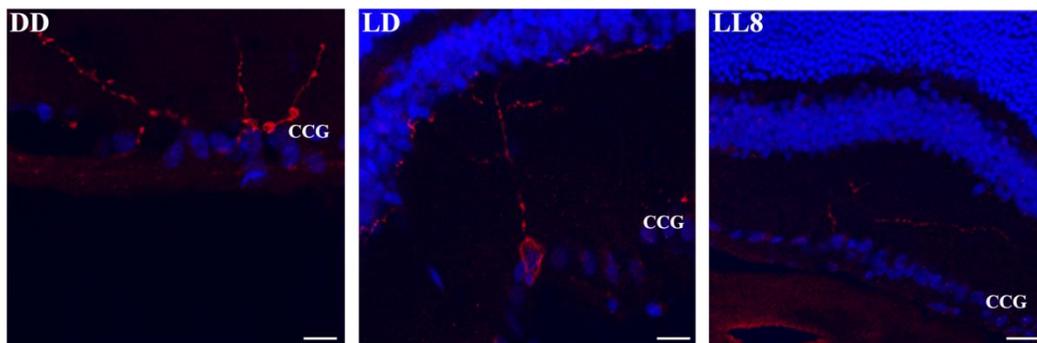
Posteriormente, con el objetivo de evaluar la existencia de cambios en la expresión de esta proteína, se realizó un análisis mediante Western Blot. El análisis cuantitativo densitométrico no reveló diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de esta opsina entre los diferentes grupos experimentales [(Figura 28), (Resultado no mostrado)].

Si bien la función fotorreceptora de OPN5 en mamíferos, aún no se conoce completamente, Buhr y col., demostraron que esta opsina es necesaria para el fotoentrenamiento del reloj circadiano local de la retina, el cual regula muchas funciones importantes, como por ejemplo el desprendimiento de discos de bastones<sup>96</sup>. En este sentido, los cambios encontrados en la localización y expresión de esta opsina debidos al estímulo continuo de luz azul podría afectar la regulación de los ritmos circadianos en la retina, a nivel local.

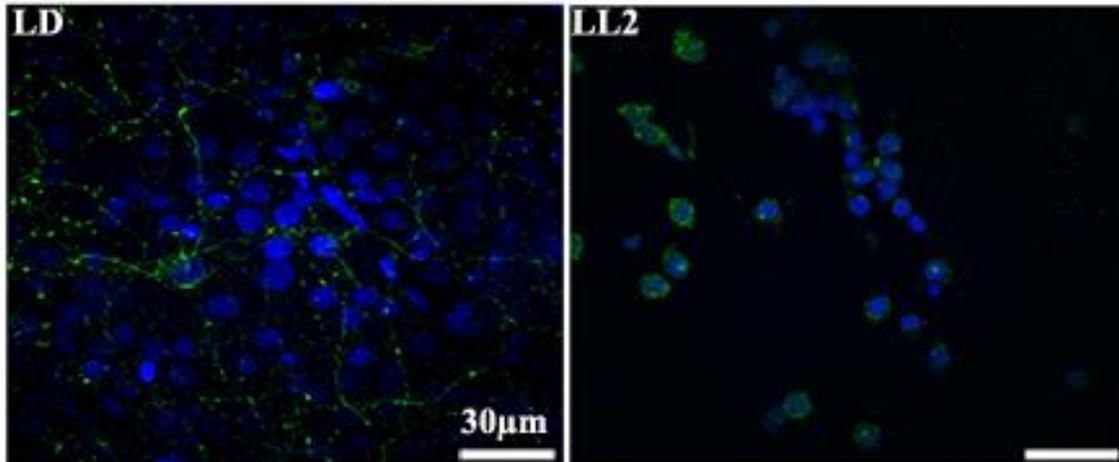
**A**



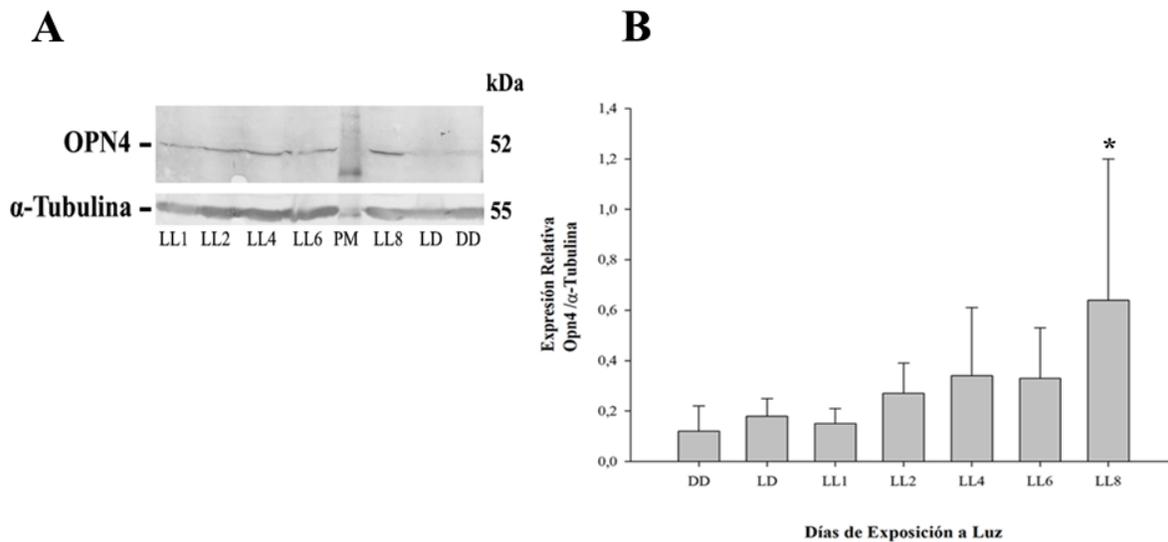
**B**



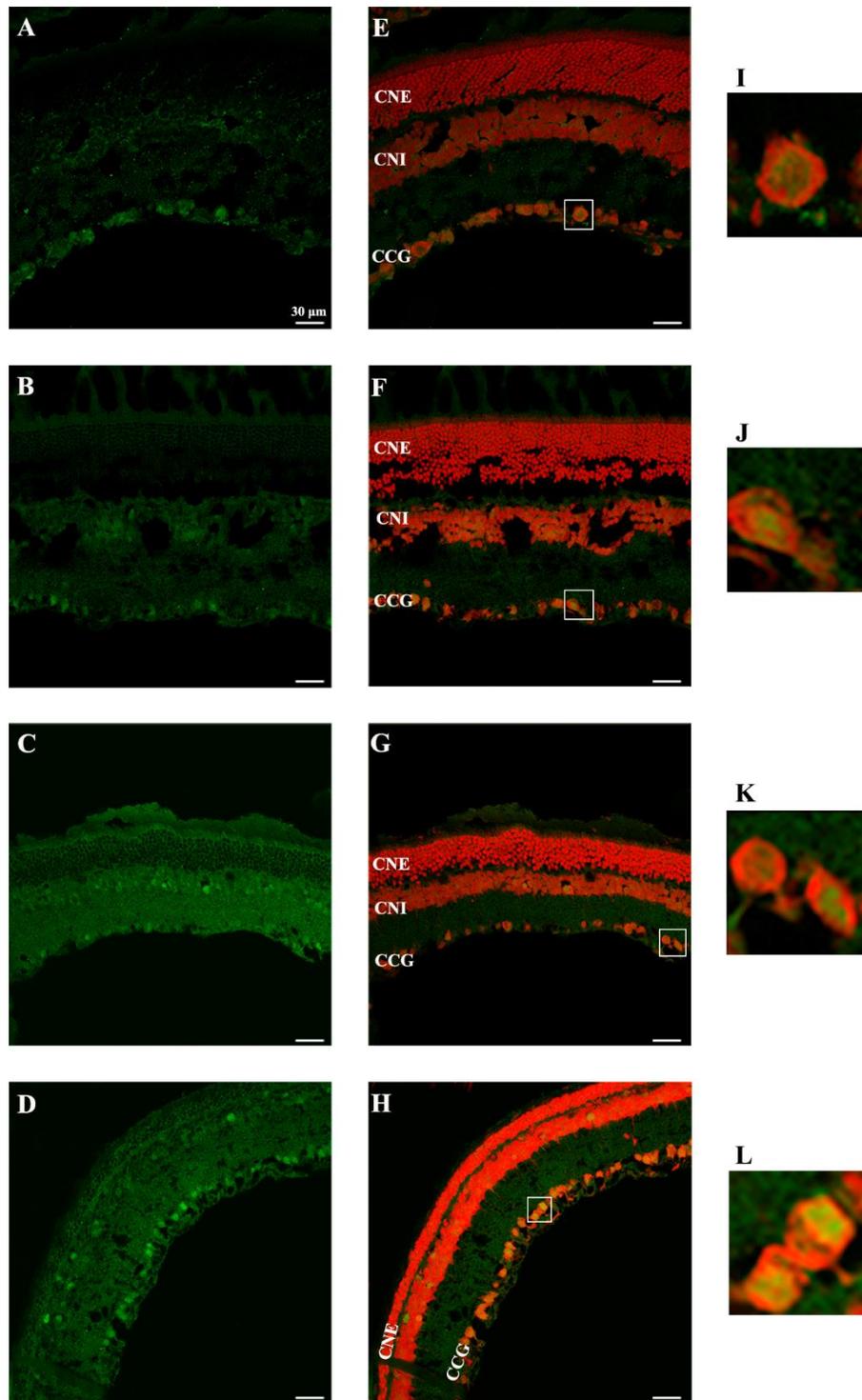
**Figura 24** | Expresión de OPN4 en cortes de retinas de animales control (DD y LD) y expuestos a luz constante por 1, 4 6 y 8 días (LL1-LL8). Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes por grupo experimental. Rojo: tinción con anticuerpo  $\alpha$ - OPN4; Azul: Tinción nuclear con DAPI. Barra = 30  $\mu$ m. **A.** Imágenes tomadas con un aumento de 20X. **B.** Imágenes tomadas con un aumento de 60X. CNE: Capa Nuclear Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares.



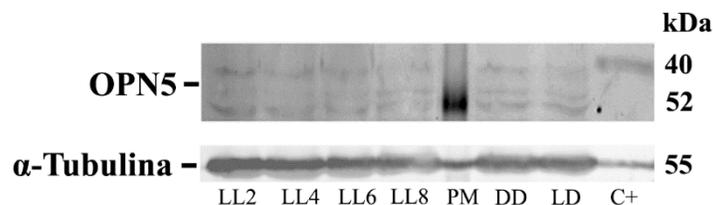
**Figura 25** | Expresión de OPN4 en Flat mounts de retina de animales control (LD) y expuestos a luz constante por 2 días (LL2). Verde: tinción con anticuerpo  $\alpha$ - OPN4; Azul: tinción nuclear con DAPI. Barra: 30 $\mu$ m. Aumento: 100 X.



**Figura 26** | Análisis de la expresión de OPN4 en retinas de animales expuestos a luz. **A.** Expresión de OPN4 detectada mediante Western Blot con un anticuerpo específico que muestra las bandas de isoformas predichas en diferentes momentos del tratamiento con luz (LL, 1, 2, 4, 6 y 8 días) y controles (LD y DD). PM: Marcador de Peso Molecular. **B.** Cuantificación de la banda correspondiente a OPN4 mostrada como expresión relativa y normalizada por  $\alpha$ -tubulina. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*=  $p < 0.05$  Vs DD. Test no paramétrico de Kruskal- Wallis.  $n=3$  animales por grupo experimental.



**Figura 27** | Expresión de OPN5 en cortes de retinas de ratas. **A-D**. Tinción con anticuerpo  $\alpha$ -OPN5 en retinas de animales control (DD y LD) y expuestos a luz constante por 2 y 8 días (LL2 y LL8), respectivamente. **E-H**. Tinción con anticuerpo  $\alpha$ -OPN5 + tinción nuclear con IP en retinas de animales control (DD y LD) y expuestos a luz constante por 2 y 8 días (LL2 y LL8), respectivamente. **I-L**. Microfotografías a mayor aumento correspondientes a las zonas contorneadas en las imágenes E-H. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes por grupo experimental. Barra = 30  $\mu$ m. Aumento 20X.



**Figura 28|** Análisis de la expresión de OPN5 en retinas de animales expuestos a luz, detectada mediante WB con un anticuerpo específico que muestra las bandas de isoformas predichas en diferentes momentos del tratamiento con luz (LL, 2, 4, 6 y 8 días) y controles (LD y DD). PM: Marcador de Peso Molecular. C+: Control Positivo.

### 3.4 Caracterización del Mecanismo de Muerte Celular

La muerte de los fotorreceptores es la vía final en muchas enfermedades degenerativas retinales, incluidas DMRE, RP y el desprendimiento de retina<sup>97</sup>. Numerosos estudios proponen a la apoptosis como la principal vía de muerte en estas enfermedades, sin embargo, hay evidencias que sugieren la participación de otra vía, denominada necrosis programada o necroptosis<sup>98</sup>.

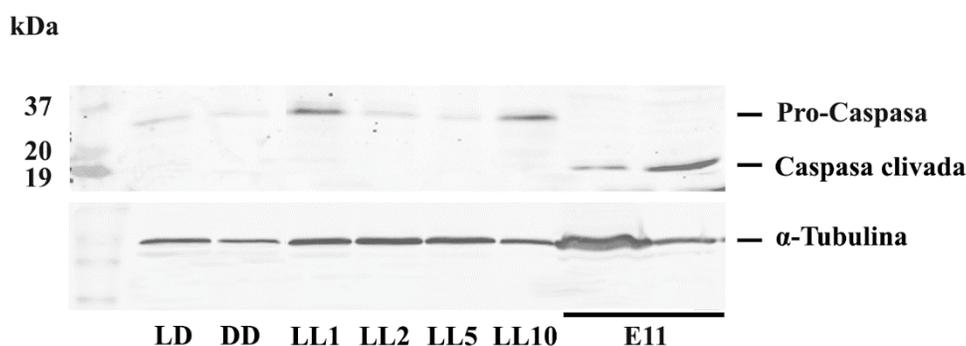
La DR inducida por la luz es un método establecido para inducir apoptosis de los fotorreceptores, el cual conduce a una degeneración más rápida de los mismos, que aquella observada en ciertos modelos genéticos animales<sup>97</sup>.

Como se detalló anteriormente (Sección 3.1), nuestro modelo de DR se caracteriza, entre otras cosas, por desencadenar muerte de conos y bastones, mientras que la retina interna permanece intacta. En base a esto, y con el fin de evaluar qué mecanismos de muerte celular están involucrados en nuestro modelo de DR, se decidió evaluar la presencia y actividad de Caspasa-3 en animales expuestos a luz constante por diferentes días.

