

**ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESIÓN Y  
FUNCIÓN DE FOTOPIGMENTOS NO-  
VISUALES DE LA FAMILIA DE  
MELANOPSINAS EN LA RETINA INTERNA DE  
VERTEBRADOS**

**Morera Luis Pedro**

**Director: Dr. Mario E. Guido**

**Comisión:**

**Dra. Cecilia Sanchez**

**Dr. Santiago Quiroga**

**Dra. Silvia Correa**





## **1. INDICE**

## **2. RESUMEN**

## **3. INTRODUCCION**

3.1 El ojo

3.2 La retina

3.3 Luz y fototransducción

3.4 Desarrollo de la retina de pollo

3.5 Melanopsina

3.6 Células Horizontales y Melanopsina

## **4. MATERIALES Y METODOS**

4.1. Manejo de animales

4.2 Cultivos primarios de Células Horizontales (CHs)

4.3 Inmunopurificación

4.4 Inmunocitoquímica

4.5 Western Blot

4.6 Aislamiento de ARN y RT-PCR

4.7 Transfección

4.8 Determinación de  $Ca^{+2}$

4.9 Análisis de Retinoides

4.9.1 Liberación de [3H] GABA

## **5. RESULTADOS**

5.1 Obtención y caracterización de los cultivos primarios de Células Horizontales

5.2 Capacidad fotorreceptora de Células Horizontales

## **6. DISCUSION**

## **7. CONCLUSIONES**

## **8. ABREVIATURAS**

## **9. BIBLIOGRAFIA**

# RESUMEN

La fotosensibilidad retinal para medir niveles generales de iluminación es una función antiguamente adquirida en términos evolutivos, y probablemente anterior a la visión formal. La retina es un tejido neuronal sensible a la luz capaz de detectar y transmitir información fótica al cerebro. Aunque su función más conocida es permitir la formación de una imagen representativa del mundo (visión formal), la retina tiene una segunda función, menos conocida pero igualmente importante: funcionar como sensor de la intensidad de luz ambiente, con funciones independientes a la formación de imágenes (NIF, del inglés *non image forming*). Sabiendo que el ambiente en nuestro mundo es cambiante, la óptima supervivencia de los distintos organismos que habitan la tierra depende de anticiparse a los cambios y adaptar su fisiología acorde a los mismos. Esto es logrado a través de un reloj circadiano central ubicado en el hipotálamo de los vertebrados, en los núcleos supraquiasmáticos. Estos núcleos generan un ritmo de aproximadamente 24 horas que coordina temporalmente distintos ritmos fisiológicos y conductuales. Esta actividad endógena requiere un ajuste diario en su relación con el ciclo de luz solar exterior; y es ésta una de las principales funciones de la visión NIF, además del reflejo pupilar, la regulación del sueño, la supresión aguda de melatonina pineal, etc. Estas funciones son radicalmente diferentes de la visión formal clásica en varios aspectos: 1) la visión formal está mediada directamente por los fotorreceptores “clásicos”, bastones y conos, mientras que la visión NIF depende principalmente de una población de células ganglionares retinales “intrínsecamente fotosensibles” (CGRif), 2) estos dos tipos generales de neuronas fotosensibles divergieron en una etapa muy temprana de la evolución; los bastones y conos son fotorreceptores de tipo “ciliado” que responden a la luz a través de una hidrólisis de GMPc catalizada por una fosfodiesterasa específica, que lleva al cierre de canales de cationes y a la hiperpolarización de las membranas, mientras que las CGRif son receptores

de tipo “rabdomérico” que responden a la luz a través de una vía de señalización lipídica de fosfo-inositoles/diacilglicerol con la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que lleva a la despolarización celular. Las CGRif expresan el fotopigmento Melanopsina (Opn4) que sería responsable de la regulación por luz de tales actividades NIF. Dos tipos de melanopsinas han sido encontradas: Opn4X presente en peces, reptiles, aves y anfibios pero ausente en mamíferos, y un segundo tipo de melanopsina, Opn4m presente en peces, reptiles, aves, anfibios y mamíferos. En el pollo encontramos Opn4X no sólo en las CGRif sino también en CHs (desde estadios tempranos de desarrollo, E15).

Es en este contexto que describimos a las Células Horizontales, como posibles fotorreceptores.

A fin de estudiar su potencial fotosensibilidad y el rol de Opn4X en estas células desarrollamos un método de cultivo primario de CHs. Posteriormente caracterizamos estos cultivos por diversas metodologías.

En una segunda etapa nos propusimos determinar la posible fotosensibilidad intrínseca de estas células, y además, la implicancia de Melanopsina X en la misma. Para ello realizamos estudios con una sonda sensible a  $\text{Ca}^{+2}$ , Fluo4 AM. Comprobamos fehacientemente que las CHs responden a la luz, y mediante la utilización de distintos inhibidores, pudimos proponer a varios de los componentes que participan en la fotocascada.

Finalmente, habiendo cumplimentado una descripción mecanística, buscamos acercarnos a proponer el nuevo posible rol fisiológico de estas células, mediante [3H] GABA, pudimos comprobar que las CHs en cultivo liberan GABA como respuesta a un estímulo lumínico.



El conjunto de experimentos realizados en la tesis nos permite asegurar que las CHs responden intrínsecamente a la luz y podrían, además de cumplir con las funciones clásicamente reportadas para estas células de inhibición lateral, contribuir al circuito no visual. Muchas inquietudes surgen a partir de estos resultados, pero lo que es seguro es que el circuito retinal en aves, y específicamente la retina interna, presenta un nivel de complejidad y sofisticación mayor al ya conocido.

### **Abstract**

The photosensitivity of the retina to measure levels of light in general is a function formerly acquired in evolutionary terms, and probably before the formal view. The retina is the light sensitive tissue of the eye capable of detecting and transmitting photic information to the brain. Although the best known function is to allow the formation of an image that represent the world (formal view), the retina has a second function, lesser known but equally important: to function as a current sensor ambient light, non image forming functions (NIF, non-image forming English). Knowing that the atmosphere in our world is constantly changing, the optimum survival of the various organisms inhabiting the Earth depends to anticipate changes and adapt their physiology according to them. This is achieved by the circadian clock, located in the suprachiasmatic nuclei. These nuclei generate 24 hours rhythm and regulate different physiological and behavioral rhythms. This endogenous activity requires fit relationship con the cycle of outdoor sunlight; and this is one of the key features of NIF vision, besides the pupillary light reflex, sleep regulation, acute suppression of pineal melatonin, etc. Functions like this differ radically of formal vision in various aspects: 1) The formal Vision its mediated directly by the "classic" rods and cones, photoreceptors, while the NIF vision depends mainly on a population of retinal

ganglion cells "intrinsically photosensitive" (CGRif), 2) these two general types of light-sensitive neurons diverged in a very early stage of evolution; rod and cone photoreceptors have a "ciliated" type, that respond to light through a catalyzed hydrolysis of cGMP phosphodiesterase, leading to the closure of cation channels and hyperpolarization of the membranes, while ipRGC are "rhabdomeric" type receptors that respond to light through a pathway that implies lipid signaling phospho-inositol/diacylglycerol with the opening of  $Ca^{+2}$  channels leads to cell depolarization.

It is in this context, is that we describe horizontal cells as possible photoreceptors.

This thesis aimed to determine whether horizontal cells (CH's) of the retina respond to light.

We develop a method of primary culture of these cells. Subsequently these cultures are characterized by various methodologies.

In a second step we set out to determine the possible intrinsic photosensitivity of these cells, and in addition, the implication of melanopsin X therein. We carry out studies with a sensitive  $Ca^{+2}$ , Fluo4 AM probe. CH's irrefutably respond to light, and by using different inhibitors, we propose a number of components involved in photocascade.

Finally, we are having completed a mechanistic description, look closer to propose possible new physiological role of these cells, for that conduct studies with [3H] GABA. We found that the release CHs in culture [3H] GABA in response to a light stimulus.

The set of experiments in the thesis allows us to ensure that CHs inherently respond to light. Many questions arise from these results, but what is certain is that the retinal circuit in birds, specifically the inner retina, has a level of complexity and greater sophistication to the already known.

# INTRODUCCION

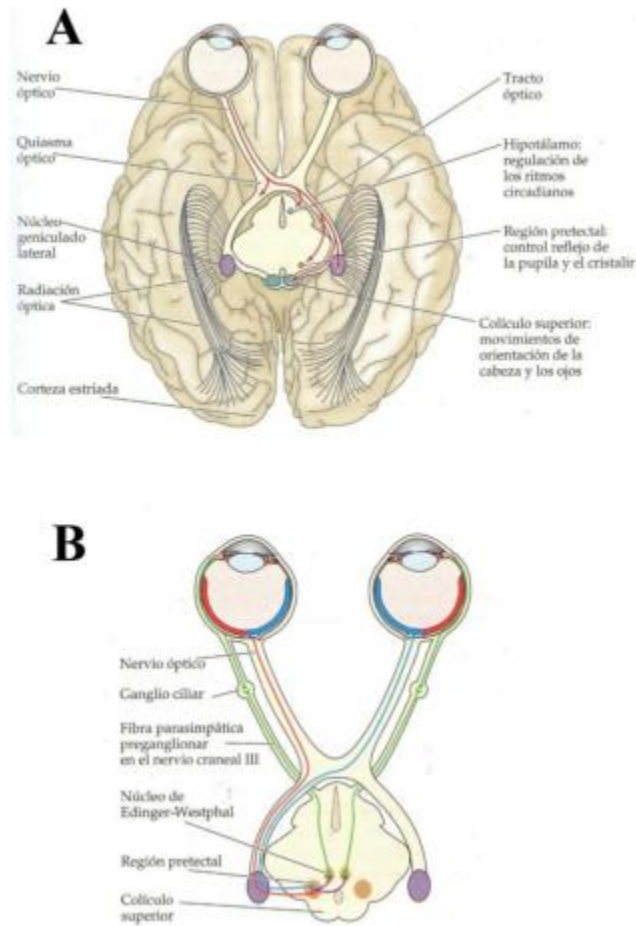
### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 El ojo

En mamíferos, el ojo es el único órgano especializado en el procesamiento de la información visual. La córnea y el cristalino concentran la luz y enfocan la imagen sobre la retina que descifra y codifica los diferentes componentes de la imagen (intensidad de luz, color, forma y movimiento). La visión juega un papel primordial en la conducta animal. La detección de la luz, permite a los individuos localizar tanto alimentos como posibles predadores y peligros. La luz consiste en radiación electromagnética, que se emite en forma de ondas y varía a lo largo del espacio y el tiempo. Así, en cierta forma podemos afirmar que vivimos en un turbulento mar de radiaciones electromagnéticas. Como en cualquier océano hay ondas grandes, pequeñas y medianas que interaccionan de muy diversas formas. A su vez los objetos pueden reflejarlas, absorberlas, curvarlas, etc. La función del sistema visual es extraer información sobre el mundo a partir de estas radiaciones electromagnéticas. Esto supone un gran trabajo y requiere una maquinaria neuronal muy especializada y compleja. De esta forma, la retina constituye la primera estación de relevo del procesamiento de la información fótica. El estudio de la organización de la retina de los vertebrados ha interesado a muchos investigadores a lo largo de los últimos 100 años. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones todavía continúan vigentes. La retina, como parte del sistema nervioso central, originado de una evaginación del cerebro, está organizada en capas. Todas las retinas de vertebrados están compuestas por 3 capas que contienen cuerpos celulares y 2 capas de interacciones sinápticas (denominadas plexiformes). La capa nuclear

externa (ONL) contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones. La capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células horizontales (CHs), bipolares (CB) y amacrinas (CA) y la capa de células ganglionares (CGR) contiene los cuerpos celulares de estas células ganglionares además de los de algunas células amacrinas desplazadas. Entre estas 3 capas se localizan las capas plexiformes donde se realizan la mayor parte de contactos sinápticos de la retina: capa plexiforme interna y externa. Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de la plexiforme interna con las terminaciones de las células bipolares y amácrinas. Su axón se sitúa a nivel de la capa de las fibras del nervio óptico y sólo se mieliniza a nivel del nervio óptico, por fuera ya del globo ocular. Este axón llega hasta el cuerpo geniculado externo en mamíferos, y al tectum óptico en aves, donde ocurre la siguiente sinapsis de la vía visual.

La información se transmite en forma de impulsos nerviosos por los nervios ópticos. Los nervios ópticos se entrecruzan parcial o totalmente (dependiendo de la especie) en el quiasma óptico y se proyectan a través del tracto óptico a centros visuales del cerebro, que tras diversas etapas de procesamiento, darán origen a la imagen visual consciente.



*Esquema 1. Fisiología de la visión. A. Cerebro visto por su cara inferior. B. Esquematación de globos oculares y nervios ópticos.*

Otros centros del encéfalo reciben información fótica proveniente de la retina y la utilizan para regular el reflejo pupilar, controlando así, las condiciones de iluminación ambiental y la dirección de los ojos hacia blancos de interés. Asimismo, esta información llega a centros no visuales especializados en la regulación del comportamiento asociado a los ciclos día/noche, ubicados en el hipotálamo anterior, los núcleos supraquiasmáticos (SCN) donde reside el reloj central de los mamíferos (esquema 1).

### 3.2 La Retina y las aves

Los ojos pueden ser incluso más importante para las aves que para los seres humanos. Un indicio de esto es que los ojos de aves son mucho más grandes, con relación al área total de la cara, que los ojos humanos. Por supuesto, nadie sabe realmente lo que las aves ven, pero podemos hacer conjeturas después de estudiar la anatomía del ojo de las mismas. Por ejemplo, la retina es una membrana delgada en la parte posterior del globo ocular. Recibe la imagen de la lente del ojo y está conectado al cerebro por el nervio óptico. Entre los receptores de las células de la retina están los conos, que se utilizan para la visión diurna. Cuanto más densa es la retina en conos, más nítida es la imagen percibida. El ojo humano tiene como máximo 200.000 conos por milímetro cuadrado, mientras que los gorriones tienen aproximadamente el doble de ese número. Las águilas, que debe detectar pequeñas presas desde grandes alturas, poseen unas cinco veces más conos que los seres humanos. Se cree que los pájaros cantores y los depredadores como los halcones tienen la visión más aguda entre las aves. Pueden ver detalles en distancias de dos a tres veces más lejos que los humanos. La retina de un pájaro en realidad tiene tres tipos de fotorreceptores visuales que " traducen " la luz en impulsos nerviosos (Bowmaker 1998):

- Bastones de visión en blanco y negro en la penumbra
- Conos de longitud de onda larga (rojos)
- Conos de longitud de onda media (verdes)
- Conos de longitud de onda corta (azul)
- Conos UV

Lo interesante aquí es que los seres humanos sólo tienen dos tipos de fotorreceptores, conos y bastones. Por lo tanto las aves pueden ver más colores que los humanos. De hecho, pueden ser capaces de percibir ultravioleta o ultravioleta cercano, capacidad que los humanos no poseen. Además, las retinas de aves, a diferencia de las retinas humanas, no contienen vasos sanguíneos. Esto evita las sombras y la dispersión de la luz, lo que resulta en reducción de la visión humana. Algunas aves nocturnas como los búhos tienen una capa en la parte posterior del ojo llamada *tapetum lucidum* que, como un espejo, refleja la luz de nuevo a través de la retina, por lo que hace más probable que la luz incida sobre las células sensoriales de la retina. Como resultado de ello, las aves con un *tapetum lucidum* tienen mayor sensibilidad a la luz en la noche. Se ha sugerido que la agudeza visual puede incluso no ser la principal ventaja de las aves sobre los seres humanos. Más bien, su ventaja puede estar en la capacidad de su cerebro para captar a simple vista una imagen que un ojo humano tendría que escanear de un lado a otro para ver y entender. Esto es más una cuestión de circuitos cerebrales que de la estructura del ojo.

La retina entonces, codifica el mundo visual, transformando los estímulos luminosos en impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. Esto ocurre a través de dos vías, una visual (formadora de imágenes) y/o una no visual (sincronizadora de ritmos, reguladora de reflejo pupilar, etc.). Las protagonistas principales de estos procesos, además de los conos y bastones, son las células ganglionares de la retina (CGRs); ellas transmiten la información lumínica al cerebro proyectando a distintas áreas del mismo, y conforman tanto el circuito no-visual como el visual. Hoy sabemos que no solo conos y bastones son capaces de detectar luz, sino también una subpoblación de CGRs denominadas intrínsecamente fotosensibles (CGR<sub>f</sub>) posee esta propiedad gracias a que expresan el fotorreceptivo no-visual melanopsina (Opn4).



### 3.2.1 Descripción de las diferentes células que componen la retina de pollo.

#### Células no nerviosas de la retina de pollo

Las **células del epitelio pigmentario**, que contactan la retina externa están organizadas en una monocapa de células (epitelio pigmentario retinal) que se asienta sobre una membrana basal. Estas células presentan una coloración particular oscura, casi negra, porque poseen gránulos de melanina en el citoplasma, destinados a absorber el exceso de luz que llega hasta la retina. También están encargadas de reconstituir el cromóforo utilizado por los fotorreceptores, isomerizándolo de *all-trans* retinal a la forma activa *11-cis*, y devolverlo a la capa de fotorreceptores. Esta capa es la más externa de la retina no neural (Hageman and Johnson 1991).

#### Células gliales: **células de Müller**

Las **células de Müller** son células gliales cuyos núcleos se sitúan en la capa nuclear interna y cuyos procesos atraviesan todas las capas de la retina, desde la membrana limitante externas a la limitante interna constituyendo un importante soporte estructural. Las células de Müller tienen un variado rango de funciones vitales para la salud de las neuronas retinales. Estas células desempeñan un rol crucial en la retina, colaborando con los conos en el reciclado del cromóforo (Díaz col., 2016a), y ejerciendo un sin número de funciones, no solo de apoyo estructural sino también participando en el metabolismo retinal, la fagocitosis de restos neuronales, la liberación de ciertos transmisores y factores tróficos, y la captación de  $K^+$  (Simón MV col., 2012; Vecino Ecol., 2016).