#### 3.4.1 Análisis de Expresión de Caspasa 3

El rol de las caspasas en el daño retinal por luz, parece ser específico del modelo animal utilizado. Por ejemplo, se ha demostrado que, en retinas de ratas, los niveles de ARNm de caspasa-3 aumentan rápidamente durante la exposición a luz intensa, mientras que la inhibición de su actividad previene el daño. Además, en algunos casos, su activación precede o coincide con la fragmentación del ADN, mientras que, en otros, no parece estar activa<sup>87</sup>.

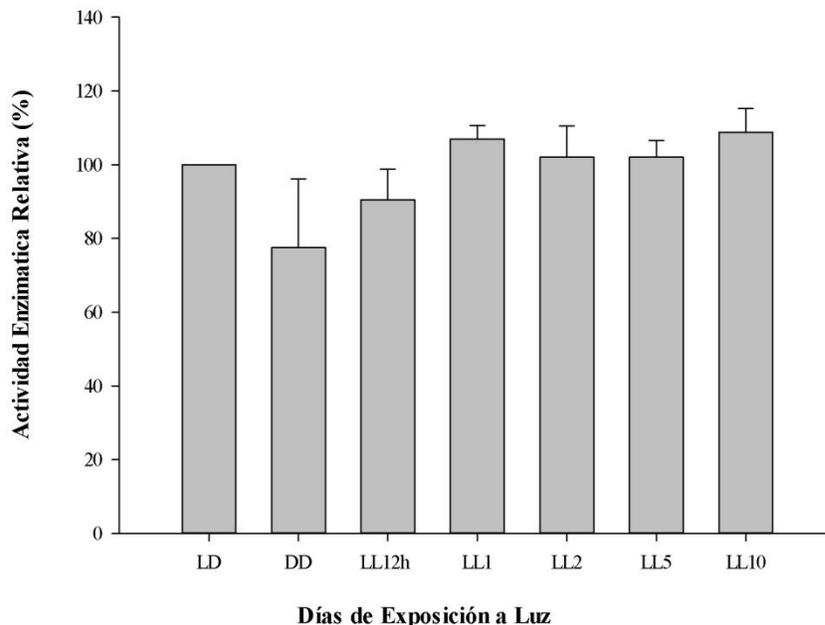
Con el fin de dilucidar si Caspasa 3 participa en el mecanismo de muerte en nuestro modelo, se decidió evaluar sus niveles de expresión mediante Western Blot. La proteólisis de pro-caspasa 3 (32 kDa) a Caspasa 3 activa (17 kDa) es un paso indispensable para su activación<sup>99</sup>. El análisis de la expresión de pro-caspasa 3 en retinas de animales expuestos a luz por diferentes periodos de tiempo reveló que la misma se encontraba presente en todos los grupos estudiados. Además, se encontró que la forma activa de esta proteína (Caspasa 3 clivada) no estaba presente en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, sin embargo, la misma si se encontró en el control positivo de retina de pollo en estadio embrionario 11 [(E11), (Figura 29)].



**Figura 29|** Análisis de expresión de Caspasa-3. Western Blot mostrando la expresión de pro- Caspasa y Caspasa clivada en retinas de animales control (LD y DD) y expuestos a luz por 12h, 1, 2, 5 y 10 días (LL). E11: control positivo, retinas de pollos en estadio embrionario 11. La imagen es representativa de 5 experimentos diferentes.

### 3.4.1 Determinación de la actividad enzimática de Caspasa 3

La actividad de Caspasa 3 se evaluó mediante el estudio de su capacidad de “clivar” uno de sus sustratos (DEVD-pNA). En concordancia con los resultados obtenidos para la expresión de esta enzima, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su actividad entre los grupos estudiados (Figura 30). En conjunto, estos resultados sugieren que la muerte de fotorreceptores en este modelo de DR no implicaría la participación de esta Caspasa, es decir, es caspasa-3 independiente.



**Figura 30** | Actividad de Caspasa-3. Los resultados, presentados como porcentajes, corresponden a la media  $\pm$  DE de absorbancia detectada en cada grupo experimental (LL) y control (DD), normalizada respecto al control LD. n= 2 animales por grupo, de 4 experimentos independientes. Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p=0.7631$ ).

### 3.5 Estudio del Estado Redox en retinas de animales expuestos a luz constante

El estrés oxidativo se define como una desregulación entre la producción de ROS y los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos. Las ROS, cuando están presentes en bajas concentraciones, desempeñan una función crítica en la homeostasis celular. Sin embargo, su exceso causa disfunción celular, peroxidación proteica y lipídica, daño en el ADN y, eventualmente, conduce a muerte celular. El estrés oxidativo puede contribuir a la toxicidad neuronal y parece estar involucrado tanto en lesiones agudas como en afecciones neuropatológicas crónicas<sup>100</sup>. La retina es un tejido adaptado para capturar fotones y, por su función, es altamente vulnerable a sufrir estrés oxidativo. La producción de ROS en respuesta al estrés oxidativo se ha indicado como una etapa en la vía final común que conduce a la neurotoxicidad en varias enfermedades oculares agudas y crónicas. Un aumento temprano y sostenido de las ROS intracelulares precede a la interrupción del potencial de membrana mitocondrial, la condensación nuclear, la fragmentación del ADN y

la contracción celular, todos eventos bien caracterizados de la muerte apoptótica de fotorreceptores<sup>101</sup>. Ciertos estudios *in vitro* han reportado la muerte de células retinales por apoptosis independiente de la activación de caspasas, en donde la formación de ROS y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental ya que producen la inactivación de estas proteasas por oxidación<sup>99,102,103</sup>.

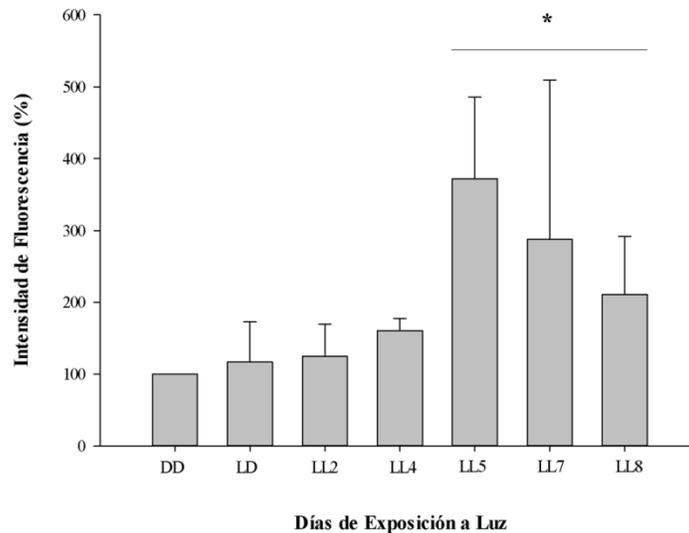
En función de estos antecedentes y de los resultados obtenidos luego del estudio de los mecanismos de muerte celular en nuestro modelo de DR, los cuales evidencian un mecanismo de muerte celular independiente de Caspasa-3, se decidió evaluar la producción de ROS y el estado redox en retinas de animales expuestos a luz constante.

### **3.5.1 Determinación de los niveles de Especies Reactivas del Oxígeno**

Como punto de partida y, con el objetivo de determinar la cinética de los eventos de estrés oxidativo ocurridos en retinas de ratas expuestas a luz constante, se evaluó la producción de ROS mediante citometría de flujo utilizando la sonda DCFH-DA. Los resultados de este análisis (Figura 31) mostraron que el tratamiento con luz constante produjo un aumento estadísticamente significativo en la formación de ROS en animales expuestos de 5 a 8 días a luz, respecto a los controles DD y LD ( $p=0,0089$ ).

### **3.5.2 Estudio de la Actividad de la Enzima Antioxidante Catalasa**

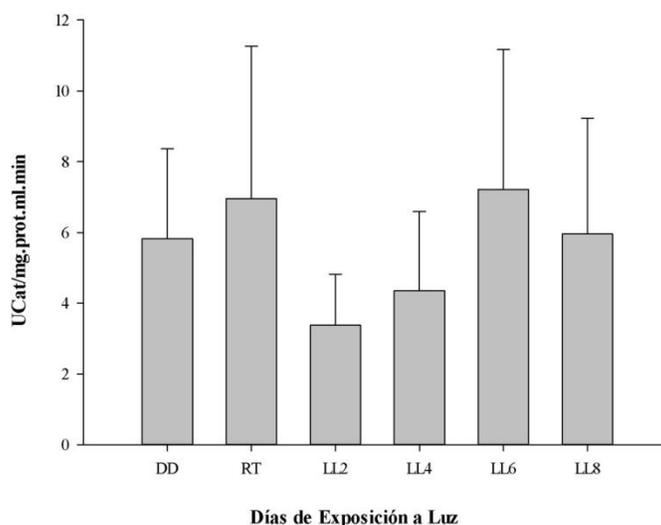
En función del aumento en las ROS a partir del quinto día de exposición a luz, el siguiente paso fue evaluar si la catalasa, enzima que ha sido indicada como un importante factor de defensa antioxidante a nivel retinal<sup>104,105</sup>, participaba en la prevención de la generación de



**Figura 31|** Determinación de ROS mediante Citometría de flujo. Los resultados, presentados como porcentajes, corresponden a la media  $\pm$  DE de fluorescencia detectada en cada grupo experimental (LL) y control (LD), normalizada respecto al control DD.  $n = 3$  animales por grupo. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0.05$  Vs. LD y DD.

ROS. Para esto se determinaron sus niveles de actividad a lo largo de los días de exposición a luz. Los resultados del análisis de la actividad enzimática de Catalasa se presentan como UCat/ mg.prot.ml.min, siendo U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto (Figura 32). Los resultados revelaron que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y los grupos control evaluados ( $p = 0,2162$ ). Es importante destacar que esta falta de diferencias entre los diferentes grupos experimentales, es acompañada con una gran variabilidad de los valores determinados para la actividad enzimática en y entre los grupos experimentales; lo que genera una amplia dispersión de los datos. En relación a esto, se ha reportado la existencia de variaciones circadianas significativas en los niveles de oxidantes y antioxidantes durante el día tanto en animales como humanos<sup>106,107</sup>. Por ejemplo, se ha encontrado que en SNC los niveles de catalasa presentan un patrón temporal, presentando cambios a lo largo del ciclo día/ noche y siendo más bajos en la fase oscura que en la fase de luz<sup>107,108</sup>. En conjunto, estos

antecedentes sumados al hecho de que los animales, al estar en condiciones constantes de iluminación, podrían presentar sus ritmos alterados, pueden ser un indicio del porque no se encuentran diferencias entre los grupos. Esto, además, podría indicar que esta alteración puede tener un rol significativo en la regulación del estado redox celular.



**Figura 32** | Actividad enzimática de catalasa. Los valores se presentan como media  $\pm$  DE. n = 6 animales por grupo. ANAVA a una vía. p=0.2162.

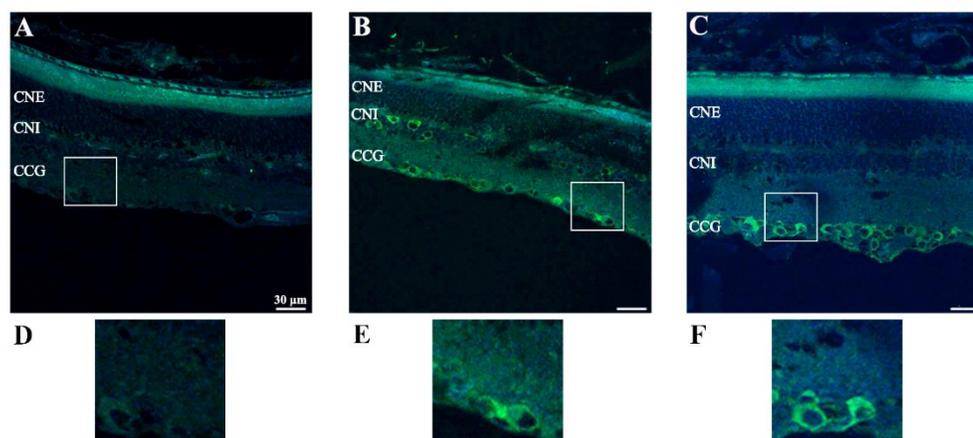
### 3.5.3. Estudio de la Formación de Gránulos de Estrés en retina

Los gránulos de estrés (SG, de sus siglas en inglés), son gránulos de ARN citoplasmático cuya formación está asociada a la inhibición de la iniciación de la traducción y el desensamblaje de polisomas. La formación de estas estructuras se relaciona a la respuesta a ciertas drogas y diferentes tipos de estrés<sup>109,110</sup>. Dentro de los estresores que conducen a la formación de estas estructuras se encuentran la privación de glucosa y el estrés calórico, osmótico y oxidativo<sup>111</sup>. Ciertos estudios sugieren, además, que su composición varía frente a diferentes condiciones de estrés. La formación de SG juega un rol regulatorio activo en la respuesta frente al estrés oxidativo ya que suprime la formación de ROS, lo que resulta

fundamental para inhibir la muerte celular dependiente de ROS<sup>110</sup>. Esta actividad antioxidante de los SG es controlada por dos de sus componentes, la enzima antioxidante USP10 y su cofactor G3BP1. Bajo ciertas condiciones de estrés como por ejemplo la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se produce la formación de estas estructuras, por lo que las células son más propensas a sufrir muerte celular por apoptosis<sup>110</sup>.