## Células nerviosas de la retina de pollo

### **Fotorreceptores**

Los **bastones** y **conos** son células altamente polarizadas y especializadas en la fotorrecepción. Se localizan en el extremo distal de la retina, adyacente a la capa pigmentaria retinal.

Los conos presentan una estructura cónica, con sus núcleos alineados en una sola capa justo por debajo de la membrana limitante externa con sus segmentos internos y externos proyectándose dentro del espacio subretinal hacia el epitelio pigmentario. Los bastones poseen una morfología alargada con sus segmentos internos y externos relleno el espacio entre los conos y los procesos de las células del epitelio pigmentario. Los cuerpos celulares de los bastones constituyen el resto de la capa nuclear externa formando varias capas.

Los fotorreceptores clásicos están divididos en dos segmentos principales, el segmento interno en contacto con la capa plexiforme externa y el segmento externo en contacto con el epitelio pigmentario. El soma de la célula constituye el segmento interno. A nivel de la unión entre los segmentos internos y externos de los fotorreceptores existe un cilio de unión, a partir del cual se producen una serie de evaginaciones e invaginaciones de la membrana plasmática que dan lugar al segmento externo. Estos contienen discos membranosos apilados que contienen los fotopigmentos (Dowling and Boycott 1966). Los fotopigmentos son complejos proteicos transmembrana especializados en captar fotones de luz e iniciar la transducción de la señal lumínica (Wald 1951).

Los fotorreceptores en la retina de pollo incluyen un tipo de bastones y seis tipos de conos. El pollo presenta visión tetracromática, mediada por 4 tipos de conos individuales, que tienen sus máximos de absorción en el espectro visible, en el violeta, el azul, el verde y

el rojo. Los dos tipos de conos restantes constituyen un par de conos dobles, que actúan como una unidad funcional mediando la detección de luminosidad ambiental que permite la percepción de movimiento (Kram, Mantey et al. 2010).

Prolongaciones de células del epitelio pigmentario rodean los segmentos externos de conos y bastones, desempeñando funciones muy importantes para mantener la funcionalidad del fotorreceptor, como es la participación en la regeneración del cromóforo *all-trans* retinal a su forma activa *11-cis*, y la captación y degradación de los discos de segmentos externos que son liberados periódicamente al espacio subretinal (LaVail 1983; Nguyen-Legros and Hicks 2000).

Los fotorreceptores presentan terminaciones especiales en los segmentos internos en contacto con la capa plexiforme externa. En el caso de los conos son de forma triangular y se denominan pedúnculos. Las terminaciones de los bastones presentan morfología redondeada y se denominan esférulas. Ambos tipos de terminaciones poseen vesículas sinápticas que contienen glutamato, neurotransmisor excitatorio que interactúa con receptores glutamatérgicos en células bipolares y horizontales (Lukasiewicz 2005). Los fotorreceptores liberan glutamato en condiciones de oscuridad y están despolarizados. Ante la estimulación luminosa los fotorreceptores se hiperpolarizan, cesando la liberación de neurotransmisor (Dowling and Boycott 1966).

### **Células bipolares**

Las **células bipolares** hacen sinapsis con las terminaciones de los fotorreceptores y transmiten las señales hacia las CGRs. El soma está situado en la capa nuclear interna con una expansión dendrítica hacia la capa plexiforme externa donde contacta con pedúnculos y

esférulas de fotorreceptores. También tienen un axón que termina a nivel de la capa plexiforme interna haciendo sinapsis con células amácrinas y CGRs.

En respuesta a la liberación de glutamato por parte de fotorreceptores algunas células bipolares se hiperpolarizan (tipo OFF) mientras que otras se despolarizan (tipo ON) (Werblin and Dowling 1969; Werblin 1991) dependiendo de los receptores postsinápticos que posean. Estos dos tipos celulares forman la base de los campos receptivos OFF y ON de las células ganglionares (Balasubramanian and Sterling 2009).

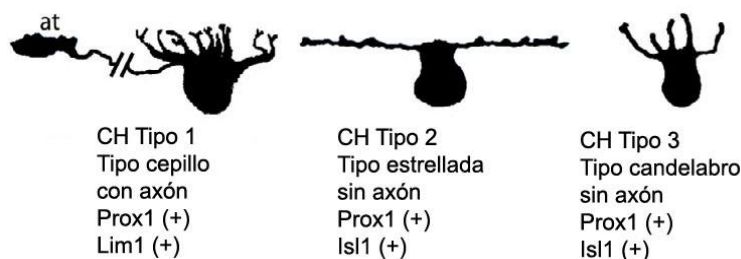
### **Células horizontales**

Las **células horizontales** son interneuronas de asociación lateral ubicadas al nivel de la capa plexiforme externa. Están entre las células bipolares y fotorreceptores y forman sinapsis con ambos tipos celulares. En la retina de pollo, las células horizontales forman una capa en la zona externa de la capa nuclear externa. Las células horizontales, igual que los fotorreceptores, también responden a la luz con una hiperpolarización, pero a la vez existen sinapsis recíprocas desde las células horizontales hacia los fotorreceptores. Estas sinapsis hacen que la información de las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos, realicen una adición espacial de los estímulos colaborando en la organización centro/periférica de los campos receptores de las CGRs.

En retina de vertebrados se han descrito dos clases de células horizontales, con axón y sin axón. En las retinas de roedores se identifica sólo un tipo de células horizontales (células horizontales con axón) (Peichl and Gonzalez-Soriano 1994), pero retinas de varias especies de peces, tortugas, aves y mamíferos (incluyendo primates) poseen células horizontales sin axón (Tarres, Baron et al. 1986; Mariani 1987; Kolb, Nelson et al. 2001; Connaughton,

Graham et al. 2004). La retina de pollo presenta tres subtipos identificados por su morfología (Tanabe, Takahashi et al. 2006): las células tipo I, o H1, con presencia de axón, con su árbol dendrítico en forma de cepillo. Los otros dos tipos son células horizontales sin axón; estrellada (H2 o tipo II) y forma de candelabro (H3 o tipo III). Solamente las células H1 contactan con bastones, mientras que los árboles dendríticos de los tres tipos celulares contactan con conos. Esta organización funcional parece estar conservada en diferentes especies de vertebrados (Gallego 1986; Peichl, Sandmann et al. 1998).

Los dos tipos celulares (con y sin axón) pueden ser distinguidos por la expresión de factores de transcripción específicos. Además de la expresión de los factores de transcripción *Prox1* y *Pax6* (gen maestro) comunes a todas las células horizontales, las células con axón (células horizontales tipo I) expresan *Lim1*, y las células sin axón (tipo II y III), expresan *Isl1* (ver Esquema 2) (Edqvist, Myers et al. 2006; Edqvist, Lek et al. 2008). Las vías de las CHs son Gabaérgicas y liberan GABA en las sinapsis con conos y bastones. Además presentan receptores para dopamina y melatonina.



**Esquema 2. Células horizontales de la retina de pollo.** CH: célula horizontal. *Prox1*, *Lim1*, *Isl1*, factores de transcripción. Adaptado de (Edqvist, Lek et al. 2008).

### **Células amácrinas**

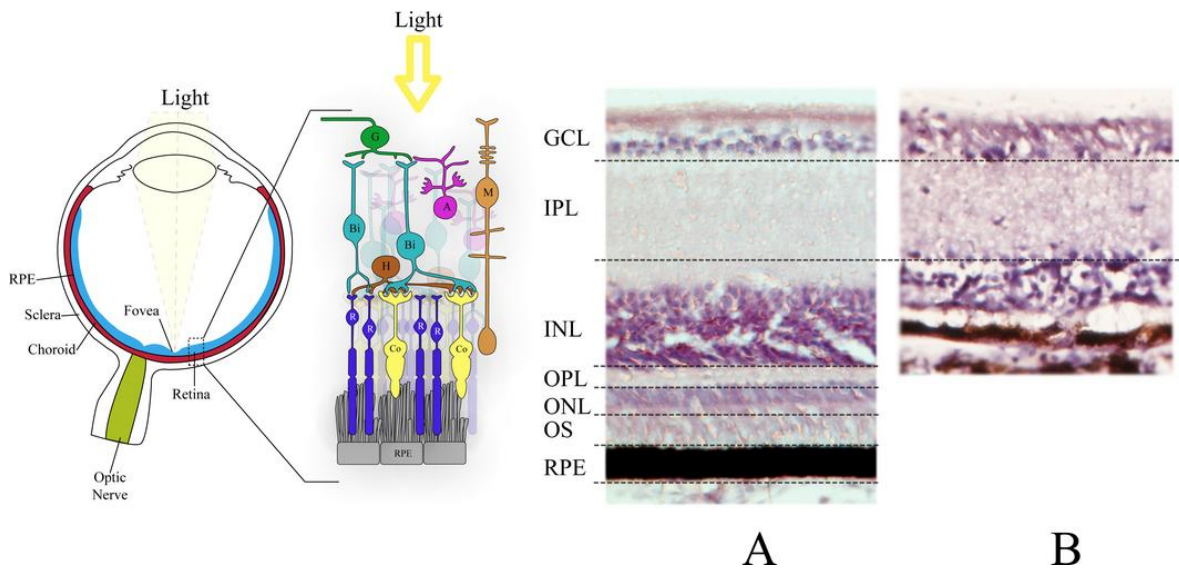
Las **células amácrinas** son las interneuronas de la retina interna y establecen contactos laterales haciendo sinapsis con otras células amácrinas, con conexiones de anterocontrol con CGRs y de retrocontrol con las terminaciones de células bipolares. Estas células presentan un cuerpo celular situado en la zona proximal de la capa nuclear interna y prolongaciones que se extienden por la capa plexiforme interna. Como las células horizontales, este grupo de células tampoco constituyen una población homogénea. Contienen una gran cantidad de neurotransmisores: numerosos péptidos, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glicina, acetilcolina y dopamina entre otros. Los más importantes en la fisiología de estas células son GABA, glicina y acetilcolina. Los dos primeros contribuyen a la inhibición anterógrada de las CGRs (Kolb, Netzer et al. 1997).

### **Células interplexiformes**

Las **células interplexiformes** fueron descritas por primera vez por el Dr. Antonio Gallego en la retina de gato (Gallego 1971). Posteriormente se encontraron en la retina de casi todas las especies analizadas. Estas células reciben aferencias sinápticas desde la capa plexiforme interna y mandan sus aferencias hacia la capa plexiforme externa. El soma está situado a nivel de la capa nuclear interna y posee ramificaciones que se extienden hacia la capa plexiforme interna y hacia la capa plexiforme externa. Estas células parecen transportar información desde la parte interna hacia la parte externa de la retina, y representan una inversión del flujo normal de información. En peces y monos, el neurotransmisor que actuaría en las sinapsis de estas células es dopamina.

## Células ganglionares

Las **células ganglionares** constituyen la vía de salida de las neuronas de la retina de vertebrados. Las CGRs reciben la neurotransmisión de las señales visuales de los canales verticales y horizontales integrados de transmisión neuronal. Se sugiere que los neurotransmisores endógenos de la mayoría de estas células son el glutamato y el aspartato (Beaudet, Cuenod et al. 1981). Se ha descrito una subpoblación de CGRs desplazadas, cuyos somas estarían ubicados en la capa nuclear interna y utilizarían catecolamina como neurotransmisor (Keyser, Britto et al. 1990). Estas células son en promedio de mayor tamaño que las interneuronas precedentes y tienen axones largos que forman el nervio óptico, y son capaces de transmitir la señal eléctrica a áreas específicas en el cerebro, distantes de milímetros a centímetros (Francois and Deweer 1950).



*Esquema 3. Representación esquemática del ojo de los vertebrados y de la retina. La retina es un tejido de múltiples capas que está en la parte posterior del ojo y hace contacto con el epitelio pigmentario de la retina (RPE). La retina se compone de: células fotorreceptoras: los conos (Co) y los bastones (R) con segmentos*

*exteriores (OS) y segmentos interiores (IS). Sus núcleos forman la capa nuclear externa (ONL); esta forma una capa de sinapsis en la capa plexiforme externa (OPL) con la capa interna nuclear (INL), que incluye células horizontal (H), células amacrinas (A), y las células bipolares (Bi). Los procesos de la INL forman la capa plexiforme interna (IPL), que conecta con las células ganglionares (G) en la capa de células ganglionares (GCL). Los axones de GC forman el nervio óptico. Las principales células gliales de la retina son las células de Müller (M) que soportan la actividad de la retina neural. (A, B) tinción histológica de retinas de un animal wild tipo (A) o de un animal que presenta degeneración de la retina (B) en la que hay una pérdida completa de las células fotorreceptoras visuales.*

### **3.2.2 El pollo como modelo de estudio**

Desde la antigua Grecia, Aristóteles puso de relieve al pollo como el mejor modelo para estudiar el desarrollo del ojo. Los Pollos (*Gallus domesticus*) presentan varias ventajas como modelo animal para investigar la retina. Por ejemplo, tienen grandes ojos que crecen sorprendentemente rápido (100 micras por día). Este modelo aviar llega a la madurez rápidamente en pocos meses. En el pollo, nuestro modelo de estudio, las CGRif actúan a través de una fotocascada similar a la de invertebrados y expresan 2 genes para Opn4: Opn4m y Opn4x, ortólogos de mamíferos y *Xenopus* respectivamente (Contin, Verra et al. 2006; Verra, Contin et al. 2011). Es de destacar que Opn4x se expresa también en células horizontales (CHs) de la retina de pollo; esto les confiere potencial fotosensibilidad y sustenta la idea que las CHs derivarían de un ancestro común con las CGRs y los fotorreceptores (FRs) rabadoméricos de invertebrados.



### 3.3 Desarrollo de la retina de pollo

El sistema visual del pollo es y ha sido uno de los modelos más útiles y estudiados para entender la formación del cerebro. El desarrollo en el ojo de pollo, tiene gran similitud con otros vertebrados estudiados.

En el pollo, en las primeras horas de desarrollo, posterior a la fecundación, se produce la neurulación, en donde aparece una línea rostro caudal formada por las crestas neurales que se unen para formar el tubo neural. La parte anterior se divide en tres vesículas cerebrales: prosencéfalo (que comprende el diencéfalo y telencéfalo), mesencéfalo y rombencéfalo. Cada una de estas vesículas dará lugar a diferentes partes del cerebro. El diencéfalo da lugar al tálamo, subtálamo, hipotálamo y se producen evaginaciones que dan lugar a la vesícula óptica. Las vesículas ópticas están conectadas al sistema nervioso central incipiente por un tallo que posteriormente constituirá el nervio óptico (Sernagor, Eglen et al. 2006). En este estadio todas las células son multipotenciales (Hyer, Mima et al. 1998). La vesícula óptica en contacto con el ectodermo superficial, forma la lente, la vesícula óptica se pliega sobre si y forma una copa de doble capa. El proceso de invaginación forma la copa óptica. El ectodermo neural da lugar a la retina y al epitelio pigmentario retinal, el mesodermo produce la cornea y la esclera, y las lentes se generan del ectodermo superficial. Factores de crecimiento de la familia FGF y otros factores difusibles constituyen señales moleculares para definir la identidad neuronal o epitelial (Mey and Thanos 2000).

Luego de la invaginación y formación de la copa óptica comienza la proliferación celular. Las células en el neuroepitelio que generarán la retina migran con un patrón definido. Cuando entran en fase G<sub>0</sub>, la célula indiferenciada migra hacia la posición final

que ocupará en la retina madura y comienza su diferenciación. Las células progenitoras pueden generar cualquier tipo de neurona de la retina (Turner and Cepko 1987). Aún son desconocidos los mecanismos que gobiernan el destino celular (Livesey and Cepko 2001).

#### Génesis de las diferentes poblaciones de neuronas en la retina.

El orden en que las neuronas de la retina “nacen” (definido como el momento en el cuál abandonan el ciclo celular) es altamente conservado en vertebrados.

Las primeras células en nacer son las CGRs en el estadio embrionario 3-4 (E3-E4, estadio embrionario definido como días de desarrollo en el pollo), luego nacen en un orden superpuesto células horizontales (E3-E6), células amácrinas (a partir de E4) y fotorreceptores (a partir de E8) y en último lugar células bipolares (a partir de E10-E12). En la especificación y diferenciación de cada tipo celular intervienen diferentes factores de transcripción (Mey and Thanos 2000).

#### **Maduración morfológica y funcional**

Los **fotorreceptores** comienzan a extender procesos apicales en E9. Durante la tercera semana de desarrollo, se elonga el segmento externo (Olson 1979). La formación de los discos membranosos contenidos en el segmento externo, que albergan los fotorreceptores es continua durante toda la vida de la célula. La renovación permanente de los discos de los segmentos externos procede en dirección basal a apical y depende de la interacción con las células del epitelio pigmentario, que fagocita los discos eliminados (Schonbach and Schonbach 1972).

Los fotorreceptores presentes en los segmentos externos de los fotorreceptores aparecen entre E12 y E16, comenzando por las opsinas roja y verde, luego rodopsina, y finalmente se

expresan las opsinas azul y violeta (Bruhn and Cepko 1996; Cailleau, Bernard et al. 2005). Se detectó actividad de la enzima Glutamina sintetasa en la tercera semana de desarrollo, antes del nacimiento, entre E16 y E20. Asimismo, se detectan en esta misma ventana temporal, sinapsis maduras en la capa plexiforme externa (E18). La respuesta eléctrica normal a la estimulación lumínica se desarrolla entre E17 y estadio posnatal 3 (P3) (Mey and Thanos 2000). Por lo tanto se considera que los conos y bastones pueden cumplir su función como fotorreceptoras cuando todas estas condiciones de madurez están dadas, a partir del E17-E18, en el desarrollo del embrión de pollo.