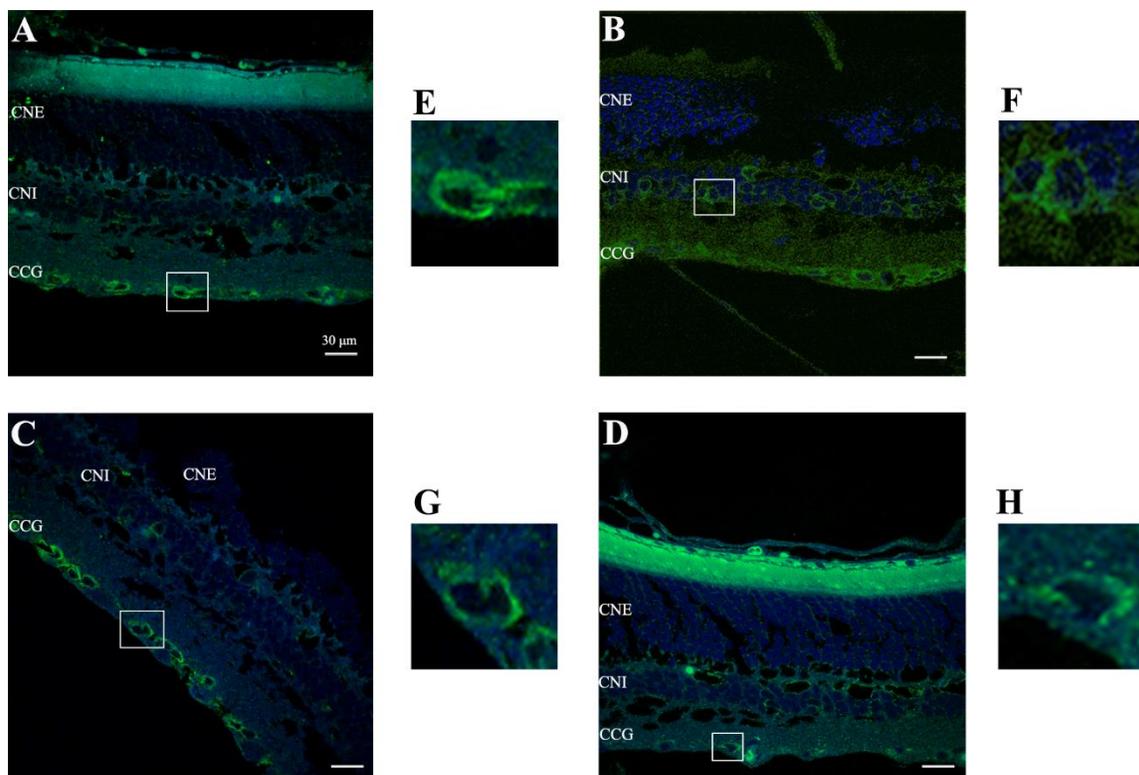
En base a estos antecedentes y teniendo en cuenta la formación de ROS encontrada en nuestro modelo a partir del quinto día de exposición a luz, se decidió evaluar la dinámica de los SG en retina a lo largo de los días de exposición a luz mediante IHQ.

Como punto de partida se decidió evaluar si existían variaciones circadianas en la presencia de SG, para ello se evaluaron retinas de animales control LD (expuestos por 7 días a ciclos de luz LED: oscuridad 12:12 h) a ZT6 y ZT 18 (ZT0: momento de encendido de la luz, ZT 12: momento de apagado de la luz). Los resultados de este análisis revelaron la presencia de SG exclusivamente en la capa de células ganglionares, sin observarse variaciones significativas en ambos tiempos estudiados (Figura 33).



**Figura 33** | Gránulos de Estrés en retinas de ratas expuestas a ciclos de luz: oscuridad 12:12 h. **A-C**: Control-, ZT6 y ZT18 respectivamente. **D-F**: Microfotografías a mayor aumento correspondientes a las zonas contorneadas en las imágenes A-C, respectivamente. Azul: Tinción nuclear con DAPI, Verde: anticuerpo  $\alpha$ - EiF3. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes por grupo experimental. Barra = 30  $\mu$ m. Aumento 20X. CNE: Capa Nuclear Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares.

Posteriormente se analizaron retinas de animales control y expuestos a luz por diferentes días. Este análisis reveló la presencia de SG en CCG y CNI, en todos los grupos estudiados (Figura 34). Es importante destacar que no se encontró presencia de estas estructuras en la CNE, en donde se produce muerte celular. Estos resultados sugieren que, en este modelo, la formación de SG se da como un mecanismo de defensa adaptativo frente al estrés celular provocado por la exposición a luz constante; promoviendo la supervivencia de células de la CNI y CG.



**Figura 34| A-D:** Gránulos de Estrés en retinas de ratas expuestas a oscuridad por 4 días (DD), a ciclos de luz: oscuridad 12:12 h por 7 días (LD) y a luz constante por 2 y 8 días (LL2-8). **E-H:** Microfotografías a mayor aumento correspondientes a las zonas contorneadas en las imágenes A-D, respectivamente. Azul: Tinción nuclear con DAPI, Verde: anticuerpo  $\alpha$ - EiF3. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes por grupo experimental. Barra = 30  $\mu$ m. Aumento 20X. CNE: Capa Nuclear Externa, CNI: Capa Nuclear Interna, CCG: Capa de Células Ganglionares.

### **3.6 Identificación y Cuantificación de Ácidos Grasos presentes en retinas de animales expuestos a luz constante**

El cerebro, luego del tejido adiposo, es el tejido con la mayor concentración de lípidos, siendo ésta mayor que la concentración de proteínas. Los tejidos nerviosos contienen entre el 50-60% de su peso seco en forma de lípidos, que consisten casi exclusivamente en fosfolípidos de membranas enriquecidos en ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs, de sus siglas en inglés) y colesterol, los cuales desempeñan funciones críticas en la estructura y función de las membranas celulares<sup>112,113</sup>. Los PUFAs, son ácidos grasos con 18-20 carbonos o más, que pueden ser categorizados en tres familias principales;  $\omega$ 6 (n-6),  $\omega$ 3 (n-3) y  $\omega$ 9 (n-9), dependiendo de la posición que ocupe el primer doble enlace del grupo metilo final del mismo<sup>114</sup>.

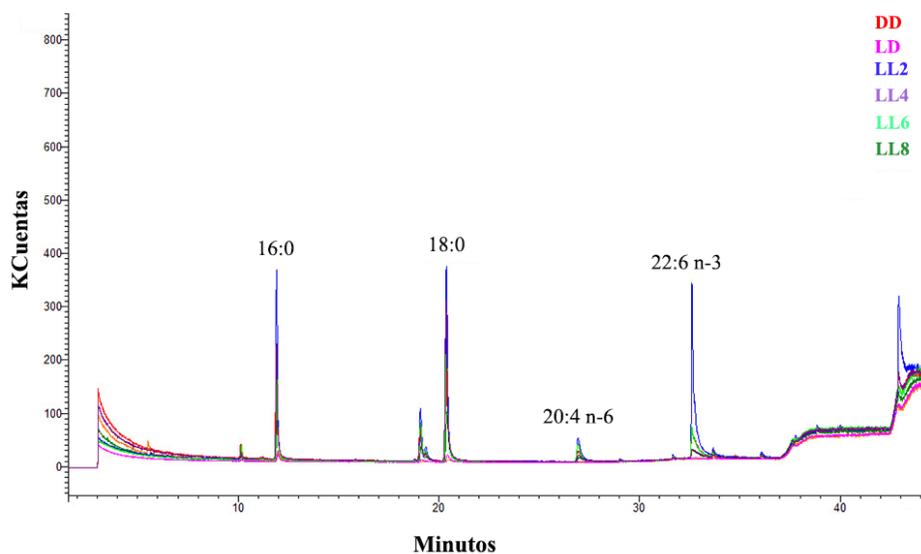
Los lípidos presentes en la retina, son únicos y cumplen un papel fundamental tanto en el correcto funcionamiento de este tejido como en ciertas enfermedades del mismo. Particularmente, la retina es un tejido altamente enriquecido PUFAs, donde el ácido graso perteneciente a la familia de los  $\omega$ -3, Ácido Docosahexaenoico [(DHA, de sus siglas en inglés); (22:6 n-3)] representa aproximadamente el 50% del total en fotorreceptores clásicos<sup>115</sup>. Específicamente, los SE de las células fotorreceptoras presentan el contenido de DHA más alto de todas las células del cuerpo humano<sup>116</sup>. El DHA es el ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LCPUFA, de sus siglas en inglés) más oxidable y, a su vez, su presencia en la retina externa lo hace propicio para su oxidación ya que esta es una zona con alta tensión de oxígeno y de exposición a luz<sup>117</sup>.

Se ha reportado que este ácido graso es fundamental para el desarrollo cerebral y retinal y ha sido implicado en diversas funciones tales como el funcionamiento de membranas excitables, memoria, biogénesis y función de fotoreceptores, cambios conformacionales en rodopsina, optimización de pasos tempranos en el ciclo de fototransducción y neuroprotección<sup>118</sup>. Esta última función se debe a que el mismo sirve como precursor de docosanoides de 22 carbonos de longitud de cadena, los cuales tienen actividad neuroprotectora y pro-homeostática<sup>119</sup>. Además, se ha demostrado que el DHA es un factor eficaz en la supervivencia de los fotorreceptores, tanto durante el desarrollo *in vitro*<sup>120,121</sup>, como frente al daño oxidativo<sup>122,123</sup>. En función de estos antecedentes y del aumento de ROS y la muerte de fotorreceptores encontrados en nuestro modelo de DR se decidió

identificar y cuantificar los ácidos grasos mayoritarios en retinas de ratas expuestas a luz constante.

### 3.6.1. Identificación

Como punto de partida se decidió evaluar el perfil de ácidos grasos retinales, con el objetivo de identificar cuáles eran las especies mayoritarias presentes en las diferentes condiciones experimentales. Los compuestos se identificaron comparando sus espectros de masas con los de la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). Este análisis permitió identificar 4 ácidos grasos principales presentes en todas las muestras analizadas; siendo estos los Ácidos Palmítico, Esteárico, Araquidónico y Docosahexaenoico. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 35, en donde se muestra una imagen representativa de los cromatogramas obtenidos.



**Figura 35** | Cromatogramas de GC-MS típicos de animales control (DD y LD) y expuestos a luz por diferentes días (LL2-8).

Además, para la identificación también se realizó una comparación entre los tiempos de retención de los ácidos grasos encontrados en el estándar comercial y aquellos encontrados en los diferentes grupos experimentales (Tabla 8).

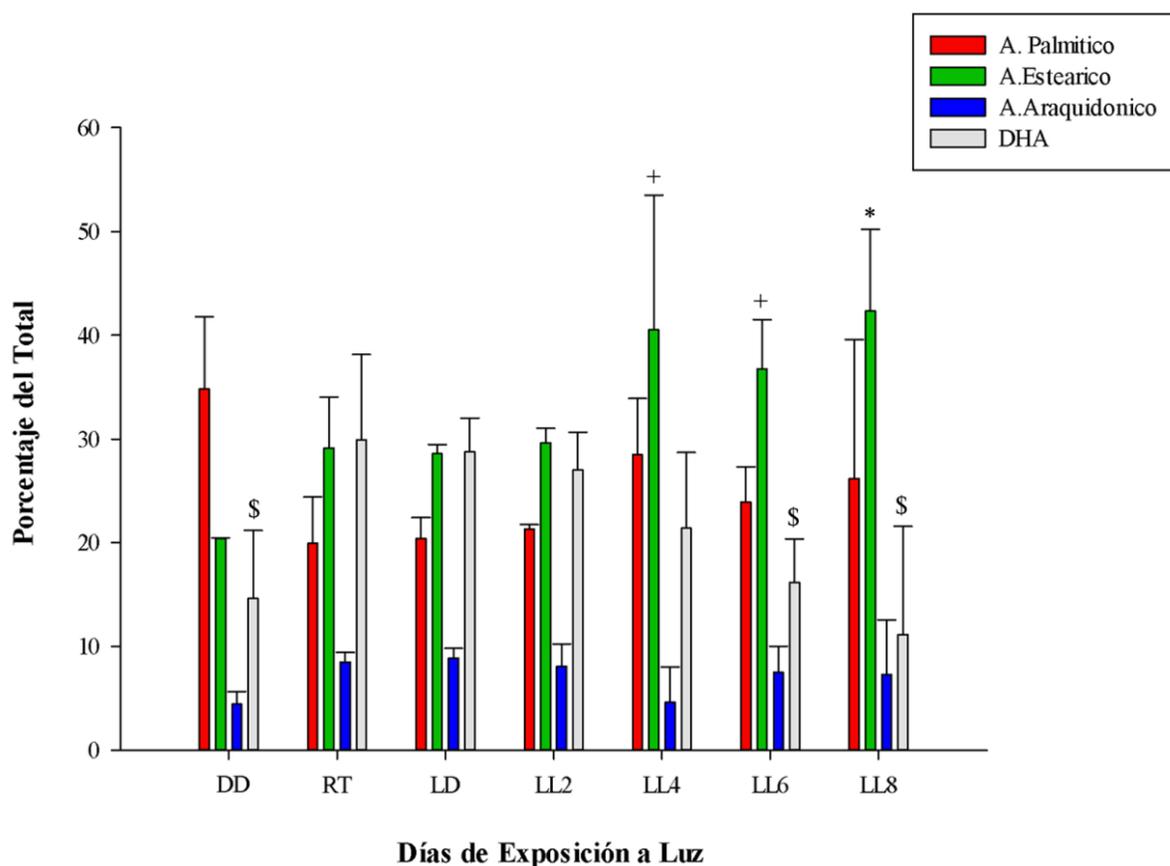
Nombre	Fórmula	Media (min)	D.E.
16:0	C17H34O2	12.23	0.82
18:0	C19H38O2	20.82	1.02
20:4 n-6	C21H34O2	27.33	1.01
22:6 n-3	C23H34O2	32.82	0.53

**Tabla 8** Promedio de los tiempos de retención para los principales compuestos identificados en el estándar comercial utilizado. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. n=3 animales por grupo.

### 3.6.2. Cuantificación

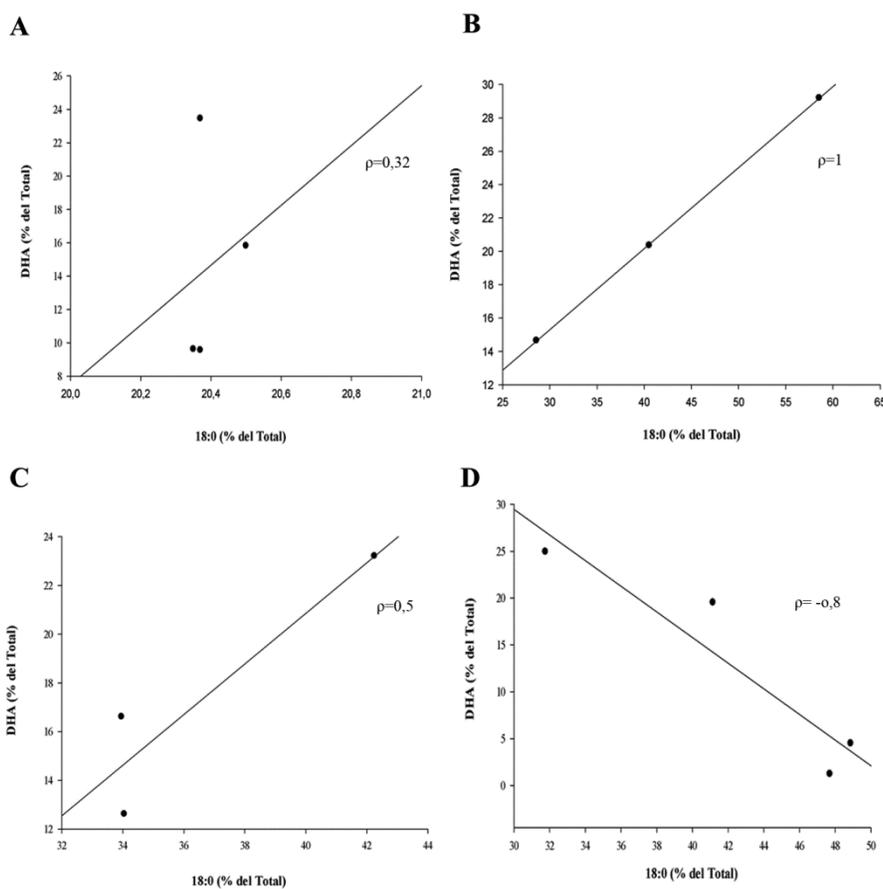
Posterior a la identificación, se cuantificó el porcentaje de los cuatro ácidos grasos principales previamente identificados, respecto al total de ácidos grasos encontrados en cada muestra. Este análisis reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ácido palmítico y ácido araquidónico entre los diferentes grupos estudiados. Por el contrario, sí se encontraron diferencias en la cantidad de ácido esteárico y docosahexaenoico entre los grupos. La cuantificación de la cantidad de ácido esteárico reveló un aumento estadísticamente significativo en animales expuestos 4 y 6 días a luz, respecto al control DD, mientras que los animales expuestos 8 días a luz, presentaron un mayor contenido de este ácido graso respecto a los controles DD, RT y LD. Por otro lado, el contenido de DHA resultó significativamente menor en animales expuestos 6 y 8 días a luz respecto a los controles RT y LD. También se encontró una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de este ácido graso, en animales control expuestos a oscuridad (DD), respecto a los controles RT y LD (Figura 36).

En conjunto, estos resultados muestran los efectos del daño oxidativo en nuestro modelo de DR. Esto se ve reflejado en la disminución de los niveles de DHA, lo cual podría deberse a su oxidación, como consecuencia del aumento de ROS a partir del quinto día de exposición a luz. En función de los cambios encontrados en estos dos ácidos grasos y, para determinar si sus variaciones estaban relacionadas, se decidió realizar un análisis de correlación en animales expuestos 4, 6 y 8 días a luz y animales control (DD).



**Figura 36** | Cuantificación de los Ácidos Grasos principales en retinas de animales control y expuestos a luz constante. Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. \*:  $p < 0,05$  Vs DD, RT y LD; +:  $p < 0,05$  Vs DD; \$:  $p < 0,05$  Vs RT y LD. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. n= 3 animales por grupo.

Los resultados de este análisis revelaron una correlación positiva en animales expuestos 4 días a luz (Figura 43 B), indicando que los aumentos son directamente proporcionales. A su vez, en animales expuestos 8 días a luz se encontró una correlación negativa entre ambos parámetros, indicando que sus variaciones son inversamente proporcionales (Figura 43D). Finalmente, en animales control (DD) y expuestos 6 días a luz (LL6) la correlación encontrada fue muy baja (Figuras 37 A y C respectivamente).



**Figura 37** | Análisis de correlación entre la cantidad de Ácido Esteárico y DHA en animales control (A) y expuestos 4, 6 y 8 días a luz constante (B, C y D, respectivamente). ρ: Coeficiente de Correlación de Spearman. n= 3 animales por grupo.

**CAPÍTULO IV**

**DISCUSIÓN Y**

**CONCLUSIONES FINALES**

## CAPÍTULO IV- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

### 4.1 Discusión

La exposición excesiva y continua (tanto de día como de noche) a la iluminación artificial, es una característica de la vida moderna, la cual puede no solo acelerar ciertas enfermedades degenerativas y promover la desincronización circadiana, sino que también posiblemente tenga un impacto negativo en la visión en personas sanas de las generaciones futuras. Los efectos acumulativos de la exposición prolongada debido, en parte, a la ausencia de experiencias de oscuridad absoluta durante la noche y la exposición a la alta energía de los dispositivos LED, pueden afectar la fisiología retinal. Además, el conocimiento de fondo sobre el daño retinal por exposición a luz de alta o baja intensidad en diferentes modelos animales nos permite especular acerca del daño potencial que este tipo de iluminación podría causar en la salud retinal humana<sup>89</sup>. En relación a esto, si bien numerosos trabajos han evaluado los efectos de la exposición aguda a luz de alta intensidad, con el objetivo de determinar cuáles son los mecanismos de toxicidad retinal que se desencadenan y de prevención mediante el uso de diferentes antioxidantes, mucho menor es el número de estudios que analizan los riesgos de la exposición a los dispositivos LED en condiciones de iluminación doméstica<sup>124</sup>.

En este trabajo de tesis se abordó el estudio de los efectos de la exposición a luz blanca LED de baja intensidad en ratas albinas, con el fin de aportar conocimiento acerca de los mecanismos que este tipo de iluminación desencadena a nivel retinal.

Se ha demostrado que la exposición a luz blanca de baja intensidad produce cambios retinales, que van desde la reducción en el número de núcleos de la CNE hasta alteraciones ultraestructurales como la fragmentación de los SE de las células fotorreceptoras y cambios en la amplitud de la onda “b” de los ERG<sup>125,126,127,60</sup>, indicando, esto último, una disfunción del tejido. Sin embargo, estos fenómenos no se han observado en animales expuestos a condiciones cíclicas de iluminación de intensidad menor a 270 lux; umbral de intensidad lumínica cíclica capaz de producir daño retinal<sup>128</sup>. Los resultados de esta tesis demuestran que la exposición de ratas albinas a luz LED blanca de baja intensidad (200 lux) produce una reducción en el número de núcleos de la CNE, un parámetro ampliamente utilizado

para cuantificar los efectos dañinos de la luz<sup>57</sup>, lo que indica la muerte de fotorreceptores clásicos conos y bastones. Este fenómeno se observó tanto en animales expuestos a luz constante (LL) como en aquellos expuestos a condiciones cíclicas de luz/oscuridad (LD). Esta reducción resulta estadísticamente significativa luego de 6 días de exposición constante y luego de 7 días de exposición cíclica a luz y oscuridad, indicando que el proceso de daño retinal en este modelo puede ser más lento respecto a modelos de exposición a luz brillante, en los que se revelan daños inmediatos en la CNE luego de la exposición<sup>65,129</sup>.

La ERG es una herramienta de diagnóstico que permite medir *in vivo* la respuesta funcional de la retina de manera global y, de este modo, determinar los cambios funcionales de sus células<sup>5,130</sup>. Nuestros resultados del análisis de funcionalidad de los fotorreceptores mediante ERG escotópicas de campo completo mostraron un aumento en los tiempos de latencia de las ondas “a” y “b” a partir del cuarto día de exposición a luz constante (LL4). Además, los animales expuestos a luz constante por períodos mayores a 4 días (LL5-LL8) presentaron señales ERG abolidas, es decir, con amplitudes y tiempos de latencias que resultaron imposibles de analizar en función del tiempo. Estos resultados muestran una clara correlación con la disminución en el número de núcleos de la CNE, indicando que la funcionalidad de los fotorreceptores se ve afectada incluso antes de que el mecanismo de muerte de los mismos resulte en una disminución estadísticamente significativa del número de fotorreceptores.

Resultados similares fueron reportados por Shang y col.,<sup>69</sup> encontraron una disminución en la amplitud de la onda “b” de ratas expuestas a luces LED y luz blanca fluorescente luego de 9 y 21 días de exposición, respectivamente. Posteriormente, los autores reportaron el mismo efecto en animales expuestos a luces LED roja, verde y azul, siendo la disminución de la misma, mayor en aquellos animales que fueron expuestos a luz azul<sup>69</sup>. Cabe destacar que el protocolo de iluminación utilizado implicaba niveles significativamente más altos de iluminación (aproximadamente 700 lux) y, que si bien los efectos encontrados en los registros ERG fueron los mismos que los encontrados en esta tesis; debido a que la intensidad de iluminación empleada presenta niveles superiores a aquellos considerados como luz tenue nosotros especulamos que los mecanismos que lo desencadenan pueden ser diferentes.

En relación a los mecanismos que desencadenan la muerte de los fotorreceptores, numerosos trabajos reconocen a Caspasa-3 como uno de los ejecutores en modelos de DR inducidos por luz. Sin embargo, la vía apoptótica y el papel de Caspasa-3 en estos modelos dependen de múltiples factores como la intensidad de la luz y la longitud de onda utilizadas. Algunos autores han atribuido un papel central a esta enzima en la degeneración de los fotorreceptores<sup>131,132,133,134</sup> mientras que otros han informado la participación de un mecanismo independiente de Caspasa-3 que involucra a las proteasas dependientes de  $Ca^{+2}$ , Calpaína o Catepsina D como vías alternativas de muerte<sup>133,135,136</sup>. Este trabajo de tesis revela que ni la expresión ni la actividad de esta enzima se encuentran alteradas a lo largo de los días de exposición a luz, sin embargo, la reducción del número de fotorreceptores clásicos indica que existe un mecanismo de muerte retinal, sugiriendo que la misma se desencadena por un mecanismo independiente de Caspasa-3.

En relación a esto, otras vías de muerte, entre ellas la necroptosis, pueden jugar un papel importante<sup>137</sup>. Para dilucidar el mecanismo de muerte involucrado en nuestro modelo se evaluó la expresión de ARNm de Caspasa-8, Bax y Bcl2, proteínas involucradas en la muerte celular por apoptosis y de RIPK1 y 3, ambas involucradas en el mecanismo de muerte celular por necroptosis (resultados preliminares presentados en Anexos). Este estudio revela que los niveles de expresión del ARNm de Caspasa-8 se encuentran aumentados en animales expuestos a luz por 2 y 3 días, produciéndose una disminución al cuarto y quinto día la cual es seguida por un nuevo aumento al día 6 y 7. Este resultado podría estar relacionado con la falta de activación de Caspasa-3 ya que se sabe que la misma requiere la participación de Caspasa-8<sup>91</sup>.

Se ha demostrado que Bcl2 tiene efectos de protección en diferentes tipos celulares, entre ellos en las neuronas, frente a la muerte inducida por una variedad de estímulos. Además, el aumento en la expresión de Bax ha sido indicado como una causa de muerte<sup>138</sup> debido a que la misma actúa como el principal regulador de la participación mitocondrial en la vía apoptótica intrínseca, un evento que generalmente se considera como el "punto de no retorno" en el proceso de muerte celular<sup>139</sup>. El aumento en la expresión del ARNm de Bax encontrado en los grupos experimentales LL6 y LD, pueden guardar relación con la disminución de núcleos en la CNE. Además, el análisis de la relación entre la expresión relativa de Bcl2 y Bax muestra que el aumento en Bcl2 en animales expuestos de 1 a 4 días

a luz constante, es acompañado por una disminución en Bax. Por el contrario, en animales expuestos 5 y 6 días a luz, se encontró una relación inversa. Este resultado podría indicar fuertemente la participación de ambas proteínas en la muerte celular previamente caracterizada.

La necroptosis es una forma de necrosis regulada que depende de la activación del necrosoma, el cual es un complejo de proteínas en el que RIPK3 se encuentra activada. El dominio central que regula la activación del Necrosoma se conoce como motivo de interacción homotípica RIP (RHIM, de sus siglas en inglés). Se ha reportado la existencia de tres proteínas que contienen RHIM y que aumentan la actividad quinasa de RIPK3 dentro del Necrosoma, dentro de las que se encuentra RIPK<sup>140</sup>. Además, se sabe que el clivaje de RIPK3 por Caspasa-8 desactiva esta proteína ya que al perder su dominio quinasa, pierde su capacidad para formar el Necrosoma<sup>141</sup>. Estos antecedentes junto al aumento en niveles de expresión relativa del ARNm de RIPK1 encontrado recién al séptimo día de exposición a luz, y el aumento en los niveles de expresión de Caspasa-8 y RIPK3 en el período de 1 a 3 días de exposición constante, indicarían que el mecanismo de necroptosis no estaría involucrado en la muerte celular reportada en nuestro modelo al menos hasta el séptimo día de exposición. Sin embargo, cabe aclarar aquí que, resulta indispensable realizar un mayor número de experimentos que permitan dilucidar por completo los procesos involucrados.

Conociendo ya que las células fotorreceptores clásicas sufren muerte celular; el siguiente punto fue evaluar el estado redox retinal, con el fin de determinar la participación del estrés oxidativo en los efectos de la exposición a luz constante en nuestro modelo de DR. Este análisis revela que existe una sobreproducción de ROS luego del quinto día de exposición a luz; es decir, al mismo momento en donde la muerte celular en la CNE resulta significativa. A su vez, el análisis con DHE (resultado no mostrado) permite identificar que las ROS solo están presentes en la CNE, descartando así un desbalance redox en otras capas retinales. En cuanto a la actividad de la enzima antioxidante CAT, no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos evaluados, sin embargo, si se observó una disminución de su actividad en animales expuestos de 1 a 4 días a luz con respecto a los controles evaluados. En relación a esto, ciertos trabajos han demostrado que esta enzima está altamente regulada por los ritmos circadianos. En este sentido, el análisis bioinformático y de ARNm de CAT

reveló la presencia de sitios putativos E-box en las regiones regulatorias del promotor de los genes de esta enzima, con niveles de expresión de ARNm que muestran una ritmicidad circadiana endógena, alcanzando niveles de transcripción en su punto máximo en la segunda mitad del día subjetivo (ZT6-12) seguidos por una actividad enzimática máxima al final del día subjetivo<sup>142,143,144</sup>.

Estos antecedentes, junto con los resultados encontrados podrían indicar que la luz constante puede producir una desincronización circadiana progresiva alterando el equilibrio entre la sobreproducción de ROS y los procesos antioxidantes a nivel retinal.