Las **células horizontales** nacen entre E3 y E6 (Edqvist, Lek et al. 2008) muy temprano en el desarrollo, pero se diferencian tardíamente, entre E12-E15 alcanzando su posicionamiento final. Se distinguen tres clases de células horizontales: sin axón especificadas por la expresión de los factores de transcripción *Prox1* y *Lim1*, que en su madurez expresan Calretinina. Las células horizontales con axón, subtipo estrellada y candelabro. La expresión de calretinina, GABA y TrkA puede ser considerada como marcador de madurez y de identidad de estas células.

El 50% de las células horizontales prospectivas expresan *Prox1* y coexpresan el factor *Lim1*. Esta combinación de factores da lugar a células horizontales con axón, subtipo cepillo (H1) que harán sinapsis con conos y bastones en la capa plexiforme externa. El restante 50%, coexpresa *Prox1* y *Islet1*, dando lugar a células horizontales sin axón que harán sinapsis con los conos. De esta población, el 20% conformarán el subtipo estrellada (H2) y el restante 80% el subtipo candelabro (H3). Las células horizontales sin axón establecerán sinapsis exclusivamente con conos. En la madurez, estos subtipos pueden ser identificados también por la expresión de proteínas características: las células H1 expresan calretinina, las H2 expresan GABA, y las H3 expresan TrkA (Edqvist, Lek et al. 2008).

Las **células amácrinas** entran en fase G0 a partir del E4 en la retina del pollo. Debido a su gran diversidad, las distintas poblaciones se diferencian y maduran en un rango muy amplio de tiempo, entre E12 y P7. Las **células bipolares** son las últimas en salir del ciclo celular y también son las últimas en diferenciarse. Las primeras conexiones sinápticas con fotorreceptores ocurren a partir de E17, revisado por (Mey and Thanos 2000).

Las **células ganglionares** entran en G0 en E3-E4, los neuroblastos extienden prolongaciones a ambos lados de la retina, dejan la zona ventricular y migran verticalmente manteniendo contacto en las dos direcciones hacia la membrana limitante interna donde constituyen la capa ganglionar. En el estadio E8 se considera que las células ganglionares están diferenciadas. El axón se forma de la prolongación vítrea y la otra prolongación se retrae. A partir de E7 los procesos neuríticos se extienden hacia la capa plexiforme interna. Las dendritas crecen y arborizan extensamente con patrones determinados entre E8 y E13. Como en otras células nerviosas, el número de puntos de arborización dendrítica y sinapsis alcanza un máximo durante el desarrollo embrionario y posteriormente declina a un nivel maduro y menos complejo.

Entre los estadios E11 y E16 en el desarrollo de la retina, un evento de apoptosis lleva a la muerte a un tercio aproximadamente de las células ganglionares desarrolladas (Hughes and McLoon 1979). Como la mayoría de los vertebrados el pollo posee una región central especializada con alta agudeza visual, completamente definida cuatro semanas después del nacimiento. A diferencia de las aves cazadoras y algunos búhos que combinan visión estéreo óptica (visión en profundidad) con alta agudeza, los pollos no desarrollan fovea (que permite visión nítida central y claridad en los detalles) en el área central (Mey and Thanos 2000).

Las proyecciones a las áreas cerebrales visuales y no visuales (el tectum óptico, núcleo olivario pretectal, núcleos de Edinger-Whestpal, ganglio ciliar y núcleo supraquiasmático) comienzan a establecerse a partir del estadio embrionario E7 y dependiendo de la vía puede continuar hasta el estadio E12-E14.

Es de destacar que en CGRs de pollo observamos inhibición de la síntesis de melatonina en respuesta a la luz como así también otras respuestas tempranas y específicas al estímulo lumínico (cambios de niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , activación del ciclo de los fosfoinosítidos, etc.) utilizando células en cultivo de retina embrionaria E8.

Es de suponer que las responsables de esta respuesta son las CGRif por lo que esta población se consideraría funcionalmente activa y madura en la retina de pollo en estadio E8 (Contin, Verra et al. 2006; Contin, Verra et al. 2010). Esta sensibilidad temprana a la luz podría ser esencial para la regulación temporal de programas de desarrollo y fisiología en respuesta a condiciones ambientales de iluminación, antes de que haya algún esbozo de visión formal.

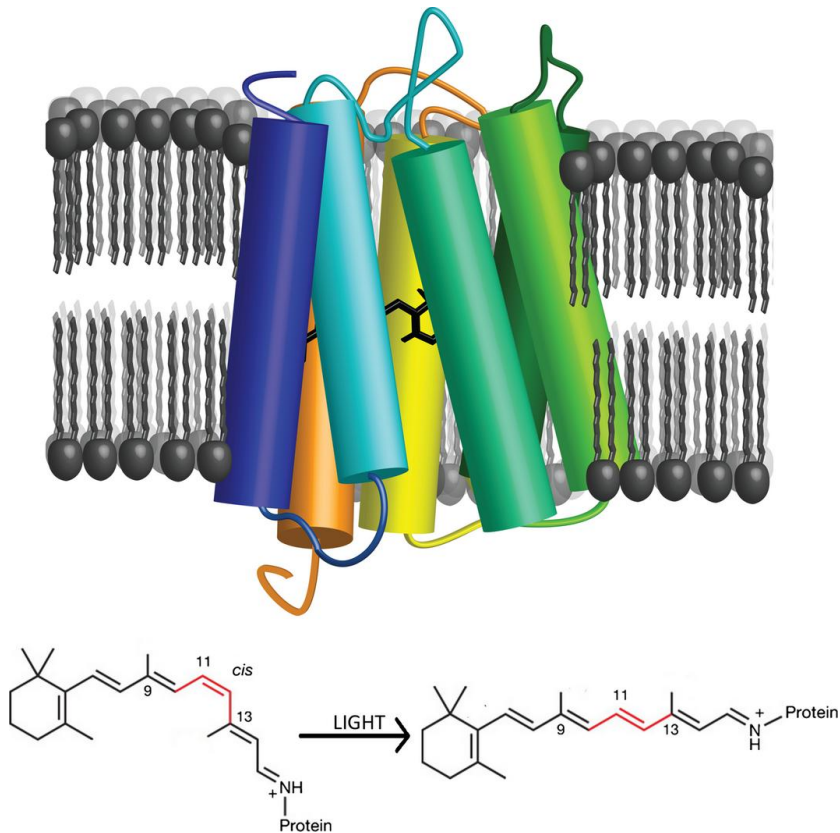
La estructura del huevo en el que se desarrollan las aves, tiene un alto grado de transmisibilidad de la luz, por lo que el estímulo lumínico puede penetrar (en condiciones naturales de incubación) y regular distintas funciones no visuales requeridas tempranamente en el desarrollo.

### **3.4 Luz, fototransducción y fotopigmentos**

La luz transporta información acerca del entorno en el que habitamos, información que puede ser interpretada por los animales mediante la visión. Cerca del 96% de las especies animales que viven en la actualidad tienen ojos formadores de imágenes, prueba de la

importancia de la visión para la supervivencia y el éxito evolutivo (Fernald 2006). La visión en la mayoría de los vertebrados se limita a la percepción de ondas electromagnéticas con longitudes de onda entre los 400nm y los 700nm (espectro visible)(Lamb, Collin et al. 2007). La fototransducción es la conversión de esta radiación electromagnética en señales electroquímicas que pueden ser aprovechadas por el cerebro. En experimentos realizados en la década de 1930, George Wald determinó que la fotoisomerización del 11-cis-retinaldehído es el resultado de la absorción de la luz por el pigmento visual. La fotólisis y la subsecuente regeneración del pigmento visual es lo que se conoce como ciclo visual.

Los ftopigmentos consisten en una apoproteína, la opsina (insertada en la membrana plasmática de las células fotorreceptoras), que mantiene covalentemente un cromóforo, retinaldehído; en presencia de la luz, recibe la energía de un fotón incidente y el cromóforo se foto-isomeriza de su conformación 11-cis a todo-trans (esquema 4) y, de esta manera genera un cambio conformacional en la opsina; este cambio altera a su vez la estructura terciaria de la opsina, activando una cascada de señalización intracelular en la célula fotorreceptora (Terakita, Tsukamoto et al. 2008).



*Esquema 4. Representación de una opsina típica. Un receptor acoplado a proteína G con siete dominios transmembrana, representada con diferentes cilindros. Todas las opsinas descritas tienen una vitamina, un derivado (retinaldehído o retina) unido a una lisina en el bolsillo hidrofóbico. En condiciones de oscuridad, el retinaldehído está presente como 11-cis retinal que se fotoisomeriza a la forma todo-trans. El isómero todo trans cambia la conformación de la opsina y activa una proteína G que a su vez desencadena una cascada de fototransducción específica.*

Se pueden distinguir dos formas de fotorrecepción. Una, conocida como visión formadora de imágenes, se caracteriza por una alta resolución espacial y temporal que le permite a los animales detectar y seguir objetos, obtener imágenes mono o policromáticas y tener una referencia del mundo visual; la otra, llamada visión no formadora de imágenes, reporta únicamente el nivel de la luminosidad externa para regular distintas actividades

subconscientes y reflejas tales como la sincronización del reloj biológico interno (ciclo circadiano) con los ciclos de luz y sombra del medio (“photoentrainment”); también controla el tamaño de la pupila en respuesta a la luz del medio y el sueño, la fotofobia, supresión de melatonina pineal, etc.(Fu, Zhong et al. 2005; Nayak, Jegla et al. 2007). Los ritmos circadianos, a su vez, afecta a la temperatura corporal, los niveles hormonales y los patrones en actividades como el sueño, alimentación y estados reproductivos(Doyle and Menaker 2007). Estos ritmos son regulados por el núcleo supraquiasmático (SCN), situado en el hipotálamo, mientras que el reflejo pupilar es regulado por el núcleo olivar pretectal, el núcleo de Edinger Westphal (EW) y las proyecciones laterales al ganglio ciliar (GC). La supresión de melatonina en la pineal tiene lugar a través de una proyección multisináptica a través del ganglio cervical superior (GCS) (esquema 5).

En las funciones reflejas y subconscientes se mantienen aun en condiciones de ceguera con pérdida o degeneración de los fotorreceptores visuales como en los ratones *rd* o en los pollos *GUCY 1\**. En relación a esto, nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que estas aves (poseedoras de una mutación en la guanilato ciclasa, por lo que carecen de GMPc) son ciegas desde nacimiento y detectan luz a través de su retina interna, que sincroniza sus ritmos diarios de alimentación y el reflejo pupilar, los ritmos diarios de expresión de la enzima NAT y la sensibilidad pupilar. Es de destacar, además, que estos pollos expresan ambos mensajeros de *Opn4*.





(EW); ganglio ciliar (GC); glándula pineal (P); ganglio superior cervical (GSC). Adaptado de (Guido, Garbarino-Pico et al. 2010)

### 3.5 Melanopsina

Si bien se conocía que los fotopigmentos visuales contenidos en conos y bastones eran las opsinas de conos y rodopsina respectivamente, otros fotopigmentos fueron descritos en la retina interna con funciones, en un primer momento, desconocidas. En 1998 se describió una nueva opsina que estaba mediando la migración de melanosomas hacia la periferia celular en melanóforos de *Xenopus laevis* en respuesta directa a la luz (Provencio, Jiang et al. 1998). A esta nueva opsina se le llamó melanopsina, por el tejido de origen, y mediante hibridación in situ se identificó en el cerebro y en la retina de *X. laevis*. Posteriormente se identificó que en la retina del ratón, las células inmunopositivas para melanopsina resultaron ser las mismas células que se marcaban por transporte retrógrado desde el SCNm (Hattar, Liao et al. 2002). En paralelo David Berson (2002) descubrió una subpoblación de CGRs intrínsecamente fotosensibles, con la participación de una opsina, Melanopsina, que les confiere fotosensibilidad intrínseca. Usando ratones con degeneración de la retina (rd/rd) y ratones sin melanopsina (*Opn4<sup>-/-</sup>*) se demostró que la melanopsina era necesaria para obtener respuestas no visuales, puesto que en ratones rd/rd; *Opn4<sup>-/-</sup>* el patrón de despolarización de las células anteriormente identificadas y la similitud estructural con las opsinas de invertebrados, ha hecho pensar que la melanopsina podría desencadenar una cascada de señalización como la que está descrita para los fotorreceptores invertebrados: una cascada del tipo fosfoinositídico (Niemeyer, Suzuki et al. 1996; Zuker 1996). En los invertebrados, la rodopsina activada actúa sobre una proteína G del tipo Gq. Se activa

entonces la fosfolipasa C ( $PLC\beta$ ), que hidroliza el fosfoinositoldifosfato ( $PIP_2$ ) (Panda, Provencio et al. 2003).

Dos genes codifican para melanopsina: Mel M y Mel X, ortólogos de mamíferos y xenopus respectivamente. Ambos se encuentran en todos los vertebrados no mamíferos, mientras que la Mel X se perdió en los mamíferos a lo largo de la evolución (Bellingham, Chaurasia et al. 2006). Se ha asumido que la melanopsina funciona como todas las otras opsinas, trabajando acoplada a una proteína G para desencadenar la cascada de señalización, pero no hay estudios sobre la identidad real de dicha proteína G.

El resultado final del desencadenamiento de esta cascada es la despolarización del fotorreceptor invertebrado, tal como se observa en los registros de las CGRif. En la actualidad se ha identificado a melanopsina en todos los grupos de vertebrados (Drivenes, Soviknes et al. 2003; Chaurasia, Rollag et al. 2005; Bellingham, Chaurasia et al. 2006; Frigato, Vallone et al. 2006). También se ha descrito la presencia de melanopsina en el *Amphioxus* (Koyanagi, Kubokawa et al. 2005), llamado el ancestro viviente de los cordados. A pesar de esta extensa ocurrencia, no son muchos los estudios publicados sobre la vía de transducción de la melanopsina. Muchos de los trabajos expuestos se han basado en sistemas de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus*, células HEK293 o células COS (Panda, Provencio et al. 2003; Kumbalasiri and Provencio 2005; Panda, Nayak et al. 2005; Qiu, Seiler et al. 2005; Kumbalasiri, Rollag et al. 2007). Es bien conocido que las vías de transducción son altamente promiscuas: los receptores foráneos implantados en las membranas de los modelos de expresión heteróloga pueden interactuar con una proteína G nativa, distinta a la proteína G que originalmente es el blanco de dicho receptor, obteniendo respuestas específicas que *in vivo* no se darían, por lo cual dicha aproximación podría conducir a conclusiones erróneas en cuanto a las características de la vía de transducción

nativa (Hankins, Peirson et al. 2008). Una característica interesante de la melanopsina, es que la melanopsina no sufre saturación ante estímulos lumínicos (Koyanagi, Kubokawa et al. 2005), al igual que en los invertebrados, donde, una vez convertido el 11-cis-retinal en todo-trans-retinal, la opsina y el cromóforo permanecen unidos de manera estable. Esto contrasta con la rodopsina en vertebrados, donde la foto-isomerización induce el desprendimiento del cromóforo de la opsina con lo que dicha molécula pierde la capacidad de absorber luz visible. Esta característica genera una ventaja adicional al modelo, ya que, al ser un fotorpigmento fotoestable, se puede trabajar con células aisladas sin necesidad de condiciones de oscuridad absoluta (mientras que en conos y bastones aislados, la ausencia del epitelio pigmentado impide la regeneración de las rodopsinas que hayan sido blanqueadas por la luz). Dicha fotoestabilidad de la melanopsina se ha estudiado en modelos de expresión heteróloga, donde se incuban oocitos de *Xenopus* que expresan melanopsina con 11-cis retinal o todo-transretinal y se obtienen corrientes de membrana provocadas por estimulación con luz en ambos casos, pero no cuando se omiten los retinales o se estimulan oocitos sin melanopsina (Panda, Nayak et al. 2005). Otros experimentos en los que se usan ratones con mutaciones que los privan de *Lrat* o *RPE65* (enzimas clave en el ciclo de regeneración de los retinales), y que conservan toda la sensibilidad del reflejo pupilar sugieren que la melanopsina utiliza un sistema de fotoisomerización de retinales independiente del ciclo visual que se conoce para la regeneración de cromóforos (Tu, Owens et al. 2006). El principal inconveniente en la investigación de la melanopsina es la baja cantidad de células ganglionares que la expresan (1% en mamíferos). Pocos son los trabajos que se han realizado sobre la vía de transducción de la melanopsina en células nativas aisladas, lo que ha hecho que el avance del conocimiento de este tema haya sido lento. Sin embargo en las aves, nuestro grupo fue

el primero en estudiar la cascada de fototransducción presente en las CGRs y el primero en caracterizar la naturaleza de estas células en vertebrados (Contin, Verra et al. 2006; Contin, Verra et al. 2010; Guido, Garbarino-Pico et al. 2010; Diaz, Morera et al. 2014)

### 3.6 Células Horizontales y Melanopsina

Las Células Horizontales (CHs) son interneuronas claves en la retina, median la interacción lateral en los circuitos retinales de retroalimentación negativa a los bastones y positiva a los conos (Thoreson and Mangel 2012).

El fotopigmento Melanopsina (*Opn4*) ha sido descrito como el responsable de la fotosensibilidad intrínseca de las (CGR) por este y otros grupos (Contin MA 2006; Contin, Verra et al. 2010). Ambos genes de *Opn4* se expresan en CGRs, sin embargo *Opn4x* se expresa en CHs y/o bipolares (Bellingham, Chaurasia et al. 2006) además su producto proteico se encuentra expresado en células de la capa nuclear interna y en los procesos que contactan dichas células con los fotorreceptores (Verra, Contin et al. 2011). Esta expresión se visualiza claramente en el pollo a partir de los estadios embrionarios E11-15 y hasta estadios postnatales (Verra, Contin et al. 2011) Figura 1. Es de destacar que siguiendo la determinación del destino celular, los precursores de CHs migran, se diferencian y adquieren la morfología y localización final en la capa nuclear interna entre los estadios E10-E15 (Poche and Reese 2009; Doh, Hao et al. 2010), Notablemente estos estadios coinciden con la expresión de OPN4X en células que colocalizan con el marcador de CHs Prox-1 (Verra, Contin et al. 2011) el cual a su vez solo aparece expresado en estas interneuronas (Belecky-Adams, Tomarev et al. 1997).