La retina de vertebrados contiene una alta concentración de PUFAs. En particular, la membrana del SE de bastones y conos, los PUFAs DHA y Ácido Araquidónico son las principales especies presentes<sup>145,146</sup>. Estos ácidos grasos son esenciales para mantener una fluidez apropiada de la membrana, la cual es necesaria para una fototransducción eficiente<sup>147,148</sup>. Debido a que los lípidos de la membrana controlan la función de Rodopsina; las interacciones directas proteína-lípido pueden desempeñar funciones importantes en la modulación de la estructura de esta opsina<sup>149</sup>. El DHA y el Ácido Araquidónico se sintetizan a partir de los ácidos grasos esenciales de la dieta; el Ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18: 3n3) y el Ácido linoleico (LA, 18: 2 n6). Se ha demostrado que el DHA es esencial para el desarrollo normal de los bastones en retinas de rata<sup>150, 151</sup>, mostrando respuestas ERG reducidas cuando existe deficiencia del mismo<sup>145</sup>. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que las membranas del SE de retinas con predominio de bastones presentan niveles mucho más altos de PUFA y LC-PUFA que las retinas con predominio de conos, lo que sugiere que ambos tipos de células fotorreceptoras pueden tener diferentes requisitos de lípidos para la función normal. El alto nivel de instauración de estos ácidos grasos los hace muy susceptibles a la oxidación, especialmente en la retina, debido a la exposición a la luz, la concentración de oxígeno y la presencia de sensibilizadores endógenos como los subproductos de la activación de Rodopsina o la acumulación de Lipofuscina<sup>152,58</sup>. En función a esto y debido al aumento en las ROS debido a la exposición a luz constante a partir del quinto día, se decidió evaluar si como consecuencia existían cambios en la composición de ácidos grasos retinales. Nuestros resultados revelan que el nivel de DHA disminuyó con la exposición a luz a partir del cuarto día. A su vez, esta disminución se relaciona de manera inversamente proporcional con el contenido de Ácido Esteárico, ácido

graso mono insaturado (18:0) precursor de otros ácidos grasos. Suponemos que la reducción en DHA puede verse afectada por el estrés oxidativo en el SE de los fotorreceptores; lo que a su vez afecta la supervivencia del fotorreceptor. En cuanto a su relación con el aumento de Ácido Esteárico, nosotros especulamos que la baja de los niveles de DHA en retina, podrían afectar la síntesis de otros ácidos grasos, entre ellos el esteárico. Se conoce que la composición de Ácidos Grasos depende del metabolismo hepático a través de una secuencia de pasos de desaturación y elongación. Una de las principales vías de biosíntesis de ácidos grasos en los tejidos comienza con la desaturación de los Ácidos Palmítico y Esteárico; para lo cual la enzima  $\Delta$ -9-desaturasa es clave; participando en la conversión del Ácido Palmítico en Palmitoleico (16: 1n-7) y del Ácido Esteárico en Oleico (18: 1n-9). A su vez, las enzimas  $\Delta$ -6 y  $\Delta$ -5 desaturasa son necesarias para el metabolismo de los Ácidos grasos esenciales, linoleico (18: 2n-6) y  $\alpha$ -linolénico (18: 3n-3), a Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los factores hormonales y dietéticos pueden afectar la actividad de estas desaturasas, lo que a su vez altera la composición de los ácidos grasos mono y poliinsaturados. En relación a esto, Lai y col.,<sup>153</sup> reportaron que pacientes con distrofia cristalina de Bietti, una enfermedad retinal degenerativa, presentan una mayor concentración de Ácido Esteárico y una menor concentración de ácido Octadecadienoico (18: 1n-9) que en los sujetos control. Además, la actividad de la  $\Delta$ -9-desaturasa y la concentración total de ácidos grasos monoinsaturados resulta significativamente menor en estos pacientes; lo que sugiere que esta enfermedad puede producir anomalías sistémicas en el metabolismo de los lípidos, reflejando una relación directa entre el aumento de los niveles de ácido esteárico, la disminución de la concentración de ácidos grasos en la retina y la disfunción de este tejido<sup>154</sup> En este sentido, la reducción de los niveles de DHA por oxidación en ratas expuestas a luz puede afectar la actividad  $\Delta$ -9-desaturasa en la retina causando el aumento de la acumulación de ácido esteárico que podría afectar a las propiedades de la membrana dando, por ejemplo, más rigidez al SE.

Se sabe que las interacciones lípido-proteína a menudo influyen en la función de las proteínas de membrana ya que los lípidos pueden forzar un cambio conformacional de la proteína para ocultar los dominios hidrófobos de las mismas dentro del espesor limitado del interior hidrófobo de la bicapa lipídica. Además, se sabe que los defectos en la regulación

de la cascada de fototransducción por la fosforilación de Rodopsina y la consecuente internalización del complejo Rodopsina-Arrestina puede constituir un paso clave en la DR producida por mutaciones en alguno de los componentes de la cascada o por exposición a luz<sup>88</sup>. Los resultados del análisis de los niveles de expresión de Rodopsina total y fosforilada en Ser<sup>334</sup>, sugieren que la activación constante del mecanismo de fototransducción debido a la exposición prolongada a luz puede generar un aumento en la fosforilación o una disminución en la defosforilación de esta opsina. Sin embargo, resulta necesario realizar estudios complementarios que permitan dilucidar el estado de fosforilación de esta opsina en otros residuos y su internalización como consecuencia de la exposición a luz. Además, resulta indispensable evaluar si la actividad de RK y PKC se ven alteradas por el protocolo de exposición a luz empleado.

Se sabe que los efectos de la luz de alta intensidad sobre la morfología y la bioquímica retiniana pueden ser dramáticos ya que la población total de células visuales a menudo se ve afectada negativamente<sup>155</sup>. Diferentes modelos DR por exposición prolongada a luz causan la muerte de bastones y conos en roedores albinos en lo que pueden estar involucrados múltiples componentes, como la activación de Rodopsina, la muerte de células del EP, el procesamiento anormal de retinoides y la producción de ROS<sup>155</sup>. En este sentido, la presencia de OPN4 en ipRGCs puede hacerlas susceptibles al daño por exposición excesiva a luz<sup>156</sup>. La muerte celular y la remodelación retinal que involucra a la población de CG son fenómenos que caracterizan a ciertos trastornos retinales hereditarios<sup>157,158,159</sup>. En este sentido, se ha demostrado que la exposición constante de ratas albinas a luz de alta intensidad produce estrés metabólico en las CG, provocando su muerte<sup>155,160,161</sup>. Se sabe que la regulación positiva de la Piruvato Quinasa M2, enzima glicolítica clave involucrada en múltiples procesos celulares, induce la apoptosis celular retinal y presenta una asociación con los mecanismos de muerte de las CG<sup>162</sup>. También se demostró que la regulación positiva de la proteína Fra-1 está asociada con la apoptosis de esta población retinal<sup>163</sup> en procesos de DR. Estos estudios sugieren que la condición de luz utilizada puede producir diferentes mecanismos de DR y efectos específicos en diferentes poblaciones de células de la retina<sup>89</sup>. En relación a esto, en este trabajo de tesis se encontró que la exposición a luz no indujo reducción del número de CG. Este resultado, junto con el análisis de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL, indica que el modelo

de DR utilizado no afecta la supervivencia de las CG. Sin embargo, los cambios encontrados tanto en la expresión como en la localización de OPN4 y OPN5, como consecuencia de la exposición a luz, indican que la misma produce una remodelación retinal. Los animales expuestos a luz (LL) presentan una reducción en los niveles de inmunoreactividad de OPN4 en las regiones distales y un aumento en el soma, el cual puede deberse a la síntesis *de novo* o al transporte desde los procesos. Este aumento está respaldado por el análisis de Western Blot. Es importante aclarar que estas observaciones no pueden atribuirse a una mayor concentración de CG respecto a la población de fotorreceptores clásicos debido a su disminución, ya que la expresión Thy-1 (marcador típico de CG) no cambia a lo largo de los días de exposición a luz. Estos resultados indicarían que la relocalización de OPN4 podría cumplir con los requisitos más bajos de sensibilidad en presencia de LL en comparación con los requisitos de retinas expuestas a LD o DD; o que, debido al hecho de que el procesamiento de la señal lumínica por la retina externa está afectado en animales tratados con luz debido a la muerte de conos y bastones, la retina interna requiere un proceso de remodelación como mecanismo de defensa. Si bien en los últimos años muchos estudios han demostrado que la expresión de OPN4 está regulada por los efectos de la luz, las implicancias funcionales de esto aún no están claras<sup>89</sup>. En relación a esto, Wong y col.,<sup>164</sup> proporcionaron pruebas de que las ipRGCs se adaptan a la luz y la oscuridad independientemente de las condiciones de iluminación. Se sabe que la expresión de OPN4 está regulada por el reloj circadiano; sin embargo, los períodos prolongados de exposición al LL tienen un efecto supresor en los niveles de OPN4<sup>165,166,167</sup>. Por ejemplo, en ratas Wistar expuestas a niveles mayores a 300 lux de luz blanca, la expresión de esta opsina aumenta durante la oscuridad prolongada y se disminuye lentamente en luz, mostrando, por medio de inmunohistoquímica, una red dendrítica extensa<sup>166</sup> que parece anular el control a cargo del reloj. Estas observaciones difieren parcialmente de las encontradas en esta tesis. Esto puede deberse a que tanto la intensidad como la fuente de iluminación empleada son diferentes.

El análisis de OPN5, demostró niveles crecientes de inmunoreactividad tanto en CG como en células de la CNI luego de 4 días de exposición a luz (LL4), alcanzando el valor más alto a LL8. Además, se encontró una expresión diferencial de esta opsina a lo largo de los días de exposición, con mayores niveles en áreas perinucleares. Esto indica que OPN5

también está regulado por el efecto de la luz<sup>89</sup>. OPN5 pertenece a un grupo filogenéticamente independiente de otras opsinas y constituye un fotopigmento biestable acoplado a Gi funcional sensible a la radiación UV con una eficiencia máxima a 420 nm. La misma se expresa en el hipotálamo de las aves<sup>46,49</sup> y también en la retina interna de los mamíferos, específicamente en las CG y en células de la CNI<sup>51</sup>. Si bien la función visual de esta opsina no se conoce completamente, Buhr y col.,<sup>96</sup> demostraron que la misma es necesaria para el fotoentrenamiento de los relojes locales retinales los cuales regulan funciones importantes, como el desprendimiento de los SE de los bastones. Los cambios en la expresión y localización de OPN5 en función de la exposición a luz podrían afectar la regulación de los ritmos circadianos locales retinales<sup>89</sup>.

## **4.2 Conclusiones Finales**

En función de los resultados encontrados en este trabajo de tesis se puede concluir, en términos generales, que los eventos promovidos por la exposición constante a luz LED blanca de baja intensidad desencadenan un proceso de DR con una remodelación retinal profunda. Esto se ve evidenciado en la pérdida de funcionalidad retinal entre el segundo y tercer día de exposición. Además, existe una reducción en el ancho total del tejido, debido a la reducción de la CNE como consecuencia de la muerte de fotorreceptores clásicos, por un mecanismo independiente de caspasa-3, la cual resulta estadísticamente significativa a partir del quinto día de exposición. Por otro lado, se desencadena un mecanismo de estrés oxidativo en conos y bastones, con aumento de ROS luego de cinco días de exposición constante. Como consecuencia del aumento de ROS, a partir del sexto día se produce un cambio en la composición de ácidos grasos retinales, evidenciado por una correlación entre la disminución en la concentración de DHA y un aumento en la concentración de ácido esteárico. Especulamos que la disminución de DHA se debe a la oxidación de éstos, consecuencia del estrés oxidativo, lo cual lleva a una desregulación de enzimas claves en la síntesis de ácidos grasos, específicamente la  $\Delta$ -9-desaturasa, lo cual provoca la acumulación de ácido esteárico.

Todos estos hechos sugieren que, durante los primeros días de exposición a luz se estarían desencadenando otros mecanismos de muerte celular, evidenciados por una disminución en

la actividad funcional temprana, posiblemente, como consecuencia de la activación constante del mecanismo de fototransducción que, como consecuencia secundaria desencadena otras vías de muerte. La retina al estar constantemente iluminada produce la activación sin cese de la fototransducción, lo que dispara mecanismos de protección que, en algún momento fallan y dispara otras vías de muerte. En relación a esto, hemos demostrado aquí, que con los días de exposición a luz hay más cantidad de rodopsina fosforilada en el sitio Ser<sup>334</sup>, mecanismo que lleva a la inactivación de la opsina, pudiendo ser un mecanismo de defensa contra la iluminación continua.

En la retina interna pudimos demostrar que, tanto las CG como las células de la capa nuclear interna, no presentan un mecanismo de muerte celular en los días estudiados, sin embargo, si existen cambios en la distribución y niveles de expresión de opsinas. Esto, sumado a la formación de gránulos de estrés, sugiere que hay un remodelado y activación de mecanismos de supervivencia celular.

Podemos concluir entonces, que este modelo de trabajo se diferencia de otros que postulan al desbalance redox como una de las principales causas de la muerte de neuronas retinales y proponen al uso de antioxidantes como mecanismo de prevención. Nosotros creemos que la exposición crónica a bajas intensidades permite desglosar en el tiempo los acontecimientos que ocurren en ese remodelado retinal. En conjunto, todos estos resultados permiten considerar al modelo propuesto como una herramienta útil para estudiar y dilucidar los eventos de DR desencadenados como consecuencia de la exposición constante a luces LED.

# **CAPITULO V**

## **ANEXOS**

## **CAPÍTULO V-ANEXOS**

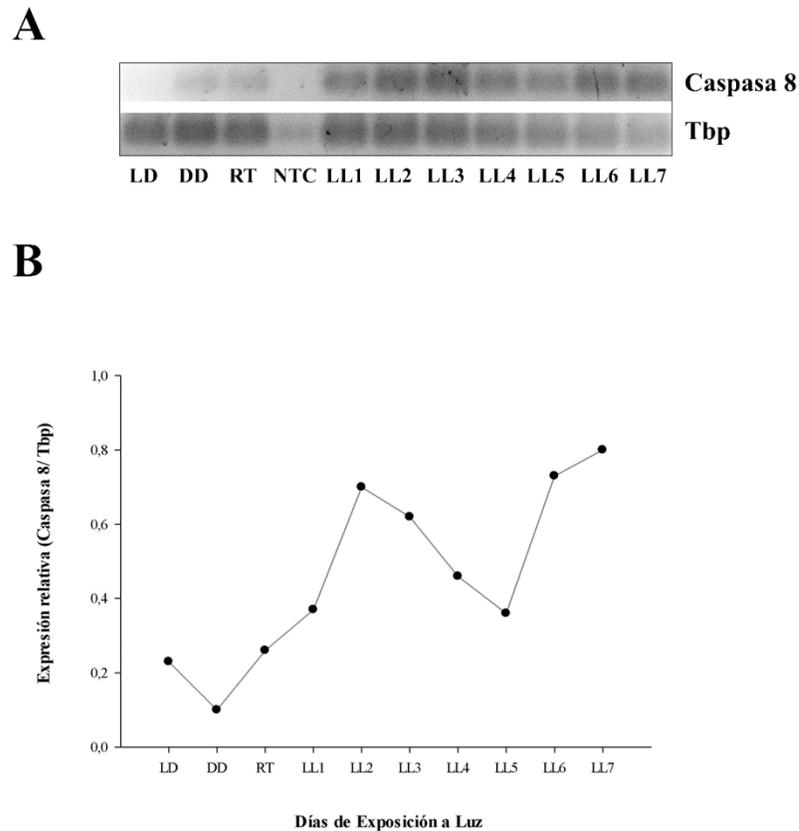
### **A.1 Caracterización de los Mecanismos de Muerte Celular. Resultados Preliminares**

Como se detalló en la Sección 3.4, nuestro modelo de DR se caracteriza, entre otras cosas, por desencadenar muerte de conos y bastones por un mecanismo independiente de Caspasa-3, mientras que la retina interna permanece intacta. En base a esto, y con el fin de evaluar qué mecanismos de muerte celular están involucrados en nuestro modelo de DR, se realizó un análisis mediante PCR semicuantitativa de la expresión de genes que codifican para proteínas relevantes en los mecanismos de muerte celular por apoptosis y/o necroptosis, considerando que la obtención de un perfil de expresión a lo largo de los días de exposición constante a luz, podría ser una herramienta útil para la prevención de la muerte celular retinal. El análisis presentado en esta sección corresponde a resultados preliminares del mismo.