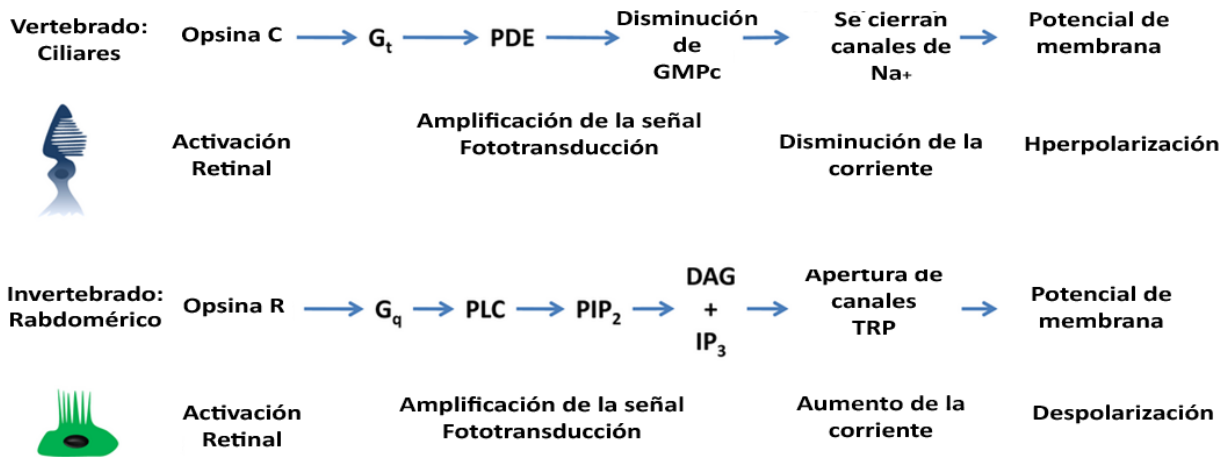
En base a los antecedentes descritos podemos hipotetizar que las CHs de la retina de pollo podrían ser también fotosensibles y colaborar a través de estas propiedades intrínsecas en

modular, en una escala de tiempo mayor, la inhibición lateral de los circuitos retinales, entre otras funciones.

Las CHs regulan la concentración presináptica de  $\text{Ca}^{+2}$  en los fotorreceptores, y también el mecanismo por el cual los fotorreceptores se adaptan a la luz ambiente. En la oscuridad, las CHs se despolarizan, como consecuencia de la liberación de glutamato por los fotorreceptores visuales, esto a su vez provoca la liberación de GABA por las CHs en las sinapsis de los conos que promueven una inhibición neuroquímica través de la activación de los receptores de GABA en las membranas fotorreceptoras, la liberación de protones o la señalización mediante el intercambio de iones con células adyacentes. Por el contrario, cuando la luz está encendida, conos y bastones se hiperpolarizan, detienen la liberación de glutamato y de este modo impiden la despolarización y la posterior respuesta de las CHs. Además de su función típica en los circuitos de la retina interna, en los vertebrados no mamíferos las CHs pueden conservar vestigios de antiguas células fotorreceptoras, tal como se demuestra claramente para CGRif (Berson, Dunn et al. 2002; Contin, Verra et al. 2006; Graham, Wong et al. 2008; Contin, Verra et al. 2010; Diaz, Morera et al. 2016). En teleósteos, se ha reportado que las CHs pueden responder intrínsecamente a la luz (Jenkins, Munoz et al. 2003; Cheng, Tsunenari et al. 2009). Estos últimos autores muestran que estas células expresan fotopigmentos no visuales tales como VAopsina u OPN4. OPN4 en la actualidad ha sido hallada en cerebro, iris, y células de la retina de la mayoría de los vertebrados examinados (Provencio, Rodriguez et al. 2000; Hattar, Liao et al. 2002; Chaurasia, Rollag et al. 2005; Bellingham, Chaurasia et al. 2006; Guido, Garbarino-Pico et al. 2010; Hughes, Jagannath et al. 2015; Diaz, Morera et al. 2016). A pesar de que en los mamíferos OPN4 se limita a un pequeño subconjunto de la CGR, las CGRif, que inervan el NSQ y otras áreas visuales y no visuales, en los vertebrados inferiores las células que

expresan melanopsina en la retina han divergido ampliamente de las de los mamíferos. Por ejemplo, en el renacuajo, melanopsina se expresa en las CHs en lugar de CGRs (Hughes, Jagannath et al. 2015). En la retina de pollo, la expresión del mRNA de OPN4 en CHs se informó por primera vez (Chaurasia, Rollag et al. 2005; Tomonari, Takagi et al. 2005) y de la expresión de la proteína Opn4x en estas células se describió más adelante (Verra, Contin et al. 2011). OPN4 está altamente conservada a través de la evolución y se encontró en amphioxus y erizos de mar, lo que demuestra que deuterostomados también tienen un gen OPN4. Esta distribución de múltiples melanopsinas (Opn4m y Opn4x) en diversos tipos de células de la retina, sugiere una función de una gran complejidad biológica en los vertebrados no mamíferos en comparación con la observada en los mamíferos. También hay pruebas de que la expresión de los RNAm de OPN4 está muy extendida en toda la retina y se puede encontrar en deuterostomados, incluyendo equinodermos, cefalocordados y vertebrados. La cascada de la fototransducción que opera en las CGRif OPN4 (+) claramente implica la participación de PLC como el efector de la proteína Gq, las variaciones en niveles de IP<sub>3</sub>, movilización de Ca<sup>+2</sup> y activación de canales TRP. El origen embriológico de estas células en la retina, la expresión de marcadores determinantes para la diferenciación neuronal, la presencia de ftopigmentos no visuales y la naturaleza bioquímica de la fotocascada sugieren fuertemente que ipCGRs y CHs probablemente deriven de un progenitor ancestral común (esquema 6). En esta tesis proporcionamos evidencia de que las CHs Opn4x positivas mantenidas en cultivo en presencia de retinaldehído, conforman un ftopigmento completamente activo, que responde intrínsecamente a la luz, con importantes y sostenidos incrementos en los niveles intracelulares de Ca<sup>+2</sup>. El Ca<sup>+2</sup> proviene principalmente de depósitos internos de IP<sub>3</sub> pero también, en parte, a partir del medio extracelular. En general, la cascada depende de la

proteína Gq y la activación de PLC y al final conduce a la liberación de GABA intracelular. Las CHs sensibles a la luz pueden proporcionar de este modo una regulación local más fina que la vía visual.

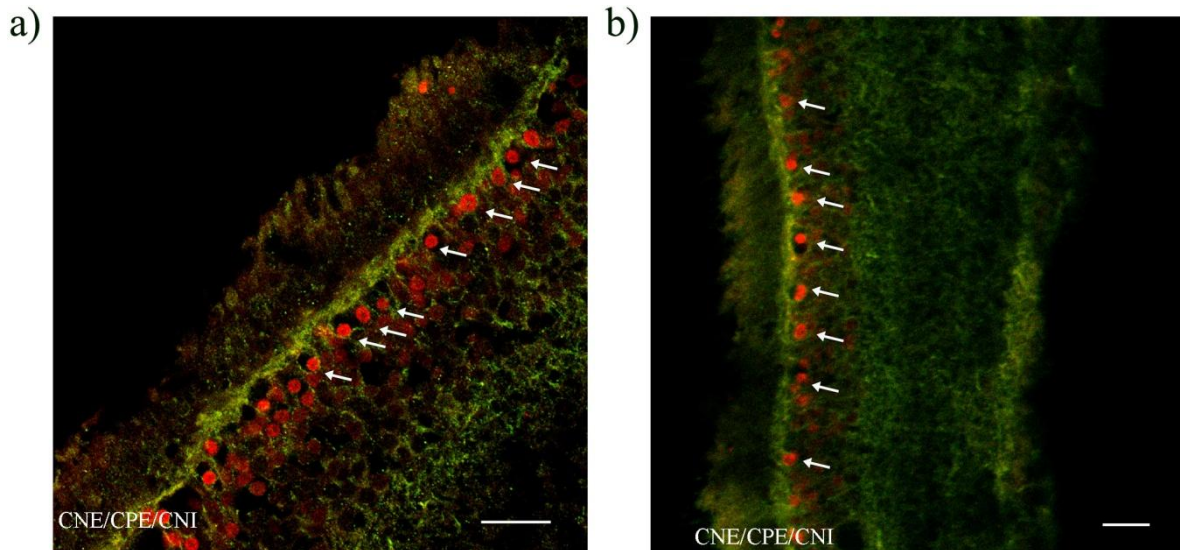


Esquema 6. Cascadas de fototransducción en el reino animal. Hay dos vías de fototransducción conocidas; en fotorreceptores ciliares vertebrados (A), la activación de la opsina desencadena la actividad de la proteína G (G<sub>t</sub>) que activa una fosfodiesterasa (PDE) que hidroliza GMPc. Por lo tanto, la disminución de cGMP cierra los canales de sodio dependientes de cGMP. La disminución de la corriente de cationes conduce a la hiperpolarización de la célula fotorreceptora. Por el contrario, en los fotorreceptores rabdoméricos (B), la vía implica una proteína G<sub>q</sub>. Esta proteína G activa una fosfolipasa C, que hidroliza fosfoinosítidos (PIP<sub>2</sub>) produciendo dos segundos mensajeros principales, diacilglicerol (DAG) e inositol - trifosfato (IP<sub>3</sub>). Estos mensajeros activan los canales TRP (canales de potencial transitorio, del inglés transient receptor potential channel) y aumentan la corriente iónica a través de la membrana, produciendo la despolarización de la célula.

En vista de estos antecedentes, los estudios aquí propuestos buscarán caracterizar las CHs de las aves como nuevos fotorreceptores retinianos y describir los componentes de la cascada de fototransducción que pudiera operar en las mismas. Estos estudios permitirán



caracterizar un posible nuevo FR no-visual de la retina interna de las aves y los mecanismos subyacentes que opera en el mismo, así como también su rol en la fisiología y conducta de los vertebrados



*Figura 1. Inmunocitoquímica de retina de pollo, estadio embrionario 15, en color rojo se observa el marcador Prox1, identificando células Horizontales, las cuales además expresan Opn4 X (verde). (Verra, Contin et al. 2011).*

En vista de los antecedentes hasta aquí expuestos, nos planteamos el siguiente objetivo general y objetivos específicos.

Objetivo General:

- Caracterizar a las Células Horizontales de pollo como posibles fotorreceptores no clásicos.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar un método de cultivo para células Horizontales de pollo.
- Caracterizar la expresión de marcadores de las mismas en cultivo.
- Confirmar la expresión de Melanopsina X en cultivo.
- Determinar la presencia de los distintos componentes de la posible cascada implicada en la fotorespuesta
- Determinar si las Células Horizontales responden a la luz, a través de estudios Imaging de  $\text{Ca}^{+2}$
- Testear diferentes inhibidores para determinar los componentes participantes en la cascada
- Realizar un knockdown de Opn4X para confirmar que es el fotopigmento implicado.
- Realizar un análisis de liberación de GABA, para definir si es un neurotransmisor implicado en la respuesta a la luz.

MATERIALES Y

METODOS

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Manejo de Animales**

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con el Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research of ARVO, aprobados por el comité local de cuidados de animales (School of Chemistry, Universidad Nacional de Córdoba; Exp.15-99-39796).

### **4.2 Cultivos primarios de células horizontales (CHs)**

Métodos: Se disgregaron retinas de embriones de pollo de E15 mediante un tratamiento con papaína y se cultivaron en medio Leivobitz modificado suplementado con suero fetal bovino al 10 %, ATB y B27, mediante estas condiciones de disgregado y cultivo se lograron una mejor adhesión de las células a la placa y una mayor diferenciación morfológica.

- El disgregado enzimático puede ser complementado con el disgregado mecánico, utilizando pipetas Pasteur.
- El tratamiento con DNasa evita la formación de agregados celulares por la liberación de ADN.
- La edad de los embriones es importante debido a que el grado de desarrollo de la retina es un factor muy influyente en lo que refiere a los marcadores expresados en las distintas neuronas, así como también, al desarrollo morfológico y posicional de las mismas.

Preparación del Gradiente:

El gradiente discontinuo de ASB se preparó en un tubo de 15 ml, agregando por separado las fases de ASB 1%, 2,5%, 3% y 4%, las fases fueron colocadas cuidadosamente para

evitar la mezcla. Con el fin de lograr una mejor resolución en el gradiente, se debe prestar especial atención a la velocidad de centrifugación, la concentración de las fases y la cantidad de tejido a ser separado. Estas 3 variables se ajustaron durante el curso de varios ensayos para lograr una óptima separación. Se centrifugó a 300 rpm, 4 ° C y durante 10 min.

- Se re suspendieron 5 retinas como máximo en 2 ml de CMF.

Aislamiento de las CHs:

Después de recuperar las células de cada fase del gradiente y cultivarlas por 4 días se realizó una inmunocitoquímica con marcación de núcleos con ioduro de propidio (IP) y con marcadores específicos de las CHs así como también para otros tipos neuronales de la retina. Encontramos que sólo la fracción correspondiente al 2,5% de ASB estaba altamente enriquecida en células Prox-1 positivas. Por otra parte, una alta proporción de estas células fueron además positivas para Islet-1.

- Los cubreobjetos tratados con polilisina/ laminina mejoran la adhesión celular.
- Cotejando el control de disgregado total de retina con las células halladas en la fase 2,5 % de ASB encontramos una gran eficacia de enriquecimiento, 30 % de células Prox-1 (+) en el control contra ( $\geq 75\%$ ) de células Prox-1 (+) en la fase 2,5 %.

CHs fueron purificadas de las retinas de pollo en el día embrionario 15 (E15) como se informó anteriormente. Brevemente, los ojos se diseccionaron de la cabeza y se diseccionaron en buffer (CMF-HBSS), a nivel de la ora serrata, se retiró el cuerpo vítreo y la retina se desprendió de la copa ocular agitando suavemente a fin de evitar el desprendimiento del epitelio pigmentario. La retina se cortó en piezas de 6-8 y se incubó

con CMF que contenía 3 U / ml de papaína durante 25 min a 37 ° C, y luego se mantuvo en hielo hasta su uso.

Con el fin de aislar las CHs, las células fueron disociadas del tejido de la retina por un procedimiento de trituración mecánica con una pipeta Pasteur. Después de la disociación, la suspensión de células se sometió a un gradiente discontinuo de albúmina de suero bovino (ASB) de concentraciones que van de 1 a 4%. Después de la disociación, las células se centrifugaron a 300 rpm durante 15 min y se recogieron diferentes fases y se cultivaron durante 4 días en L15 con el suplemento B27 en placas de múltiples pocillos pretratadas con 20 g / ml de polilisina y 5 g / ml de laminina seguido de incubación a 37 ° C (Life Technologies, Invitrogen, GIBCO, Carlsbad, CA; de dilución: 1/500 v / v) con el fin de permitir el crecimiento de neuritas y la diferenciación morfológica. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 37 °C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. Caracterización de las células recogidas se realizó por inmunotinción con diferentes marcadores de la retina de células de tipo CHs y otros. Los cultivos celulares fueron altamente enriquecido en CHs ( $\geq 75\%$ ) como se muestra anteriormente.

### **4.3 Inmunopurificación**

Posteriormente a haber sometido a las células al gradiente de ASB, la fase 2,5 % fue recuperada y se vertió en placas de Petri pretratadas con 2,5 mg / ml de proteína A seguido de incubación a 37 ° C durante 30 min con un anti-anticuerpo policlonal de pollo Opn4x (Bio-Synthesis Inc., Lewisville, TX, EE.UU.). Después de exhaustivos lavados, para eliminar las células que no se unieron a Opn4x, las células adheridas fueron desprendidas mediante un tratamiento con Tripsina y sembradas en placas de Petri previamente tratadas con 10 mg / ml de polilisina y 5 mg / ml de laminina. Finalmente se agregó medio L15

suplementado con B27 (Life Technologies, Invitrogen, GIBCO, Carlsbad, CA; de dilución: 1/50 v / v), forskolina de *Coleus forskohlii* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 4,25 mg / ml en DMSO) y BDNF humano recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN. 50 mg / ml). Se incubaron a 37 ° C bajo un flujo de aire constante CO<sub>2</sub>-5% en una atmósfera húmeda durante 4 días y caracterizaron con distintos marcadores específicos por inmunocitoquímica.

#### **4.4 Inmunocitoquímica**

Las células incubadas por 30 min en paraformaldehído 4 % en (PFA/PBS), los cubreobjetos fueron lavados con PBS y tratados con buffer de bloqueo (PBS suplementado con 0.1% ASB, 0.1% Tween 20, y 0.1% NaNO<sub>3</sub>). Luego fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente. Finalmente, luego de dos lavados con PBS, los cubreobjetos se incuban con anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 o goat anti-mouse IgG Alexa Fluor546 (anticuerpos monoclonales) (1:1000) por 1 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron analizados por microscopía confocal (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan).

#### **4.5 Western Blot (WB)**

Preparación de muestras.

Las muestras de retina, cultivos primarios o nervio óptico, se homogeneizaron en PBS conteniendo inhibidor de proteasas (1:1800 v/v), con homogeneizador de vidrio y baño con ultrasonido. Se centrifugó la muestra con refrigeración a 13000 xg durante 10 min. Se separó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles.

Cuantificación.

El contenido de proteínas presentes en las muestras se cuantificó por el método de Bradford (Bradford 1976), con el reactivo Bradford de Bio-Rad, (Cat. N° 500-0205). Se utilizaron concentraciones crecientes de ASB como estándares. Se cuantificó la absorbancia a 595 nm, y se relativizó a la absorbancia de la curva de estándares. Cada muestra se diluyó en buffer de siembra 4X.

#### Electroforesis y transferencia

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 10% o al 15% de densidad, de 1,5 mm de ancho, y de 10 ó 15 carriles, según los requerimientos de cada experimento. Se realizó la separación electroforética de 10 a 50 µg de proteína por carril. Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham), por 60 min a 350 mA.