#### **A.1.1 Perfil de Expresión de ARNm de Proteínas Proapoptóticas (Caspasa-8 y Bax)**

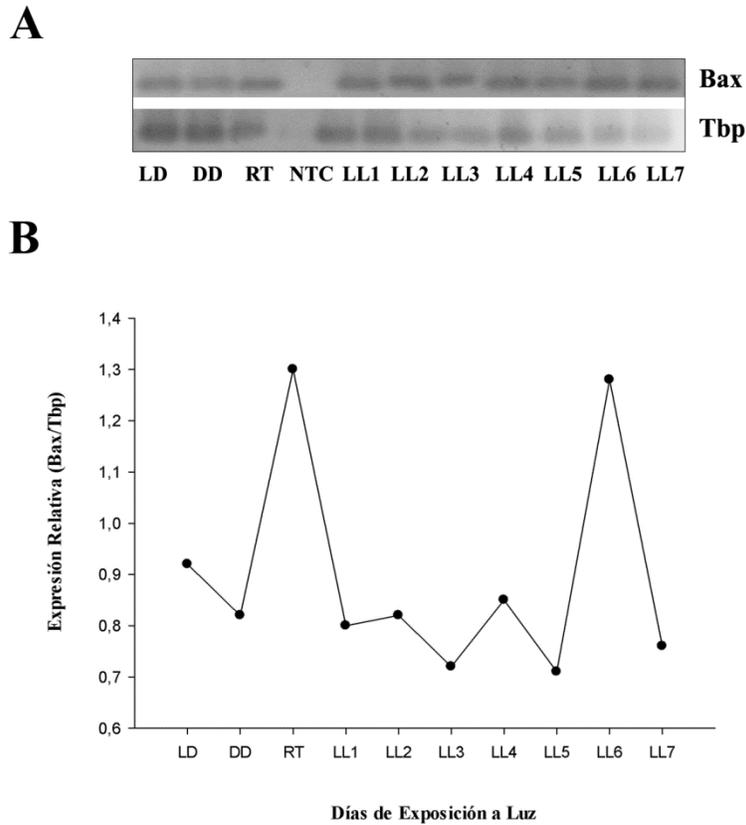
Caspasa 8 es indicada como iniciadora del proceso de apoptosis ya que participa en el clivaje de ciertas caspasas efectoras<sup>98</sup>, entre ellas Caspasa 3. En base a esto se decidió estudiar si la expresión del ARNm de esta caspasa se veía afectada por la exposición a luz. Los resultados de este análisis muestran que la expresión relativa del ARNm de esta proteína está aumentada en animales expuestos de 1 a 4 días a luz respecto a los controles DD, RT y LD, disminuyendo al día 5 y aumentando nuevamente en LL6 y 8 (Figura A.1). Estos resultados preliminares podrían estar relacionados con la falta de activación de Caspasa 3, ya que, como se especificó anteriormente, Caspasa 8 es indispensable para que esto ocurra.

Posteriormente se evaluó la expresión de Bax, una proteína proapoptótica que media el mecanismo de apoptosis mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, lo que produce la liberación de ciertas moléculas de señalización como citocromo c, siendo este un paso irreversible que desencadena la muerte celular<sup>168</sup>.



**Figura A.1|** **A.** Expresión de ARNm de Caspasa 8 en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL). **B.** Expresión relativa de Caspasa-8 normalizada respecto a Tbp.

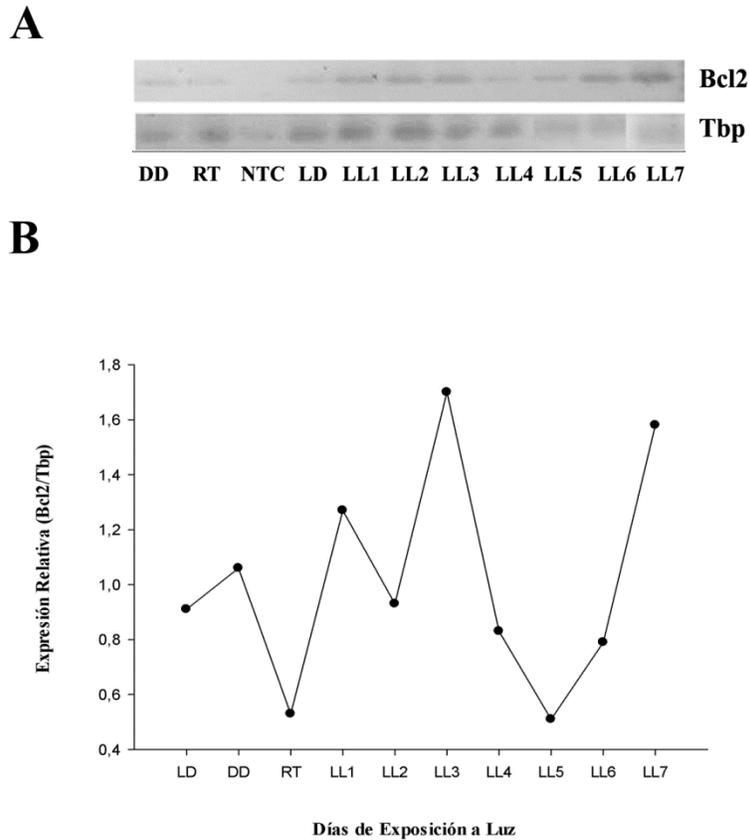
Los resultados (Figura A.2) muestran un aumento en la expresión de Bax en animales expuestos a luz por 6 días, respecto a los controles DD y RT. También se observó un aumento en el grupo control LD, respecto a DD y RT, lo que sugiere que la disminución en el número de núcleos de la CNE encontrada en este grupo (mostrados en Figura 13) podría estar relacionada con un mecanismo de muerte celular que involucre a esta proteína.



**Figura A.2| A.** Expresión de ARNm de Bax en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL). **B.** Expresión relativa de Bax normalizada respecto a Tbp.

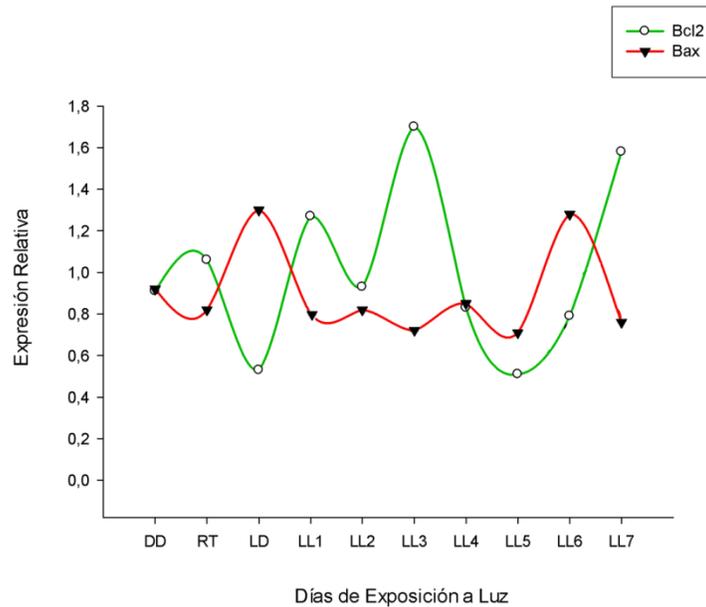
### A.1.2 Perfil de Expresión de ARNm de la Proteína Antiapoptótica Bcl2

Bcl2 ha sido indicada como una proteína antiapoptótica, íntimamente relacionada con Bax. Se ha reportado que la misma previene la muerte celular desencadenada por Bax y, además, participa en la inhibición de ciertas formas de muerte celular por necrosis<sup>169</sup>. En base a esto se decidió evaluar la expresión génica de este factor antiapoptótico. El análisis de la expresión del ARNm de Bcl2 reveló un aumento al tercer y séptimo día de exposición a luz comparado con los controles LD, DD y RT (Figura A.3).



**Figura A.3| A.** Expresión de ARNm de Bcl2 en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL). **B.** Expresión relativa de Bcl2 normalizada respecto a Tbp.

El análisis de la relación entre la expresión relativa de Bcl2 y Bax muestra que el aumento en Bcl2 en animales expuestos de 1 a 4 días a luz constante, es acompañado por una disminución en Bax. Por el contrario, en animales expuestos 5 y 6 días a luz, se encontró una relación inversa (Figura A.4). Este resultado podría indicar la participación de ambas en la muerte celular previamente caracterizada; por lo que resulta fundamental realizar un número mayor de experimentos que permitan confirmarlo.

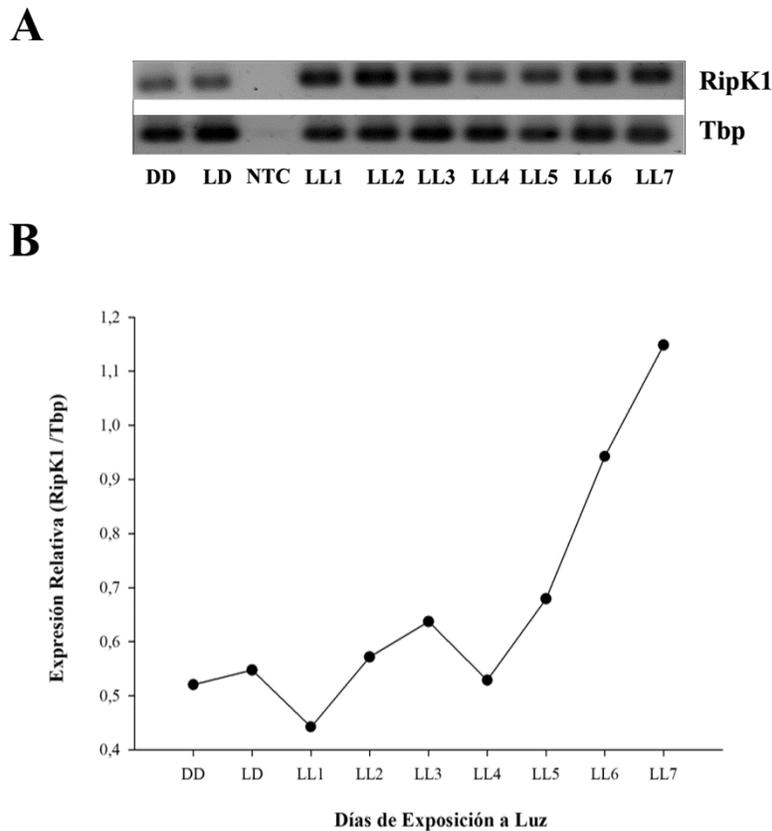


**Figura A.4|** Relación entre la expresión relativa de ARNm de Bcl2 y Bax en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL).

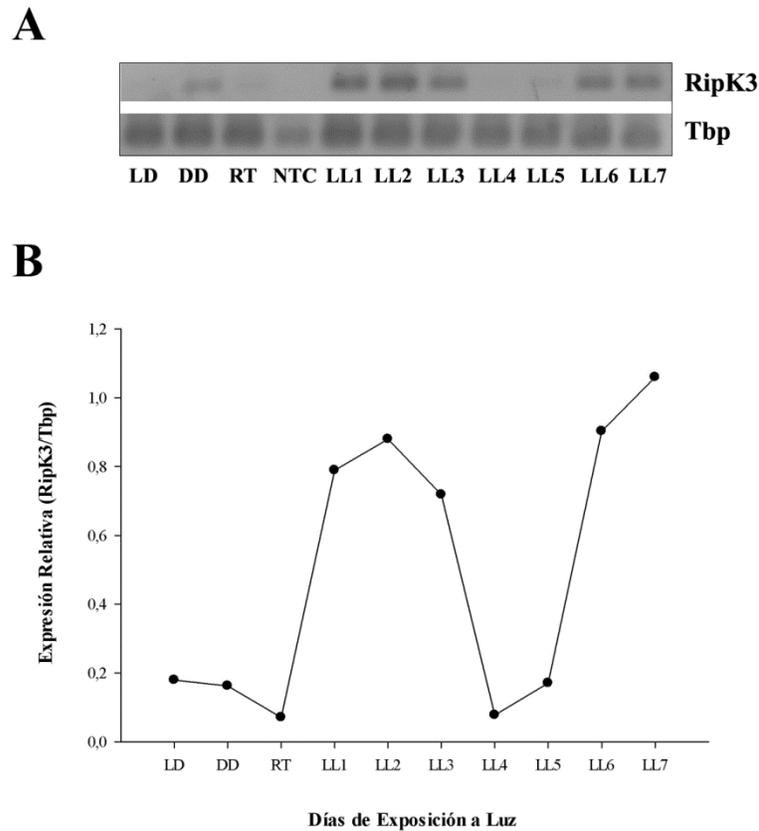
### **A.1.3 Perfil de Expresión de ARNm de Proteínas involucradas en el mecanismo de Necroptosis (RIPK1 y RIPK3)**

Existe evidencia que sugiere que la vía de las caspasas puede no ser la única mediadora en los procesos de muerte celular. En este sentido, ciertos estudios demostraron la presencia tanto de apoptosis como de necrosis en células fotorreceptoras. Durante mucho tiempo la necrosis ha sido considerada una forma pasiva y no regulada de muerte celular, pero recientemente, existen evidencias que indican que este mecanismo de muerte celular se puede inducir por vías de transducción de señales reguladas, entre ellas las mediadas por las quinasas RIP (Receptor Interacting Proteins, de sus siglas en inglés). Este tipo de muerte celular se conoce como Necrosis Programada o Necroptosis. En base a estos antecedentes, se decidió evaluar la expresión de genes de RIPK1 y 3, dos quinasas involucradas en el mecanismo de necroptosis. Si bien aún no se ha dilucidado el mecanismo de acción de RIPK1 en la necroptosis, se sabe que la expresión de RIPK3 y la unión de RIPK1-3 a través de un motivo de interacción homotípica RIP, es un requisito previo para la activación de esta quinasa, lo que lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte

celular por necroptosis <sup>98</sup>. El análisis del nivel de expresión del ARNm de RIPK1, mostró una disminución en animales expuestos 4 días a luz, con un posterior aumento en aquellos expuestos 6 y 7 días a luz respecto a los controles DD y LD (Figura A.5). A su vez, el análisis para RIPK3 revelo un aumento en animales expuestos 1, 2 y 3 días a luz, seguido por una disminución en animales expuestos 4 y 5 días a luz y un segundo aumento en aquellos animales expuestos 6 y 7 días. En todos los casos la comparación se realizó respecto a los controles LD, DD y RT (Figura A.6).