#### Incubación con anticuerpos.

La membrana transferida se bloqueó por 1h a TA con buffer de bloqueo. Luego, se incubó en el anticuerpo primario, ON a 4°C con agitación, en buffer de incubación n°1. Se lavó 3 veces en buffer de lavado. Se incubó por 1 h a TA en anticuerpo secundario Odyssey (1:25000 v/v) diluido en buffer de incubación n° 2. Se lavó tres veces con buffer de lavado y 1 vez con PBS. La inmunoespecificidad de los anticuerpos se visualizó en el espectro infrarrojo del escáner LI-COR Odyssey.

#### **4.6 Aislamiento de ARN y RT-PCR**

Se extrajo ARN total de los cultivos de CHs siguiendo el método de Chomczynski and Sacchi y usando el reactivo TRIzol™ kit para la purificación de ARN. Se utilizaron 1-2



$\mu\text{g}$  del total de ARN extraído, y se trató con DNase (Promega) para eliminar ADN genómico contaminante. cDNA fue sintetizado utilizando M-MLV (Promega).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para RT-PCR de las secuencias de *Gallus gallus* fueron:

Name	Forward Sequence	Reverse Sequence	Size (pb)
Prox-1	CCAAATGTACTCCGCAAGC	TGCCACCATTTTTGTTCATGT	121
Islet-1	TATCCAAGGGATGACAGGAAC	GCTGTTGGGCGTATCTGGGAG	256
$\alpha$ Trans	AAGGACCTCAACTTCAGGATGT	CAGTCCTTGAGGTTCTCCTTG	479
Brn3	CCATCCTGCACGAGCCCAAGTA	GCCCCGTAGCAAGGTCTCATCAA	128
Gq	TCAAAACATCTTCACTGCCATG	TCAAAACATCTTCACTGCCATG	255
GAPDH	AGGCGAGATGGTGAAAGTCG	TCTTGCCCATTTGATGTTGCT	268
OPNX	TGCTTTGTCAACAGCTTGCACAGAG	CAGCAATAATCTGTATGGTGCGCTTC	199

Para las reacciones de PCR se realizó una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C seguido por 36 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg, el annealing se realizó a 60 °C por 30 seg y la extensión a 72 °C. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa por electroforesis y visualizados mediante el marcado con bromuro de etidio.

#### 4.7 Transfección

Una secuencia de ADN para suprimir la síntesis de Opn4x fue diseñada utilizando algoritmos de diferentes páginas <http://www.rnaiweb.com>, [http://sirna.wi.mit.edu/show\\_oligo.cgi](http://sirna.wi.mit.edu/show_oligo.cgi) (CTAAAGCCTCTGCAATCTA). Una secuencia de ADN scramble (ACTCCATACTCGACACCTA) fue creada usando el siRNAWizard™, InvivoGen. Los ADNc que codifican shRNAs se insertaron en un vector pSuper.neodiscistrionic + GFP (pSuperRNAi Sistema-OligoEngine) bajo el control del promotor de la polimerasa H1 ARNIII, y el marcador GFP transfección bajo el control del promotor PGK. Los plásmidos resultantes se conocen como Opn4x shRNA y RNA scramble (ssRNA). Los plásmidos se mezclaron con Lipofectamine 2000 y se añaden a las neuronas 12 h después de la siembra.

#### 4.8 Determinación de movilización de $\text{Ca}^{+2}$ .

Se incubaron células dissociadas con la sonda reportera de  $\text{Ca}^{+2}$  Fluo-4 AM 5 $\mu\text{M}$ , en DMSO 0,5 % y Plurónico F127 0,05%, por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se observó con un microscopio de epifluorescencia (Nikon), con un filtro de excitación de 496 nm y un filtro de emisión de 520 nm. Estas mediciones ópticas de un proceso que es intrínsecamente foto-sensible son posibles debido a que existe una latencia considerable entre la emisión instantánea por parte del fluoróforo al prender el haz de epi-iluminación, y toda respuesta fisiológica (como la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ ); esto proporciona una ventana temporal de 'línea de base' con respecto a la cual se determinan los cambios de fluorescencia  $\text{Ca}^{+2}$ -dependientes (Gómez & Nasi, 1999). Los cambios en la fluorescencia, que corresponden a cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$ , se midieron comparando los niveles de gris que tome cada pixel en la región de interés de la imagen (0-

255, para una imagen de 8 bits), entre la imagen inicial o de línea de base y los cuadros subsiguientes (Image J, NIH).

#### **4.9 Análisis de retinoides**

Los cultivos primarios se homogeneizaron en buffer de fosfato que contiene hidroxilamina 200 mM. Se añadió un ml de etanol, y los retinoides se extrajeron dos veces con 3 ml de hexano como se describe por Díaz col 2016b. Las muestras se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min. Se recogieron las fases orgánicas, se secaron bajo una corriente de gas argón, y re-disolvió en 200 ml de hexano. soluciones de hexano fueron analizados por cromatografía en fase normal líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando (0,5% de dioxano para retinaldehído-oxima, todo-trans-retinol y 0,1% de todo-trans-retinilpalmitato) en hexano a una velocidad de flujo de 1,5 ml / min en una columna de sílice (Agilent-RxZorbax- Sil 5 m, 150 x 4,6 mm; retinaldehído-oxima y todo-trans-ROL / Zorbax-Sil 5 m, 250 x 4,6 mm; todo-trans-retinilpalmitato) en un modelo Agilent 1260 cromatógrafo de líquidos equipado con un detector de fotodiodos-array (Agilent Technologies, Wilmington, dE). La identidad de cada retinoide (incluyendo el sin- y anti-oximas de cada retinaldehido) se confirmó por análisis espectral en línea y co-elución con estándares auténticos retinoides.

##### **4.9.1 Liberación de [3H] GABA**

Cultivos primarios de CHs se incubaron durante 30 min a 37 ° C con [ 3H ] GABA ( 0,5-1 Ci ) en 500 ml de buffer que contiene 140 mMNaCl , 5 mMKCl , CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM , 10 mMHepes , y glucosa 10 mM , se ajustó a pH 7,4 con Tris base . Los cultivos primarios se lavaron varias veces en buffer con el fin de eliminar el exceso de [3H] GABA,

y se expusieron durante a un estímulo de luz de 1000 lux, durante 30 min. Después de esto, se recuperó el sobrenadante y se determinó la radiactividad en el medio en un contador de centelleo.

Anticuerpo	Huésped	Especificidad	Compañía	Dilución	Referencias
Opn4x	Conejo (P)	Opn4x (3 isoformas) pollo	Donado por A.M. Castrucci	WB: 1:1000 IQ: 1:3000	(Lima, M. et al. 2006) (Contin, Verra et al. 2006)
Opn4m	Rata (P)	Opn4m (2 isoformas) pollo	Byosinthesys- TX, USA	WB: 1:1000 IQ: 1:300	(Contin, Verra et al. 2010)
Rho4D2	Ratón (M)	Rodopsina y opsina verde	Donado por D. Hicks	IQ:1:1000	(Hicks and Molday 1986); (Xie and Adler 2000).
Thy-1	Conejo (P)	Thy-1 CGR	Byosinthesis TX, USA	IQ: 1:3000	(Brocco and Panzetta 1999);(Contin, Verra et al. 2006)
DM1A	Ratón (M)	a-tubulina	Sigma Aldrich	WB: 1:2000 IQ: 1:1000	(Blose, Meltzer et al. 1984)
Prox-1	Conejo (P)	Prox-1		IQ:1:2000	(Edqvist, Lek et al. 2008)
Neu N	Ratón (M)	Núcleos Neuronales	Millipore	IQ: 1:100	(Wolf, Buslei et al. 1996)
115A10	Ratón (M)	Células bipolares ON	Donado por D. Hicks	IQ: 1:100	(Euler and Wassle 1995)

*Anticuerpos primarios utilizados durante el desarrollo de esta tesis.*

## Soluciones utilizadas

- **PBS:** 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O destilada csp 800 ml.
- **CMF:** NaCl 0,8 p/v; KCl 0,03p/v; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,005 p/v; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0025 p/v; NaCHO<sub>3</sub> 0,1 p/v, glucosa 0,45 p/v)
- **Buffer Super D** (usado en inmunocito e histo química): albumina bovina (ASB) 0,5% p/v; TWEEN 20 0,1 % v/v, Glicina 1% p/v; azida 0,2% p/v en PBS
- **Buffer de bloqueo II** (usado en inmunohistoquímica): ASB 3% p/v; suero de caballo 2% v/v; tritón x-100 0,05% v/v; azida 0,2% p/v en PBS.
- **Buffer aviar** (usado en HPLC): NaCl 0,8 p/v; KCl 0,02 p/v; MgCl<sub>2</sub> 0,005 p/v; CaCl<sub>2</sub> 0,02 p/v; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,033 p/v; NaCHO<sub>3</sub> 0,1 p/v; glucosa 0,1 p/v).
- **Buffer de siembra** (usado en WB): Glicerol 4:10 v/v; Mercaptoetanol 2:10 v/v; Buffer Tris-CHI 0,05 M pH6, 8, 5:10 v/v; SDS 8% p/v; azul de bromofenol 0,02% p/v.
- **Buffer de incubación N 1** (usado en WB): leche descremada 2,5% p/v; TWEEN 20 0,1-0,2% v/v en PBS.
- **Buffer de bloqueo** (usado en WB): leche descremada 5% p/v en PBS.
- **Buffer de lavado** (usado en WB): TWEEN 0,1% v/v en PBS.
- **Buffer de incubación N 2** (usado en WB):leche descremada 2,5% p/v; TWEEN 20 0,1-0,2% v/v; SDS al 0,01% v/v en PBS)
- **Solución EM formaldehido** (usado en HPLC): formaldehído 37% v/v; metanol 15% v/v; agua 48 % v/v.

# RESULTADOS

## 5. Resultados

### 5.1 Obtención y caracterización de cultivos primarios de Células Horizontales

En base a la evidencia experimental encontrada por este grupo, proponemos a las CHs de la retina de pollo como fotorreceptores no clásicos, que podrían colaborar a través de estas propiedades intrínsecas en modular, en una escala de tiempo mayor, la inhibición lateral de los circuitos retinales. Con el propósito de investigar tal potencial capacidad fotorreceptiva, en una 1era etapa procedimos a obtener cultivos primarios altamente enriquecidos en CHs. Para esto desarrollamos un método de purificación de células retinales disgregadas provenientes de embriones de pollo de 15 días (E15), mediante un gradiente discontinuo de albumina sérica bovina (ASB) y posterior cultivo. Esta técnica fue desarrollada y puesta a punto en el laboratorio, teniendo en cuenta la importancia de contar con un cultivo primario de éstas células, altamente enriquecido para su posterior caracterización (Adler 2000).

Se disgregaron retinas de pollos embrionarios E15, este disgregado fue sometido al gradiente de ASB que comprendió fases con una concentración de 1 a 4 % (a saber 1%, 2%, 2.5%, 3%, 4%). Las células recuperadas de las distintas fases fueron cultivadas y caracterizadas por inmunquímica y por morfología. Los resultados obtenidos, demuestran que los cultivos primarios obtenidos a partir de la fase 2,5% son altamente enriquecidos en CHs de acuerdo a distintos marcadores específicos utilizados (Prox1, islet-1, calretinina, calbindina, GABA, etc.) y presentan la morfología típica de estas células (Morera, Diaz et al. 2012) (Fig. 2). Los cultivos también fueron analizados por Western Blot (Fig. 3). Además de los marcadores antes nombrados, analizamos las distintas fases del gradiente para neurofilamento 200 KDa (NF200), un marcador específico de procesos de células ganglionares (CGRs), además encontramos una marcada expresión de este marcador en

procesos de células cultivadas a partir de la fase 3%, y una expresión muy baja en la fase 2,5 %, estos resultados sugieren que la presencia de RGCs en la fase 2,5% sería mínima o nula (Fig. 3).

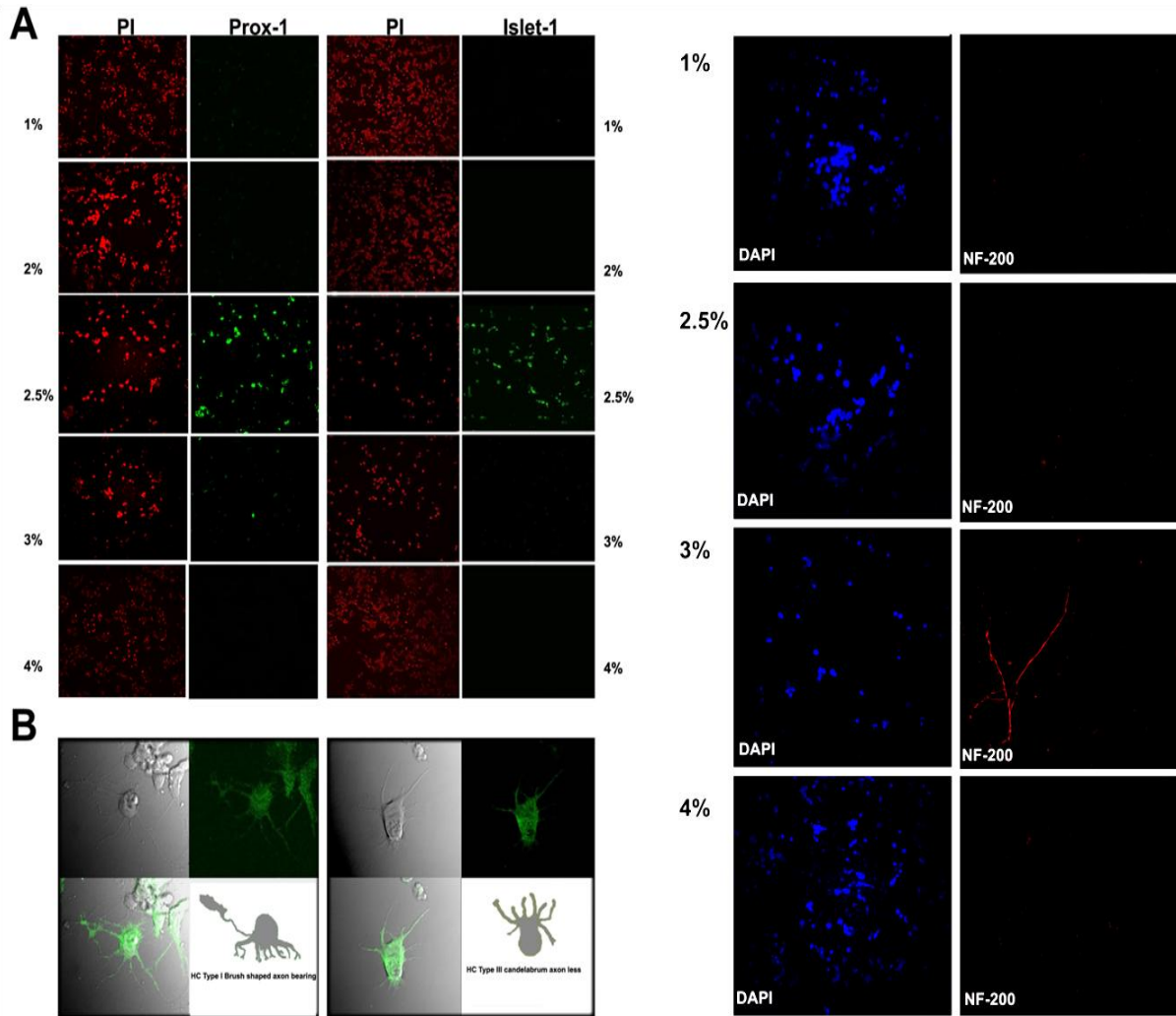
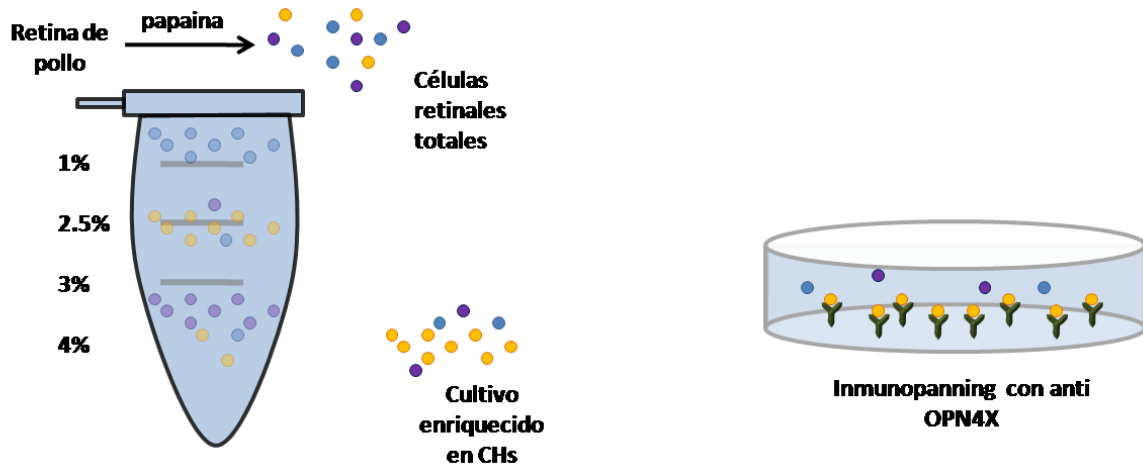


Figura 2. Caracterización inmunocitoquímica de cultivos primarios de células de la retina embrionaria obtenidos a partir de las diferentes fases del gradiente discontinuo de ASB. Inmunocitoquímica para Prox-1 (panel izquierdo) e Islet-1 (panel derecho). La tinción de núcleos por Ioduro de propidio se observa en rojo. B. Zoom de células individuales Prox1 (+) que muestran una morfología típica H1 "con forma de cepillo" o H3 "con forma de candelabro". Inmunocitoquímica para NF-200 en cultivos primarios de células de la retina

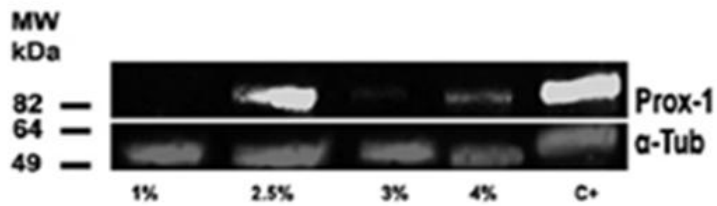


embrionarias obtenidas a partir de las distintas fases del gradiente. Tinción nuclear con DAPI (azul) se muestra en los paneles de la izquierda e inmunorreactividad asociada a NF-200 (rojo).