**Figura A.5| A.** Expresión de ARNm de RIPK1 en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL). **B.** Expresión relativa de RIPK1 normalizada respecto a Tbp.



**Figura A.6|** A Expresión de ARNm de RIPK3 en retinas de ratas control (LD, DD y RT) y animales expuestos a luz de 1 a 7 días (LL). B. Expresión relativa de RIPK3 normalizada respecto a Tbp.

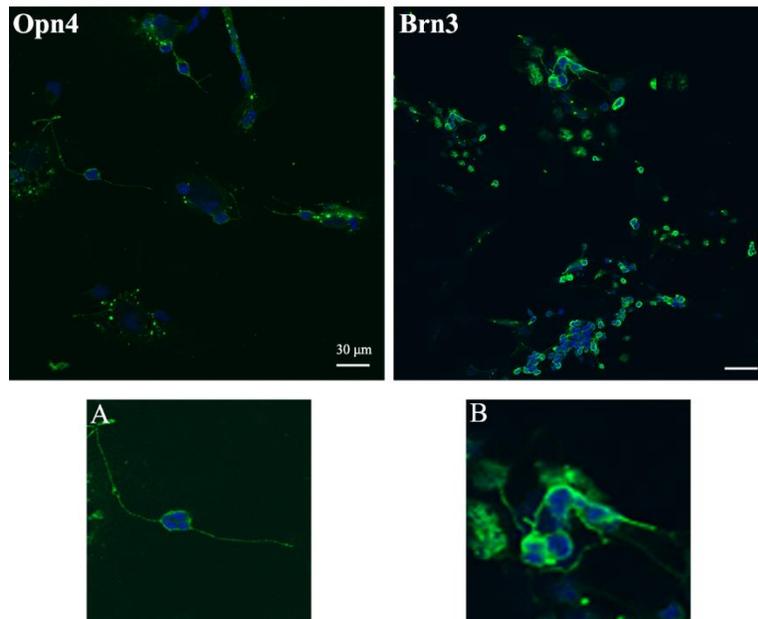
## A.2 Obtención y Caracterización de Cultivos Primarios de Células Ganglionares de Retinas de ratas

Se sabe que la proteína 3 del dominio homeobox / POU (Brn3) específica del cerebro participa en la regulación de la diferenciación, estratificación dendrítica y proyección axonal de las CG de la retina durante el desarrollo<sup>170,171</sup>.

Tanto OPN4 como Brn3 han sido reportados como marcadores específicos que permiten la identificación de las CG *ex vivo*. A su vez, se ha propuesto que las llamadas tareas formadoras de imágenes y no formadoras de imágenes se caracterizan por la expresión de

factores de transcripción de Brn3 u OPN4 respectivamente y, que las células que expresan tanto Brn3b como OPN4 proporcionan una plataforma para la interacción de ambas tareas visuales<sup>172</sup>. En base a estos antecedentes, se decidió obtener y posteriormente caracterizar cultivos primarios de células ganglionares a partir de retina total de ratas en estadio postnatal 7-8; empleando como marcadores específicos Brn3 y OPN4.

Los resultados obtenidos muestran poblaciones neuronales que presentan marca positiva tanto para OPN4 como para Brn3. Además, el protocolo empleado para la obtención de los cultivos celulares permitió aislar CG con un alto nivel de rendimiento y pureza (Figura A.7), lo que representa una herramienta útil para estudiar *in vitro* los efectos de la exposición a la luz en esta población celular.



**Figura A.7]** Imágenes representativas de cultivos primarios de células ganglionares de retina de rata de estadio postnatal 7-8. Verde: anticuerpo  $\alpha$ -OPN4 o  $\alpha$ -Brn3; Azul: tinción nuclear con DAPI. **A-B:** Microfotografías a mayor aumento correspondientes a células marcadas con  $\alpha$ -OPN4 y  $\alpha$ -Brn3, respectivamente. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes por grupo experimental. Barra = 30

**CAPITULO VI**  
**BIBLIOGRAFIA**

## CAPÍTULO VI-BIBLIOGRAFIA

1. Ryan SH, David; Schachat, A. Retina Enfermedades Hereditarias y Tumores. Elsevier Inc. ed. Madrid MARBÁN (2009).
2. London, A., Benhar, I. & Schwartz, M. The retina as a window to the brain - From eye research to CNS disorders. *Nature Reviews Neurology* (2013).
3. Amini, R., Rocha-Martins, M. & Norden, C. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina. *Front. Neurosci.* 11, 1–16 (2018).
4. Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. & Wong, R. O. L. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* (2014).
5. Quintana, Q., Benedetto, M. L., Maldonado, M. M., Vera De Payer, A. C. E. & Contin, M. A. Electroretinography: A biopotential to assess the function/dysfunction of the retina. *J. Phys. Conf. Ser.* 705, (2016).
6. Lamb, T. D. Why rods and cones? *Eye* (2016).
7. Diamond, J. S. Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 3, 1–24 (2017).
8. Chapot, C. A., Euler, T. & Schubert, T. How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone–horizontal cell synapse. in *Journal of Physiology* (2017).
9. Weltzien, F., Percival, K. A., Martin, P. R. & Grünert, U. Analysis of bipolar and amacrine populations in marmoset retina. *J. Comp. Neurol.* (2015).
10. Masland, R. H. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron* (2012). doi:10.1016/j.neuron.2012.10.002
11. Herrera, E. & Erskine, L. Guidance of retinal axons in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2017).
12. Berson, D. M., Dunn, F. A., Takao, M. & Berson Felice A. Takao, M. D. M. D. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science* (80-. ). 295, 1070–1073 (2002).
13. Guido, M. E. *et al.* Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: Novel players in the circadian system. *Progress in Neurobiology* (2010).
14. Sikka, G. *et al.* Melanopsin mediates light-dependent relaxation in blood vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 17977–17982 (2014).

15. Contin, M. A., Benedetto, M., Quinteros, M. L. & Guido., M. E. *Fototransducción en Vertebrados. Consideraciones funcionales fisiológicas y patológicas*. Editorial Académica Española (2013).
16. Benarroch, E. E. The melanopsin system: Phototransduction, projections, functions, and clinical implications. *Neurology* (2011).
17. Baehr, W. Membrane protein transport in photoreceptors: The function of pde $\delta$ . *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2014).
18. Lamb, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Progress in Retinal and Eye Research* (2013).
19. Arendt, D. Evolution of Eyes and Photoreceptor Cell Types.Pdf. 571, 563–571 (2003).
20. Verasztó, C. *et al.* Ciliary and rhabdomeric photoreceptor-cell circuits form a spectral depth gauge in marine zooplankton. *Elife* (2018).
21. Porter, M. L. *et al.* Shedding new light on opsin evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 3–14 (2011).
22. Ingram, N. T., Sampath, A. P. & Fain, G. L. Why are rods more sensitive than cones? *J. Physiol.* (2016).
23. Audet, M., Stevens, R. C. & Stevens, R. TITLE: Emerging Structural Biology of Lipid G-Protein Coupled Receptors. (2018).
24. Salesse, C. Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel. *Journal Francais d'Ophthalmologie* (2017).
25. Kawamura, S. & Tachibanaki, S. Rod and cone photoreceptors: Molecular basis of the difference in their physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (2008).
26. Park, P. S. H. Constitutively Active Rhodopsin and Retinal Disease. *Adv. Pharmacol.* (2014).
27. Fain, G. L. Why photoreceptors die (and why they don't). *BioEssays* 28, 344–354 (2006).
28. Fu, Y. & Yau, K.-W. Phototransduction in mouse rods and cones.
29. H., K. Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature* 587–9 (1980).
30. Kennedy, M. J. *et al.* Multiple phosphorylation of rhodopsin and the in vivo chemistry underlying rod photoreceptor dark adaptation. *Neuron* 31, 87–101 (2001).

31. Ohguro, H., Van Hooser, J. P., Milam, A. H. & Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* (1995).
32. Arshavsky, V. Y. Rhodopsin phosphorylation: From terminating single photon responses to photoreceptor dark adaptation. *Trends Neurosci.* 25, 124–126 (2002).
33. Maeda, T., Imanishi, Y. & Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation: 30 Years later. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 417–434 (2003).
34. Fain, G. L., Hardie, R. & Laughlin, S. B. NIH Public Access. *Curr Biol* 20, 1–23 (2011).
35. Ksendzovsky, A., Jonathan Pomeranec, I., Zaghoul, K. A., Javier Provencio, J. & Provencio, I. *Clinical implications of the melanopsin-based non-image-forming visual system. Molecular Physiology and Biological Physics (A.K.) and Biology* (2017).
36. Erren, T. C., Erren, M., Lerchl, A. & Meyer-Rochow, V. B. Clockwork blue: On the evolution of non-image-forming retinal photoreceptors in marine and terrestrial vertebrates. *Naturwissenschaften* (2008).
37. Provencio, I., Cooper, H. M. & Foster, R. G. Retinal Projections in Mice With Inherited Retinal Degeneration : 439, 417–439 (1998).
38. Panda, S. *et al.* Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* (80-. ). 307, 600–604 (2005).
39. Xudong Qiu, Tida Kumbalasiri, Stephanie M. Carlson, Kwoon Y. Wong, Vanitha Krishna, I. P. & D. M. B. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745–749
40. Isoldi, M. C., Rollag, M. D., Castrucci, A. M. de L. & Provencio, I. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1217–1221 (2005).
41. Berson, D. M. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 454, 849–855 (2007).
42. Contin, M. A., Verra, D. M. & Guido, M. E. An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J.* 20, 2648–2650 (2006).
43. Contín, M. A. *et al.* Light activation of the phosphoinositide cycle in intrinsically photosensitive chicken retinal ganglion cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5491–5498 (2010).
44. Díaz, N. M., Morera, L. P., Tempesti, T. & Guido, M. E. The Visual Cycle in the Inner Retina of Chicken and the Involvement of Retinal G-Protein-Coupled Receptor

(RGR). *Mol. Neurobiol.* 54, 2507–2517 (2017).

45. Peirson, S. N., Haiford, S. & Foster, R. G. The evolution of irradiance detection: Melanopsin and the non-visual opsins. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2849–2865 (2009).
46. Yamashita, T. *et al.* Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *J. Biol. Chem.* 289, 3991–4000 (2014).
47. Tarttelin, E. E. *et al.* Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp. Eye Res.* 76, 393–396 (2003).
48. Semo, M., Vugler, A. A. & Jeffery, G. Paradoxical opsin expressing cells in the inner retina that are augmented following retinal degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2296–2306 (2007).
49. Nakane, Y. *et al.* A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15264–15268 (2010).
50. Bailey, M. J. & Cassone, V. M. Opsin photoisomerases in the chick retina and pineal gland: Characterization, localization, and circadian regulation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 769–775 (2004).
51. Nieto, P. S., Valdez, D. J., Acosta-Rodríguez, V. A. & Guido, M. E. Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5. Presence of Opn5 in the rat retina. *PLoS One* 6 (2011).
52. Hughes, S. *et al.* Characterisation of light responses in the retina of mice lacking principle components of rod, cone and melanopsin phototransduction signalling pathways. *Sci. Rep.* 6, 1–11 (2016).
53. Van Gelder, R. N. & Buhr, E. D. Ocular Photoreception for Circadian Rhythm Entrainment in Mammals. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 2, 153–169 (2016).
54. Wert, K. J., Lin, J. H. & Tsang, S. H. General pathophysiology in retinal degeneration. in *Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Disease* (2014).
55. Yu, T. Y., Acosta, M. L., Ready, S., Cheong, Y. L. & Kalloniatis, M. Light exposure causes functional changes in the retina: Increased photoreceptor cation channel permeability, photoreceptor apoptosis, and altered retinal metabolic function. *J. Neurochem.* (2007).
56. Paskowitz, D. M., LaVail, M. M. & Duncan, J. L. Light and inherited retinal degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 1060–1066 (2006).
57. Organisciak, D. T. & Vaughan, D. K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research* (2010).

58. Hunter, J. J. *et al.* The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Progress in Retinal and Eye Research* (2012).
59. Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M. & Remé, C. E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 275–306 (2005).
60. Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M. & Remé, C. E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* (2005).
61. Hao, W. *et al.* Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat. Genet.* 32, 254–260 (2002).
62. Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S. & Berman, S. Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* 5, 450–473 (1966).
63. Williams, T. P. & Howell, W. L. Action spectrum of retinal light-damage in albino rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 285–287 (1983).
64. Grimm, C. *et al.* Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat. Genet.* 25, 63–66 (2000).
65. Remé, C. E. The dark side of light: Rhodopsin and the silent death of vision. The Proctor Lecture. in *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (2005).
66. Shear, C. R., O’Steen, W. K., & Anderson, K. V. Effects of short-term low intensity light on the albino rat retina. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 127–132. (1973).
67. Behar-Cohen, F. *et al.* Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Progress in Retinal and Eye Research* (2011).
68. Moriya, M., Baker, B. N., & Williams, T. P. Progression and reversibility of early light-induced alterations in rat retinal rods. *Cell Tissue Res* 607–621. (1986).
69. Shang, Y. M., Wang, G. S., Sliney, D., Yang, C. H. & Lee, L. L. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environ. Health Perspect.* (2014).
70. Ham WT, M. H. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature* 260, 153–155 (1976).
71. Nakamura, M., Kuse, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., & Hara, H. The involvement of the oxidative stress in murine blue LED light-induced retinal damage model. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1219–1225 (2017).
72. Walls, H. L., Walls, K. L. & Benke, G. Eye disease resulting from increased use of

- fluorescent lighting as a climate change mitigation strategy. *Am. J. Public Health* 101, 2222–2225 (2011).
73. Marquioni-Ramella, M. D. & Suburo, A. M. Photo-damage, photo-protection and age-related macular degeneration. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1560–1577 (2015).
  74. S, F., B, S. & M, N. Long-term Effects of Visible Eye. *Changes* (2010).
  75. van Soest S1, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM, B. A. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol.* 321–334. (1999).
  76. Dyonne T Hartong MD a, Prof Eliot L Berson MD b, P. T. P. D. M. a. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809 (2006).
  77. Dowling JE. Night blindness. *Sci Am.* 78–84. (1966).
  78. Witkovsky, P., Gallin, E., Hollyfield, J. G., Ripps, H. & Bridges, C. D. Photoreceptor thresholds and visual pigment levels in normal and vitamin A-deprived *Xenopus* tadpoles. *J. Neurophysiol.* 39, 1272–1287 (1976).
  79. Gehrs, K. M., Anderson, D. H., Johnson, L. V. & Hageman, G. S. Age-related macular degeneration - Emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann. Med.* 38, 450–471 (2006).
  80. Katta, S., Kaur, I. & Chakrabarti, S. The molecular genetic basis of agerelated macular degeneration an overview india 2010.pdf. 88, 425–449 (2009).
  81. Yu, D. Y. & Cringle, S. J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.* 80, 745–751 (2005).
  82. Marmor, M. F. *et al.* ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). in *Documenta Ophthalmologica* (2009).
  83. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976).
  84. Aebi, H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* (1984). doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
  85. FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* (1957).
  86. Cantellops, D., Reid, A. P., Eitenmiller, R. R. & Long, A. R. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. *J. AOAC Int.* 82, 1128–1139 (1999).