**A**



**B**



**C**

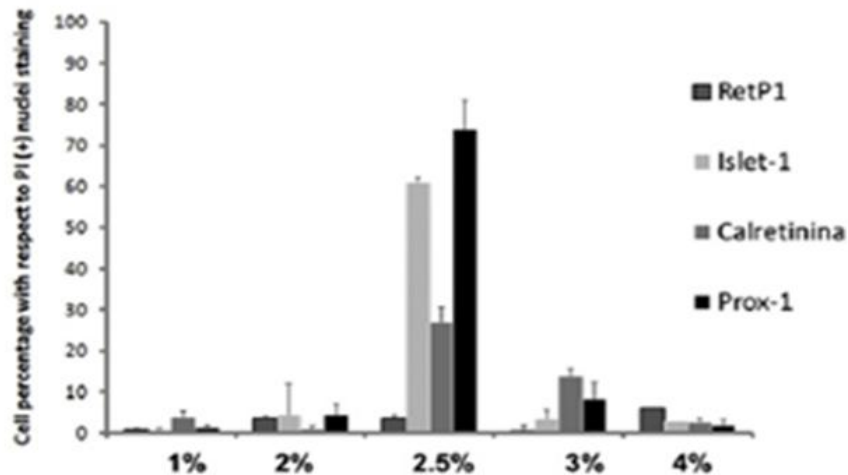
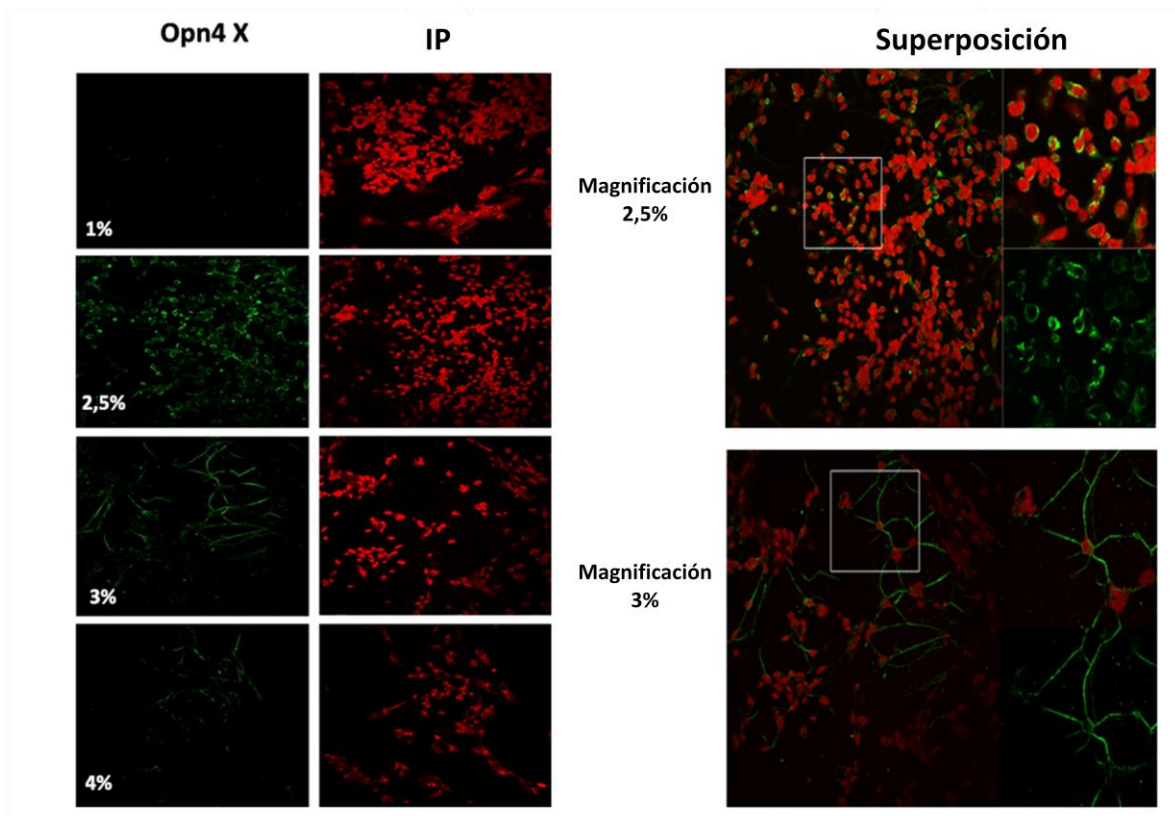


Figura 3. A. Esquema del gradiente de ASB al cual es sometido el disgregado de células retinales. B. Western Blot para Prox-1 de las distintas fases del gradiente. C. Gráfico mostrando los porcentajes de expresión de distintos marcadores en las distintas fases del gradiente de ASB.

El paso siguiente fue estudiar la expresión de la proteína OPN4X en los cultivos primarios de células obtenidos de la fase 2.5 % e investigar si otras fases también presentan marcación para esta opsinina. Los resultados obtenidos indican que la fluorescencia asociada a OPN4X en las fases del gradiente se concentran principalmente en la de 2.5% y en la de 3%. Estos experimentos confirman los resultados anteriores, demostrando que, en la fase 2,5 % se encuentra un alto porcentaje de CHs OPN4x positivas, mientras que en la fase 3% encontramos CGR's (Fig. 4).



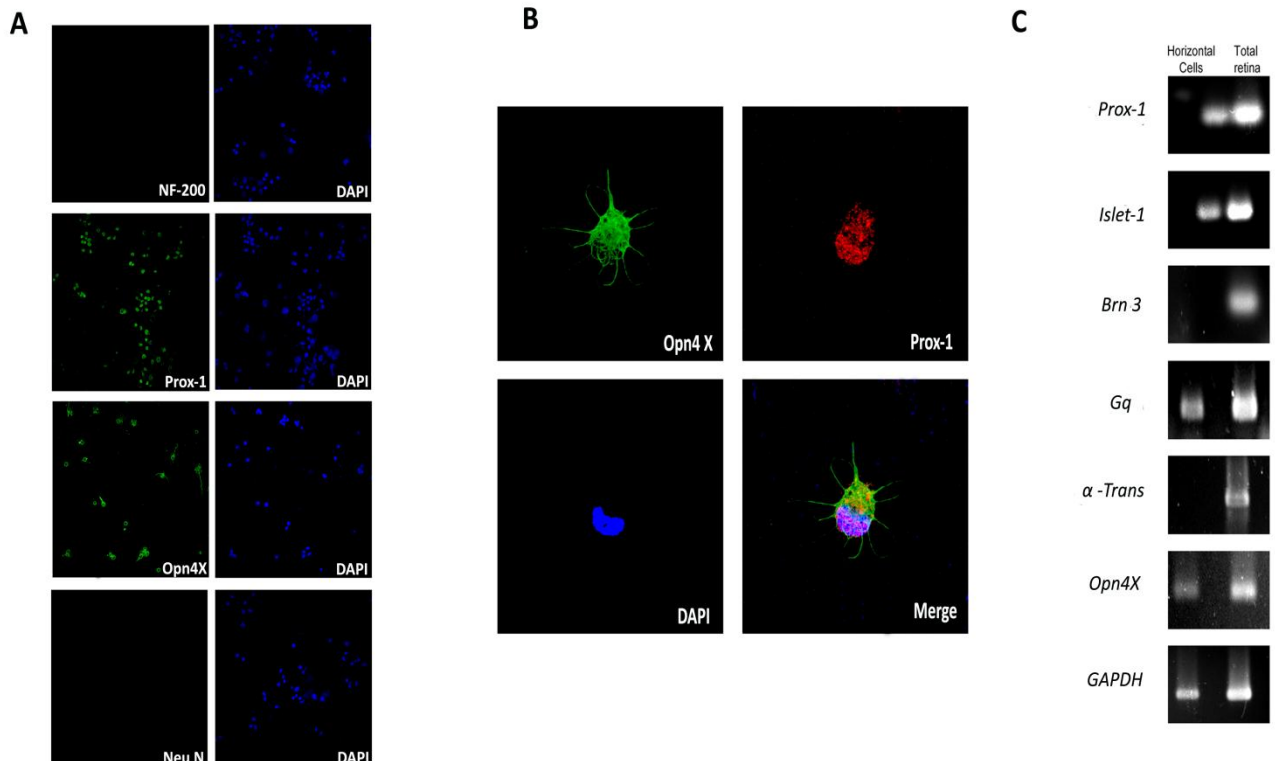
*Figura 4. Caracterización Inmunoquímica de cultivos primarios de células embrionarias de la retina obtenidos de las diferentes fases de un gradiente discontinuo (1-4 %) de ASB. Izquierda: Los cultivos de células a partir de las diferentes fases (2,5, 3, 4 %) muestran inmunoreactividad positiva para melanopsina X (Opn4x, verde) en somas y los procesos. Los núcleos de las células teñidas con yoduro de propidio (PI, rojo) Panel derecho : Ampliación de microfotografías de los cultivos de células de la retina fases del gradiente 2,5 y 3 % de ASB que muestra la colocalización Opn4x (verde) en somas y procesos de células y PI (rojo)*

Se realizaron controles con el fin de demostrar el porcentaje de enriquecimiento de CHs logrado a través del gradiente discontinuo, para ello se realizó inmunocitoquímica de un disgregado de retina total y de un cultivo de las células de la fase 2,5 %, ambos marcados para Prox-1, (Fig. 5), se observó aproximadamente un 30 % de marca positiva para Prox-1 en el disgregado de retina total, contra un 80% de marca Prox-1 (+) en las células de la fase 2,5 %. Similares resultados fueron confirmados por citometría de flujo.



Figura 5. Inmunocitoquímica de la fase 2,5% del gradiente. B. Cuantificación de células *Prox-1* positivas en la fase 2,5 % del gradiente y de disgregado de retina total. C. Citometría de flujo de células *Prox-1* positivas en la fase 2,5 % del gradiente y de disgregado de retina total, mostrando un enriquecimiento aproximado del 85% en al fase 2,5% con respecto al disgregado inicial.

En una 2da etapa procedimos a inmunopurificar las células de la fase de 2.5% con el anticuerpo para *Opn4 X*, a fin de obtener cultivos de CHs que solo expresan este fotopigmento y así realizar estudios funcionales sobre estas células. Estos cultivos primarios fueron caracterizados tanto por inmunocitoquímica, por RT-PCR (Fig. 6), y por HPLC (fig. 9).



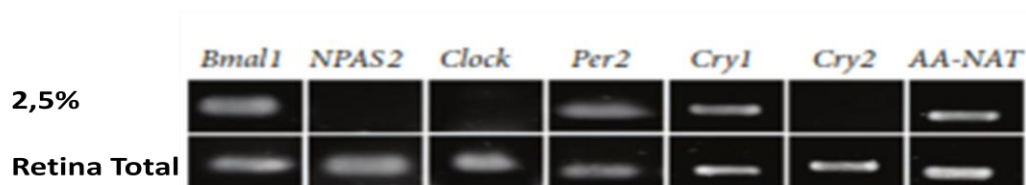


Figura 6. Inmunotinción de cultivos primarios de células de la retina de pollo, del estadio embrionario 15, purificadas a través de un gradiente de ASB (albúmina sérica bovina) y posterior inmunopanning. A: tinción DAPI de los núcleos celulares (azul, panel derecho) inmunocitoquímica positiva (verde, panel izquierdo) para *Prox-1*, un marcador específico para las CHs, marcación positiva para *Opn4x*, en la mayoría de las células en cultivo, mientras que no se observó inmunorreactividad positiva para *NeuN*, marcador neuronal de la CGR ni para *NF-200*, que denotan neurofilamentos. B: Merge DAPI, *Prox-1* y *Opn4x*. C RT-PCR en cultivos primarios de CHs o retina total como control. Panel inferior RT-PCR a partir de cultivos primarios de CHs demostrando la presencia de genes reloj.

Los cultivos inmunopurificados a partir de la fase 2,5 % del gradiente de ASB, resultaron ser altamente enriquecidos en CHs que expresan *Opn4 X*, no se encontró por inmunocitoquímica marca positiva para los marcadores de Células ganglionares, *NF200* o *NeuN*. Además por RT-PCR demostramos la presencia del mensajero de *Gq*, subunidad de la proteína *G* heterotrímica que activa a fosfolipasa *C* (*PLC*) y podría estar participando de la cascada de fototransducción. En otra serie de estudios se caracterizó la presencia de *Opn4X* en cultivos primarios de CHs y de componentes del reloj molecular, además de la enzima clave en la síntesis de melatonina, N-acetil serotonina transferasa (*NAT*): se encontró que estos cultivos expresan el mensajero de *Opn4X* y de los genes reloj *Bmal*, *Per2* y *Cry1*. Así como también de la enzima *NAT* (figura 6).

## 5.2 Capacidad fotorreceptora de las Células Horizontales.

Hasta aquí desarrollamos una nueva técnica para obtener cultivos primarios enriquecidos en CHs, caracterizamos los cultivos obtenidos a partir de distintas técnicas y realizamos los controles correspondientes.

Considerando la marcada expresión del fotorpigmento no visual Opn4X en las CHs de retina de pollo, y la identificación de CHs fotosensibles en la retina de teleósteos, investigamos la posible respuesta a la luz de estas células en cultivos primarios.

Para ello utilizamos el fluoróforo de  $\text{Ca}^{+2}$ , *Fluo4 AM*. Esta sonda presenta un máximo de excitación a 494 nm y exhibe un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia al unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  emitiendo a 506 nm.

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas de trabajo procedimos a investigar el efecto de pulsos de luz blanca brillante de intensidades en el rango de 1000 lux de corta duración (5, 30, 50 seg.) sobre los niveles basales de  $\text{Ca}^{+2}$  (control sin estímulo) en una ventana de tiempo de varios minutos.

Los primeros estudios realizados en cultivos primarios de retina total, muestran tres situaciones distintas en respuesta al estímulo lumínico: células que se despolarizan en respuesta a la luz (incrementos en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ ), algunas células que se hiperpolarizan en respuesta al estímulo lumínico (disminuyen los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ ), y un tercer grupo que no presenta ningún tipo de respuesta (Fig. 7). Estos resultados son esperables de acuerdo a los distintos tipos neuronales presentes en la retina.

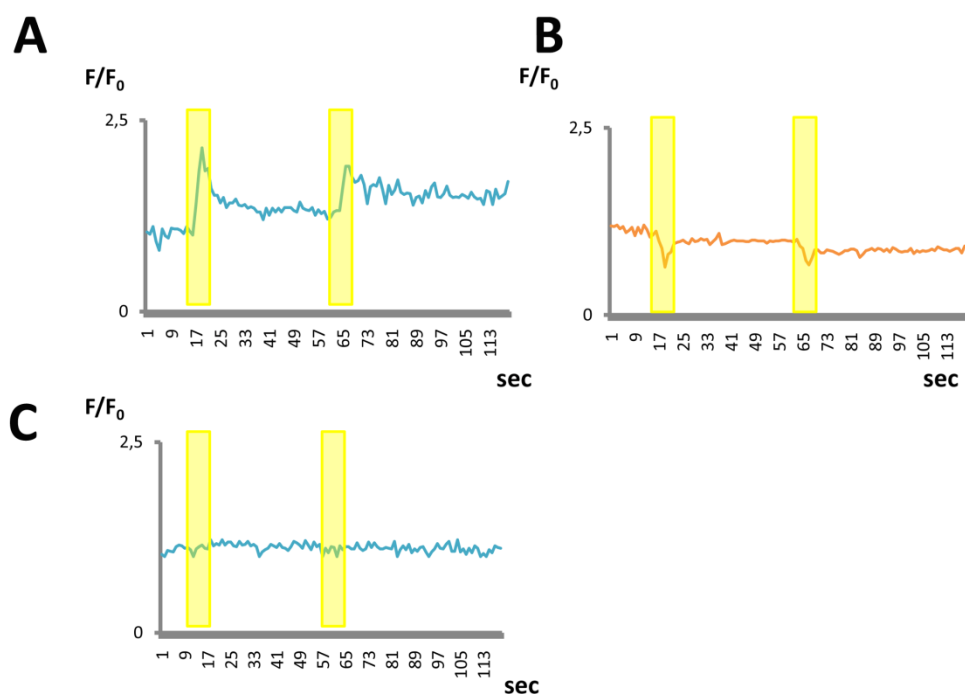


Figura 7. Estímulos de 1000 lux durante 5 seg a cultivos primarios de retina total disgregada de pollo, incubados previamente con Fluo 4AM, se observan diferentes tipos de respuesta a la luz.

### Respuesta a la luz en cultivos primarios de CHs

Los cultivos primarios de CHs fueron testeados en condiciones basales (oscuridad) o expuestos a un pulso de luz blanca de 1000 lux durante 5, 20 y 50 seg. Observamos incrementos significativos en la fluorescencia luego del estímulo lumínico respecto a controles en oscuridad (Fig. 8). Distintas escalas temporales de estimulación fueron analizadas, observando que los aumentos en Ca<sup>+2</sup> intracelular en respuesta a la luz fueron dependientes del tiempo de estimulación lumínica. Además se realizaron experimentos en los cuales los cultivos de CHs fueron expuestos a dos estímulos lumínicos de igual intensidad, espaciados por 5 min aproximadamente, observándose respuestas inmediatamente después de 2 estímulos en serie, mostrando la capacidad de estas células de



responder a estímulos reiterados. Estos resultados comprenden, en su conjunto, la primera evidencia de fotosensibilidad intrínseca de CHs en la retina de pollos. De aquí en más, nos propusimos determinar que componentes forman parte de la cascada implicada en esta respuesta, y determinar si efectivamente la opsina que media dicha fotosensibilidad es, efectivamente, Melanopsina.

Estudiamos la respuesta a la luz de estas interneuronas, con y sin el agregado exógeno de retinaldehído, Fig.9, observamos que la respuesta a la luz se vio significativamente afectada en las condiciones experimentales en las que no se agregó el cromóforo. Además, determinamos en condiciones basales, la presencia de retinales endógenos mediante HPLC. Se comprobó que ambos estereoisómeros de *all-trans* retinal, *syn* y *anti* se encuentran presentes en los cultivos primarios de CHs.

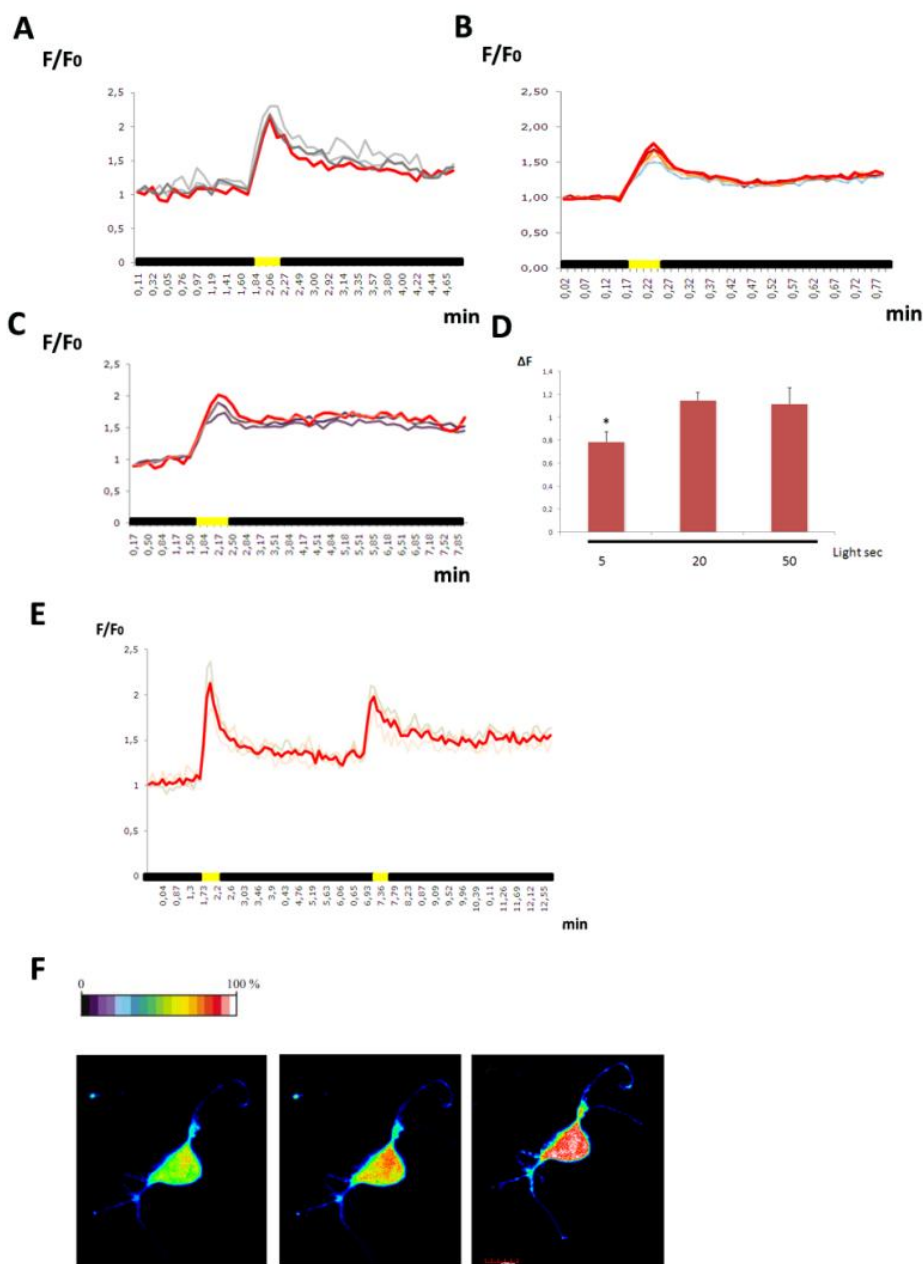


Figura 8. Cambios en respuesta a la luz en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  + medidos por microscopía fluorescente, con el reactivo Fluo-04 AM en cultivos primarios de CHs. F: Cultivos de CHs fueron incubados con Fluo 4AM y luego expuestos a diferentes tiempos de iluminación, luz 1000 lux. En los gráficos se observa una curva roja correspondiente al promedio de las respuestas. Las células fueron expuestas durante 5 (A), 20 (B) o 50 segundos (C) a 1000 Lux de luz blanca, como se describe en Métodos, o por dos breves pulsos de luz blanca de 1000lux for 20 sec (F).

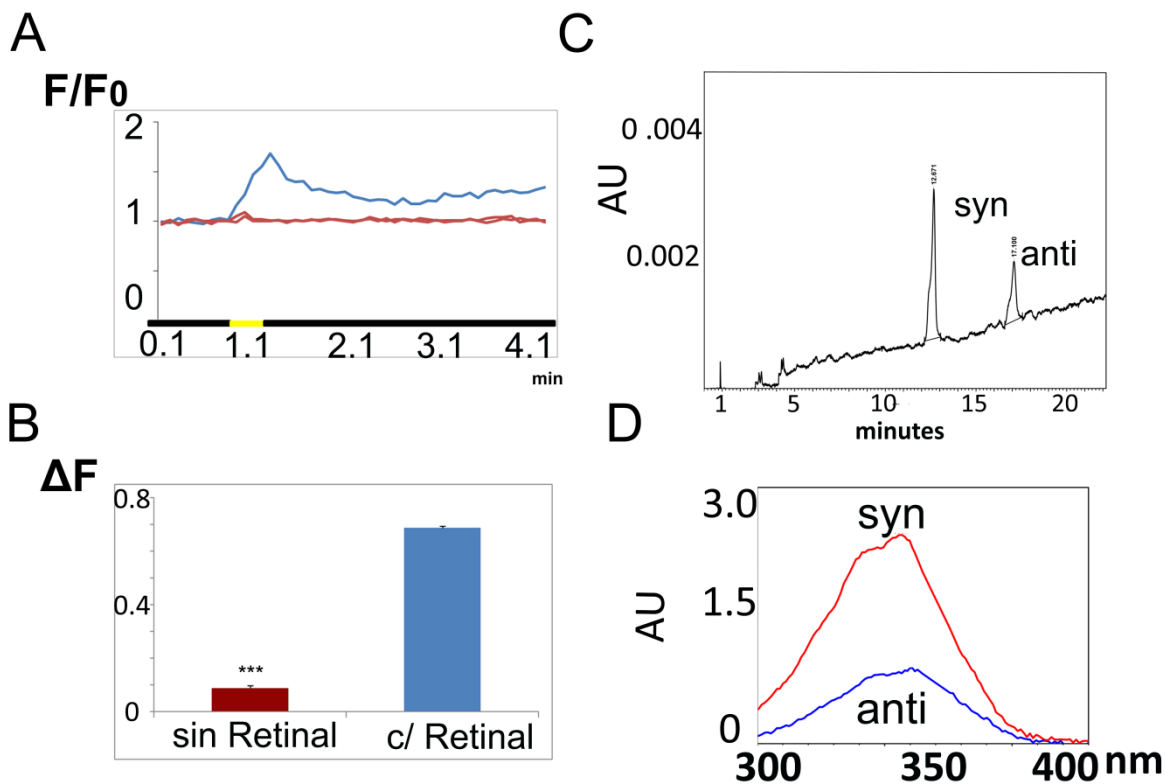


Figura 9. Aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  medidos por Fluo-4 AM mediante microscopía en cultivos de CHs con (B) o sin (A) la adición exógena de *all-trans* retinal. A. Respuesta a la exposición a la luz, durante 10 seg de CHs (marca amarilla) sin retinal exógeno, comparado con un control positivo (B), en el cual los cultivos fueron incubados con el agregado de *all trans* retinal (0,6 M), previo estímulo lumínico. Medición de la presencia de retinales endógenos en cultivos primarios de CHs, mediante HPLC (C), ambos estereoisómeros *all-trans* retinal, *syn* (con máxima absorbancia a 357nm) y *anti* (con absorbancia máxima a 361 nm) en el espectro de UV (D). E. Representación gráfica de los niveles relativos de fluorescencia s en cultivos de CHs con o sin *all-trans* retinal (0,6 M). Los datos son la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

Una vez demostrado que las CHs responden a la luz, nos propusimos caracterizar la cascada implicada en esta novedosa respuesta. Dada la similitud en su origen embrionario y evolutivo, de las CHs con las CGRif, hipotetizamos que la fotocascada descrita para las CGRif de pollo podría estar teniendo lugar también en CHs y que posiblemente involucraría Gq y activación de PLC. Para ello utilizamos los siguientes inhibidores:

U73122 un conocido inhibidor de la PLC, hidroxilamina utilizada para extraer retinales, provoca el *bleaching* de Melanopsina a altas concentraciones, suramina inhibidor de la proteína Gq, 2-APB un bloqueante de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de  $\text{IP}_3$  y EGTA un agente quelante de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, Fig. 10. La utilización de los diferentes inhibidores farmacológicos nos permitió proponer posibles participantes en la cascada de respuesta a la luz, en CHs.

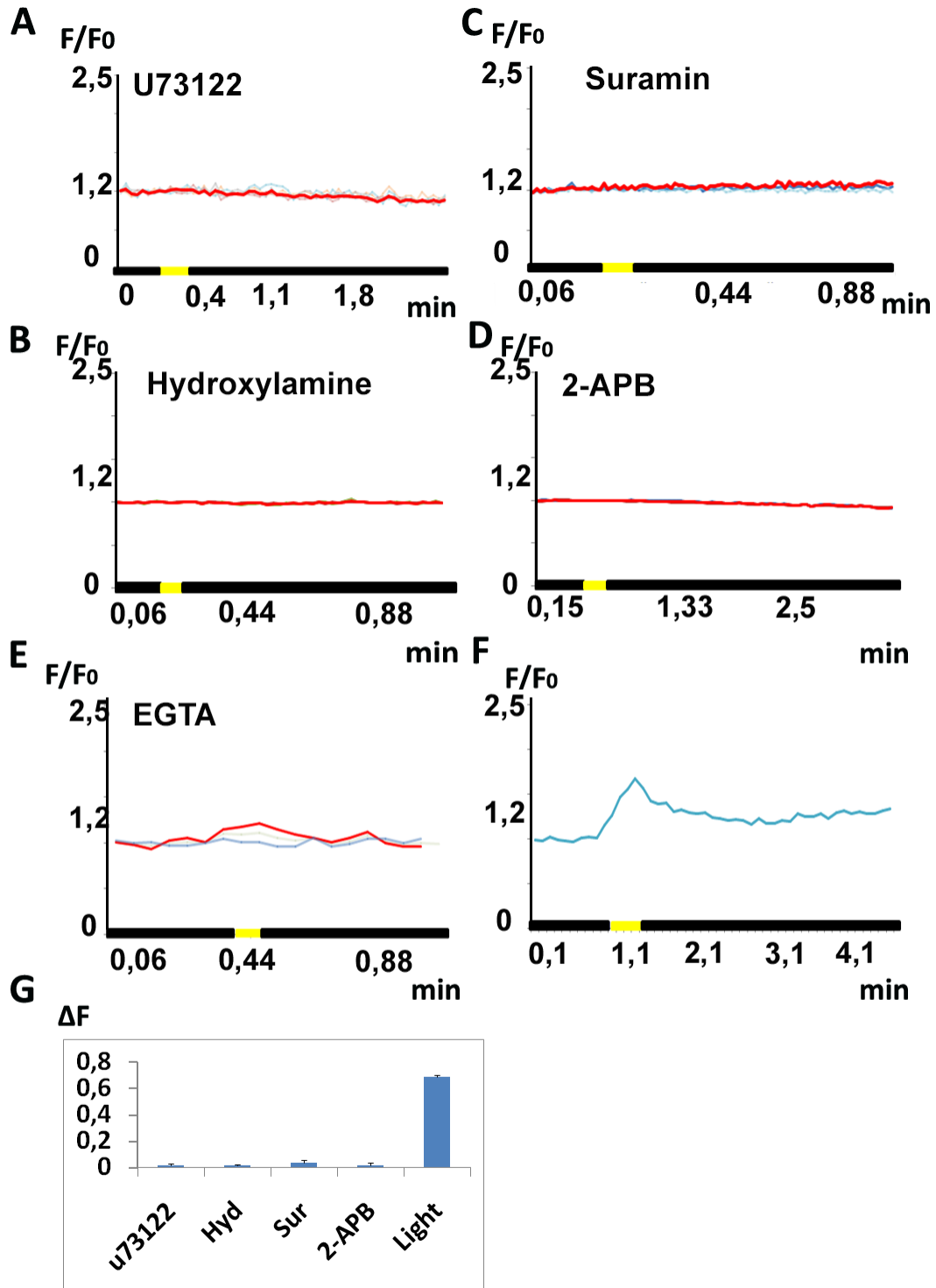


Figura 10. Estudio del efecto de diferentes inhibidores de la cascada de fotorespuesta mediante imaging de  $Ca^{+2}$ , en cultivos primarios de CHs. Cambios significativos inducidos por la luz ( $F/F_0$ ) en niveles

*intracelulares de Ca<sup>2+</sup> + visualizados en cultivos CHs tratados con el vehículo (control ) (F) se vieron afectados drásticamente en cultivos celulares tratados con U73122 ( 5 uM ) , un conocido inhibidor de PLC (A), o hidroxilamina ( 30 mM (B), suramina ( 100uM ), inhibidor de la proteína Gq (C), 2 -APB ( 100uM ) , bloqueador de la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por IP<sub>3</sub> ( D ), o con 1 mM EGTA , un agente quelante. G. Representación gráfica de la fluorescencia relativa calculado como se indica en Métodos, después de un breve pulso de luz blanca de 1.000 lux durante 5 segundos en cultivos de células tratadas con los diferentes inhibidores. Controles tratados con vehículo. Los datos son la media ± SEM (n = 20 de 3 experimentos independientes); \*\*\*: P < 0,001*

### **Estudios dirigidos a caracterizar el rol de Opn4X en la fotosensibilidad de CHs**

Como siguiente objetivo, nos propusimos realizar estudios de knockdown Opn4X, para así demostrar fehacientemente, que esta Melanopsina es el fotopigmento que le confiere fotosensibilidad intrínseca a las CHs. Para ello diseñamos shRNA contra Opn4 X. Los cultivos fueron transfectados con shRNA o scramble (control) según corresponda, cultivados por 24hs, y analizados por inmunocitoquímica para analizar la baja en la expresión. Como muestra la Fig 11 Observamos que el shRNA contra Opn4 X, afecta efectivamente su expresión, tanto a nivel de mensajero como a nivel de proteína, y que esta baja en el fotopigmento, afecta notablemente la respuesta a la luz de estas células

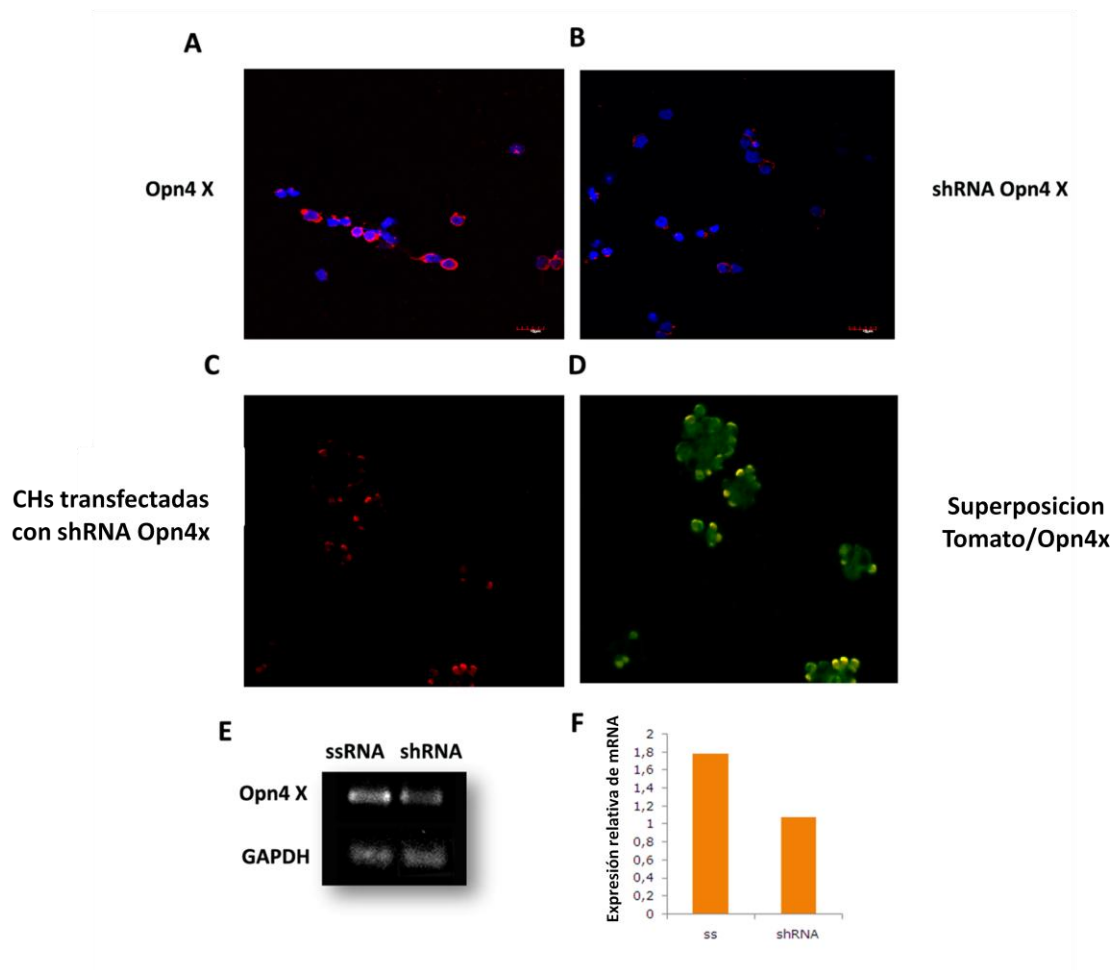
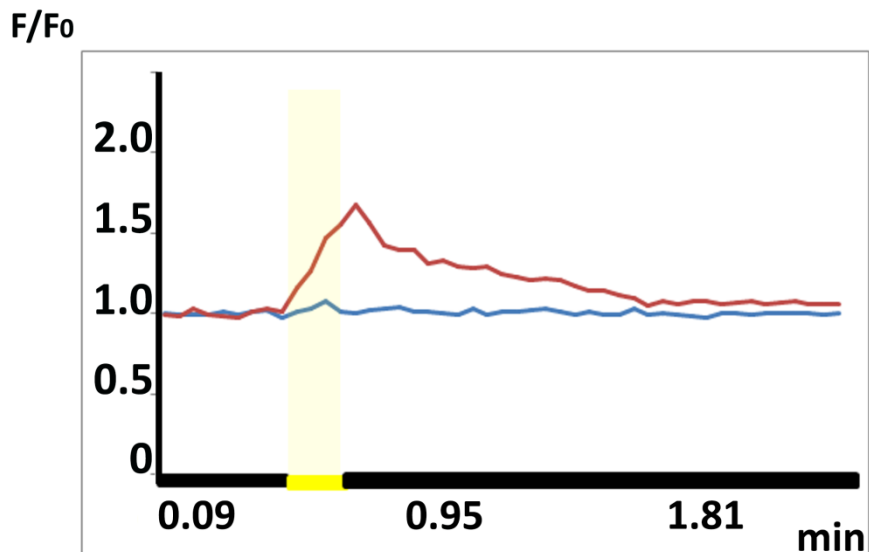