87. Organisciak, D. T. & Vaughan, D. K. NIH Public Access. 29, 113–134 (2011).
88. Contín, M. A., Arietti, M. M., Benedetto, M. M., Bussi, C. & Guido, M. E. Photoreceptor damage induced by low-intensity light: model of retinal degeneration in mammals. *Mol. Vis.* 19, 1614–25 (2013).
89. Benedetto, M. M., Guido, M. E. & Contin, M. A. Non-visual photopigments effects of constant light-emitting diode light exposure on the inner retina of Wistar rats. *Front. Neurol.* 8, 1–11 (2017).
90. Stachurska, A. & Sarna, T. Regulation of Melanopsin Signalling: Key Interactions of the Non-visual Photopigment. *Photochem. Photobiol.* (2018).
91. Quinteros Quintana, M. L., Benedetto, M. M. & Contín, M. A. Degeneración retinal, Retinitis Pigmentosa: Generalidades, mutaciones en el mecanismo de fototransducción y modelo de investigación. *Bitácora Digit.* 1, 1–4 (2013).
92. Ohguro, H., Van Hooser, J. P., Milam, A. H. & Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270, 14259–14262 (1995).
93. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 105–111 (2004).
94. Ortuño-Lizarán, I. *et al.* Degeneration of human photosensitive retinal ganglion cells may explain sleep and circadian rhythms disorders in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 90 (2018).
95. García-Ayuso, D. *et al.* Inherited photoreceptor degeneration causes the death of melanopsin-positive retinal ganglion cells and increases their coexpression of brn3a. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 4592–4604 (2015).
96. Buhr, E. D. *et al.* Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 13093–13098 (2015).
97. Thomas JL, Nelson CM, Luo X, Hyde DR, T. R. Characterization of multiple light damage paradigms reveals regional differences in photoreceptor loss.e. *Exp Eye Res.* 97, 105–116 (2012).
98. Murakami, Y., Miller, J. W. & Vavvas, D. G. RIP kinase-mediated necrosis as an alternative mechanisms of photoreceptor death. *Oncotarget* 2, 497–509 (2011).
99. Carmody, R. J. & Cotter, T. G. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell Death Differ.* 7, 282–291 (2000).
100. Pol, A. Van Der, Gilst, W. H. Van, Voors, A. A. & Meer, P. Van Der. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur. J. Heart Fail.* 1–11

(2018)

101. Tsuruma, K. *et al.* Role of Oxidative Stress in Retinal Photoreceptor Cell Death in N-Methyl-N-nitrosourea-Treated Mice. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 351–362 (2012).
102. Carmody, R. J., McGowan, A. J. & Cotter, T. G. Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Exp. Cell Res.* 248, 520–530 (1999).
103. Hampton, M. B. & Orrenius, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414, 552–556 (1997).
104. Lederman, M. *et al.* Degeneration modulates retinal response to transient exogenous oxidative injury. *PLoS One* 9, 1–10 (2014).
105. Wang, Y. *et al.* Retinoprotective effects of bilberry anthocyanins via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms in a visible light-induced retinal degeneration model in pigmented rabbits. *Molecules* 20, 22395–22410 (2015).
106. M., S., H., S., N., G.-B., N.A., B. & M., B.-A. Circadian (about 24-hour) variation in malondialdehyde content and catalase activity of mouse erythrocytes. *Redox Rep.* 20, 26–32 (2015).
107. Sani, M. *et al.* Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 145, 331–337 (2006).
108. Baran D1, Paduraru I, Saramet A, Petrescu E, H. I. Influence of light-dark cycle alteration on free radical level in rat CNS. *Rom J Physiol.* 37, 23–38 (2000).
109. Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* 26, 668–679 (2016).
110. Takahashi, M. *et al.* Stress Granules Inhibit Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Mol. Cell. Biol.* 33, 815–829 (2013).
111. Chen, L. & Liu, B. Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017).
112. Acar, N. *et al.* Lipid composition of the human eye: Are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? *PLoS One* 7, (2012).
113. Sun, G. Y. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* (2016).
114. Abedi, E. & Sahari, M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* 2, 443–463 (2014).
115. Zemski Berry, K. A., Gordon, W. C., Murphy, R. C. & Bazan, N. G. Spatial

- organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 55, 504–515 (2014).
116. Nguyen, C. T. O., Vingrys, A. J. & Bui, B. V. Dietary omega-3 fatty acids and ganglion cell function. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3586–3594 (2008).
  117. Hollyfield, J. G. *et al.* Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat. Med.* (2008).
  118. María Victoria Simón, Daniela L. Agnolazza, Olga Lorena German, Andrés Garelli, Luis E. Politi, Martin-Paul Agbaga, Robert E. Anderson, and N. P. R. Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress. *J Neurochem* 931–946 (2016).
  119. Bazan, N. G. NIH Public Access. *Prostaglandins* 81, 205–211 (2010).
  120. Politi, L. E., Rotstein, N. P. & Carri, N. G. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: Additive protection with docosahexaenoic acid. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3008–3015 (2001).
  121. Politi, L., Rotstein, N. & Carri, N. Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: Cellular and molecular aspects. *Lipids* 36, 927–935 (2001).
  122. Rotstein N. P., Politi L. E., G. O. L. and G. R. Docosahexaenoic acid protects retina photoreceptors from oxidative stress-induced apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2252– 2259 (2003).
  123. German, O. L., Monaco, S., Agnolazza, D. L., Rotstein, N. P. & Politi, L. E. Retinoid X receptor activation is essential for docosahexaenoic acid protection of retina photoreceptors. *J. Lipid Res.* (2013).
  124. Krigel, A. *et al.* Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* (2016).
  125. Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S. & Berman, S. *Retinal damage by light in rats. Investigative Ophthalmol.* (1966).
  126. Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R, V. P. Retinal damage by visible light in albino rats. An electron microscope study. *Ophthalmologica* 157, 43–59 (1969).
  127. Kuwabara T, G. R. Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol.* 69–78 (1968).
  128. Semple-Rowland SL, D. W. Cyclic light intensity threshold for retinal damage in albino rats raised under 6 lx. . *Exp Eye Res* 643–661 (1987).
  129. Remé, C. E., Braschler, U. F., Roberts, J. & Dillon, J. LIGHT DAMAGE IN THE RAT RETINA: EFFECT OF A RADIOPROTECTIVE AGENT (WR-77913) ON

ACUTE ROD OUTER SEGMENT DISK DISRUPTIONS. *Photochem. Photobiol.* (1991).

130. Sugawara, T., Sieving, P. A. & Bush, R. A. Quantitative relationship of the scotopic and photopic ERG to photoreceptor cell loss in light damaged rats. *Exp. Eye Res.* (2000).
131. Perche O, Doly M, R.-C. I. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* . 2753–2759 (2007).
132. Perche O, Doly M, R.-C. I. Transient protective effect of caspase inhibitors in RCS rat. *Exp Eye Res* 519–527. (2008).
133. Donovan M, Carmody RJ, C. T. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 23000–8. (2001).
134. Chahory S, Padron L, Courtois Y, T. A. The LEI/L-DNase II pathway is activated in light-induced retinal degeneration in rats. *Neurosci Lett* 205–209. (2004).
135. Donovan M, C. T. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ* 1220–31 (2002).
136. Chahory S, Keller N, Martin E, Omri B, Crisanti P, T. A. Light induced retinal degeneration activates a caspase-independent pathway involving cathepsin D. *Neurochem Int* 278–287 (2010).
137. Murakami, Y., Miller, J. W. & Vavvas, D. G. *RIP Kinase-Mediated Necrosis as an Alternative Mechanism of Photoreceptor Death. Oncotarget* 2, (2011).
138. Hao, W. *et al.* Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat. Genet.* (2002).
139. Chang, L. K., Putcha, G. V., Deshmukh, M. & Johnson, E. M. Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 84, 223–231 (2002).
140. Vanden Berghe, T., Hassannia, B. & Vandenabeele, P. An outline of necrosome triggers. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2137–2152 (2016).
141. Moriwaki, K.; Chan, F. K. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* 640–1649 (2013).
142. Lacoste MG, Ponce IT, Golini RL, Delgado SM, A. A. Aging modifies daily variation of antioxidant enzymes and oxidative status in the hippocampus. *Exp Gerontol.* 42–50. (2017).

143. Navigatore Fonzo LS, Golini RS, Delgado SM, et al. Temporal patterns of lipoperoxidation and antioxidant enzymes are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. *Hippocampus*. 869–880 (2009).
144. Kharwar RK, H. C. Daily variation in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in lungs of a tropical bird *Perdicula asiatica*: Role of melatonin and nuclear receptor ROR $\alpha$ . *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 296–302 (2012).
145. Fliesler SJ, A. R. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res*. 79–131 (1983).
146. SanGiovanni JP, C. E. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res*. (2005).
147. MF., B. Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chem Phys Lipids*. (1994).
148. Gawrisch K, S. O. Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function. *Chem Phys Lipids*. (2008).
149. Salas-Estrada LA, Leioatts N, Romo TD, G. A. Lipids Alter Rhodopsin Function via Ligand-like and Solvent-like Interactions. *Biophys J* (2018).
150. Benolken RM, Anderson RE, W. T. Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. *Science*. (1973).
151. Wheeler TG, Benolken RM, A. R. Visual membranes: Specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science* (80-). (1975).
152. Rozanowska M, S. T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochem Photobiol*. 1305–1330. (2005).
153. Lai, T. Y. Y. *et al.* Alterations in serum fatty acid concentrations and desaturase activities in Bietti crystalline dystrophy unaffected by CYP4V2 genotypes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51, 1092–1097 (2010).
154. Ntambi JM. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res*. (1999).
155. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, O. D. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 782–806 (2008).
156. Osborne, N. N., Li, G. Y., Ji, D., Mortiboys, H. J. & Jackson, S. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: Possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J. Neurochem*. 105, 2013–2028 (2008).
157. Gupta N, Brown KE, M. A. A. microglia in hu. Activated microglia in human

- retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 463–471 (2003).
158. Varela C, Igartua I, De la Rosa EJ, D. la V. P. Functional modifications in rod bipolar cells in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Vis. Res* 879–885 (2003).
  159. Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, F. B. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vis. Res* 867–877 (2003).
  160. Sang A, Cheng Y, Lu H, Chen D, Gao R, S. A. Light-induced retinal ganglion cell damage in vivo involves Dexas1. *Mol Vis* 134–143 (2011).
  161. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, O. N. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* . 685–693 (2004).
  162. Yang X, Chen H, Zhu M, Zhu R, Qin B, Fang H, et al. Up-regulation of PKM2 relates to retinal ganglion cell apoptosis after light-induced retinal damage in adult rats. *Cell. Mol Neurobiol* 1175–1186 (2015).
  163. Liu X, Yang X, Zhu R, Dai M, Zhu M, Shen Y, et al. Involvement of Fra-1 in retinal ganglion cell apoptosis in rat light-induced retina damage model. *Cell Mol Neurobiol* 83–92. (2017).
  164. Wong KY, Dunn FA, B. D. Photoreceptor adaptation in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 1001–1010 (2005).
  165. Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, G.-F. J. Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front Cell Neurosci* (2009).
  166. Hannibal J, Georg B, Hindersson P, F. J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* (2005).
  167. Mathes A, Engel L, Holthues H, Wolloscheck T, S. R. Daily profile in melanopsin transcripts depends on seasonal lighting conditions in the rat retina. *J Neuroendocr.* (2007).
  168. Russi, A. E. & Brown, M. A. HHS Public Access. 165, 255–269 (2016).
  169. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490 (1998).
  170. Dai, M., Zhang, Q., Zheng, Z. & Wang, J. Retinal ganglion cell-conditioned medium and surrounding pressure alters gene expression and differentiation of rat retinal progenitor cells. *Mol. Med. Rep.* (2018).
  171. Jain, V., Ravindran, E. & Dhingra, N. K. Differential expression of Brn3

transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol.* (2012).

172. Francisco M.Nadal-Nicolás, Manuel Salinas-Navarro, Manuel Jiménez-López, Paloma Sobrado-Calvo MaríaP.Villegas-Pérez, M.-S. and & MartaAgudo-Barriuso. Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front. Neuroanat.* (2014).

## ARTICULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS

- Contín, M. A., Arietti, M. M., **Benedetto, M. M.**, Bussi, C. & Guido, M. E. Photoreceptor damage induced by low-intensity light: model of retinal degeneration in mammals. *Mol. Vis.* 19, 1614–25 (2013).
- Contín, M. A., **Benedetto, M. M.**, Quinteros-Quintana, M. L. & Guido, M. E. Light pollution: The possible consequences of excessive illumination on retina. *Eye* 30, 255–263 (2016).
- Quinteros- Quintana, M. L., **Benedetto, M. M.**, Maldonado, M. M., Vera De Payer, A. C. E. & Contin, M. A. Electroretinography: A biopotential to assess the function/dysfunction of the retina. *J. Phys. Conf. Ser.* 705, (2016).
- **Benedetto, M. M.**, Guido, M. E. & Contin, M. A. Non-visual photopigments effects of constant light-emitting diode light exposure on the inner retina of Wistar rats. *Front. Neurol.* 8, 1–11 (2017).