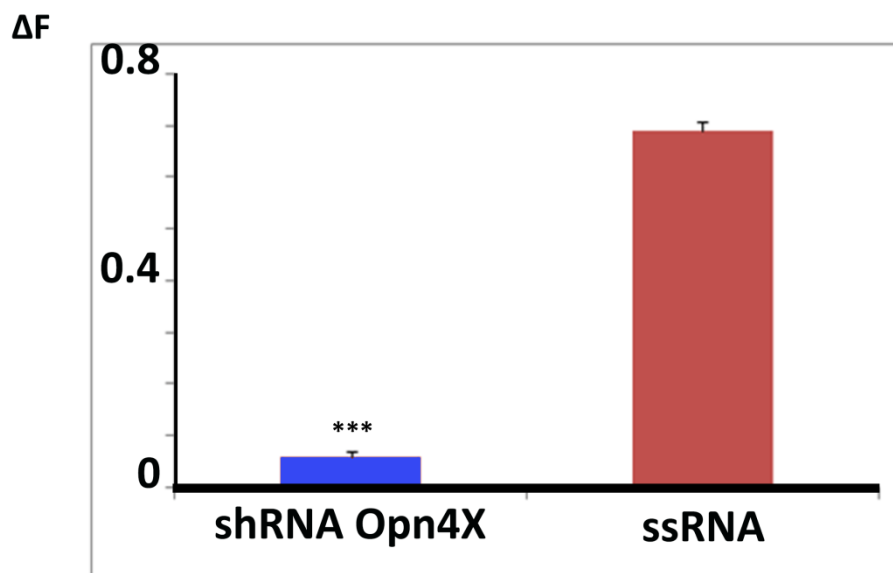
Figura 11. Inmunocitoquímica de cultivos primarios de CHs, transfectadas con *Opn4X* shRNA y ssRNA respectivamente. Panel izquierdo CHs transfectadas con shRNA *Opn4x* y panel derecho CHs transfectadas con ssRNA. Rojo (*Opn4 X*), Azul (DAPI). Las células fueron cultivadas por 24 hs post-transfección, y se cuantifico la fluorescencia relativa de las inmunocitoquímicas. E. RT-PCR para cultivos primarios de CHs incubados con ssRNA y shRNA respectivamente.. F Semicuantificación de los resultados obtenidos por RT-PCR.

La semicuantificación de los experimentos de inmunocitoquímica, demuestra una baja en la expresión de Melanopsina X de ~ %40.

A



B



**Figura 12. : Knockdown en cultivos primarios de CHs.** Estudios de Imaging de  $Ca^{+2}$ , en cultivos primarios de CHs, los cultivos transfectados y transfectados con ssRNA (control) fueron expuestos a un estímulo de luz de 1000 lux, durante 5seg. En el caso de los cultivos transfectados con el shRNAOpn4X, la respuesta a la luz se vio sensiblemente afectada. C. Cuantificación del  $\Delta F$ .



En paralelo realizamos otra serie de estudios con Opsinamida (Jones, Hatori et al. 2013) (inhibidor de Opn4) y encontramos también una reducción significativa en las respuestas a la luz de las CHs testeadas. Fig 13 (A y B).

Por otra parte, resultó interesante testear dos inhibidores, que no afectaran componentes de la vía de respuesta en CHs, para este fin seleccionamos a Zaprinast, (un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE) conocido por afectar la respuesta a la luz en fotorreceptores) y Toxina Pertussis (actúa inhibiendo la proteína G de rodopsina). Ninguno de los dos inhibidores afectó significativamente la respuesta a la luz en CHs

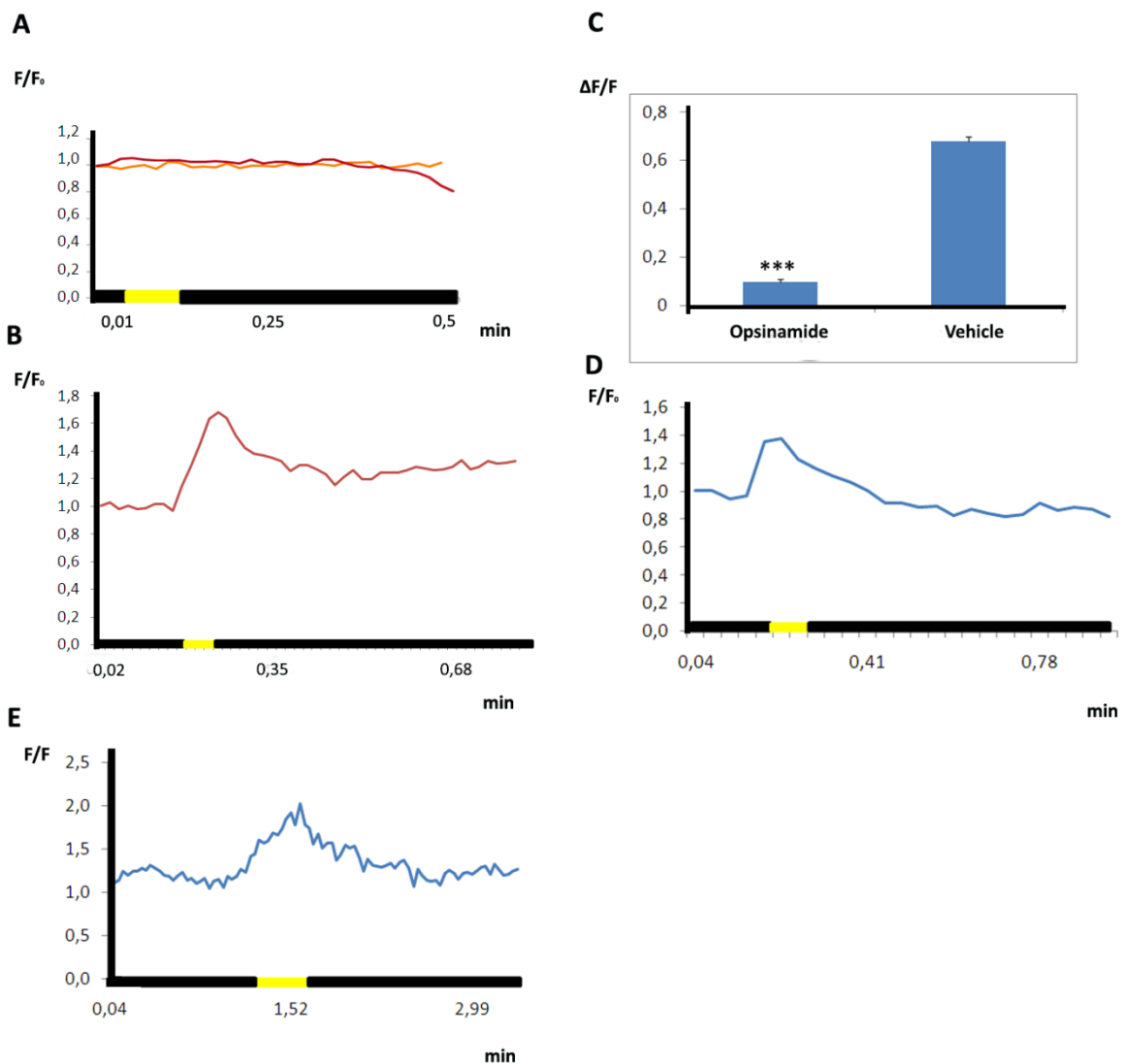


Figura 13. Inhibición de la respuesta a la luz utilizando una opsinamida (10nM), que afecta la funcionalidad de Melanopsina en CHs en cultivo. Efecto de inhibidores melapsinergicos (opsinamida) e inhibidores de la fotocascada visual en los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, en cultivos de CHs luego de la exposición a la luz. Se observaron cambios significativos inducidos por la luz ( $F/F_0$ ) en los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular en los cultivos tratados con vehículo (control B) no así, en los cultivos tratados con opsinamida 10nM (A), en los cuales la respuesta se vio afectada drásticamente.

Representación gráfica de los  $\Delta F$  observados en los cultivos tratados con Opsinamida o vehículo (C).

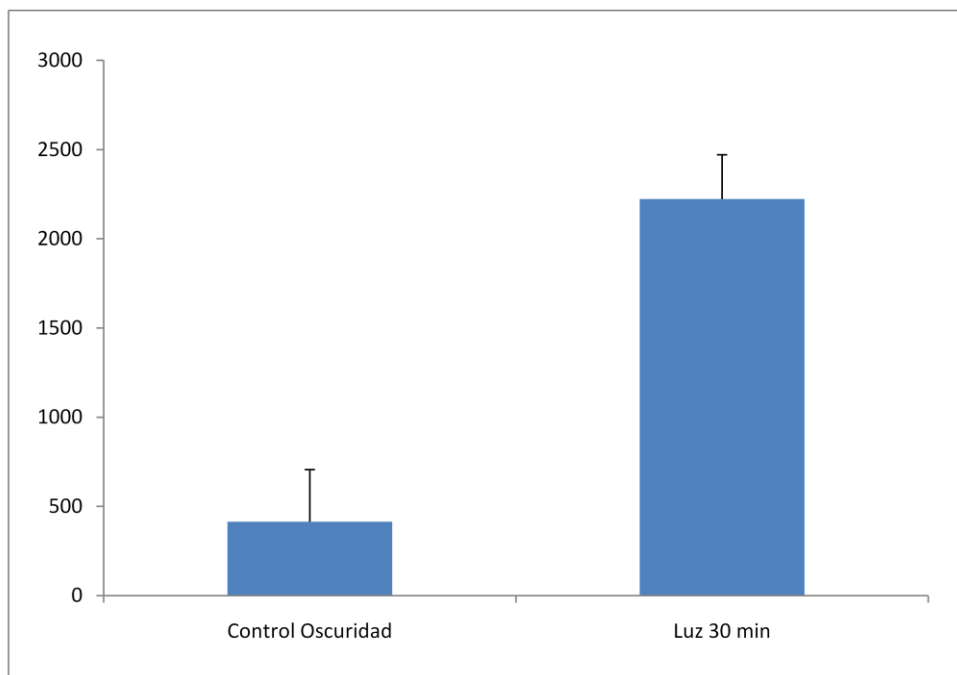
*Por el contrario, cuando los inhibidores específicos de la fotocascada visual (toxina Pertussis, o Zaprinast) fueron testados las respuestas a la luz no se vieron afectadas.*

*Toxina Pertussis (500 nM, se preincubada durante 24 h) (D) o zaprinast (0,1 M, se preincubado durante 4 h) (E).*

### **Eventos Neuroquímicos disparados por la respuesta a la luz en CHs**

A fin de indagar en los eventos neuroquímicos desenlazados como respuesta a la luz en las CHs, evaluamos la posibilidad de que el neurotransmisor inhibitorio descrito en estas neuronas pudiera estar siendo liberado por las mismas. Con este propósito realizamos experimentos con [<sup>3</sup>] GABA, para ello, incubamos cultivos de CHs con el radiactivo, y luego de un lavado, expusimos los cultivos a 1000 lux, durante 30 min. Se midió liberación [<sup>3</sup>] GABA en el sobrenadante, utilizando un contador de centelleo, como se detalla en Materiales y Métodos. Comprobamos que las CHs en cultivo, son capaces de captar [<sup>3</sup>] GABA y liberar el neurotransmisor en respuesta a la luz (Fig. 14).

Liberación de  
[<sup>3</sup>H] GABA  
dpm/pocillo



**Figura 14** Liberación de <sup>3</sup>H-GABA en cultivos primarios de CHs. . Cultivos primarios de CHs fueron incubados por 30min a 37 C con [<sup>3</sup>H]-GABA (0.5–1 mCi, actividad específica 87.1Ci/mmol en la oscuridad, el medio de cultivo fue lavado y luego las células fueron expuestas a luz blanca brillante durante 30 min, además se mantuvo un control en oscuridad. Representación gráfica mostrando la liberación de <sup>3</sup>H-GABA en cultivos primarios de CHs.

# DISCUSSION

## 6. DISCUSION

Las CHs dentro de la retina interna, proyectan lateralmente e integran los aportes de los fotorreceptores visuales conos y bastones, proporcionándoles una retroalimentación negativa que genera una respuesta del tipo antagónica. Además las CHs pueden ejercer una modulación positiva sobre los fotorreceptores que solo actúa localmente, y no se extiende a todos los fotorreceptores, como si ocurre con la modulación negativa (Jackman col., 2011). Cada CH recibe entradas sinápticas de muchos bastones y conos, y, a cambio, genera una señal de alimentación que altera la liberación de neurotransmisores en los mismos. Por lo tanto, a través de esta red neuronal que comprende las CHs, bastones, conos y las células bipolares, la luz en la retina genera la representación de contraste espacial, la detección visual de los bordes, la discriminación de color y adaptación a la luz (Jackman, Babai et al. 2011; Kramer and Davenport 2015). Además las CHs regulan la concentración de  $Ca^{+2}$  pre-sináptica en fotorreceptores; mediante este mecanismo los fotorreceptores se adaptan a la luz ambiental, y se evitan las respuestas del tipo todo o nada. También son imprescindibles para asegurar la transmisión de información de una neurona a otra. En la oscuridad, las CHs se despolarizan, como consecuencia de la liberación de glutamato por los fotorreceptores visuales, que a su vez, provocan la liberación de GABA por CHs en las sinapsis de cono que promueven una inhibición neuroquímica, a través de la activación de los receptores de GABA en las membranas fotorreceptoras, la liberación de protones, o señalización mediante el intercambio de iones con células adyacentes (Kramer and Davenport 2015). Por el contrario, en presencia del estímulo lumínico, conos y bastones se hiperpolarizan e inhiben la liberación de glutamato hacia las CHs evitando así su despolarización y posterior respuesta. En teleósteos, se ha informado que las CHs de la retina pueden responder intrínsecamente a la luz (Jenkins, Munoz et al. 2003; Cheng, Tsunenari et al. 2009). Estos

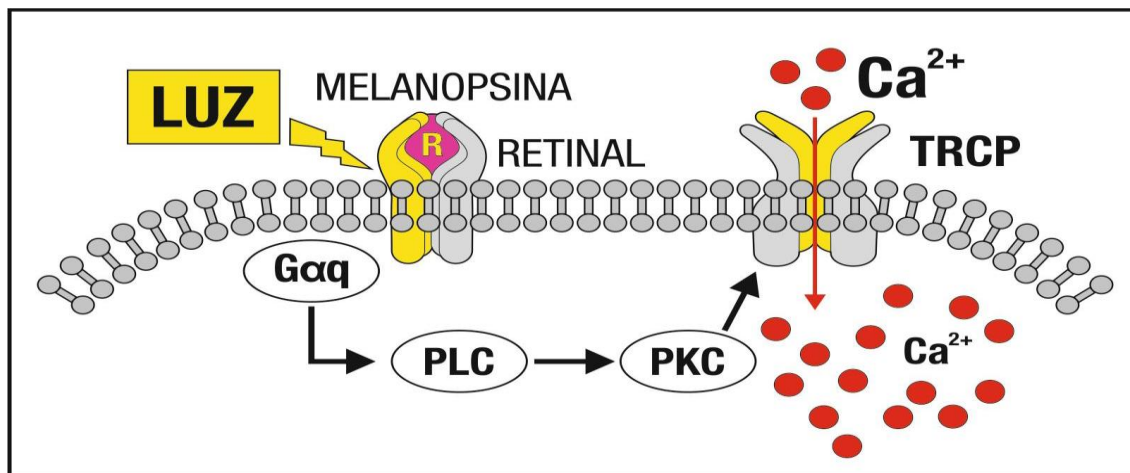
grupos demostraron que estas células expresan fotopigmentos no visuales tales como VA (vertebrate ancient) opsina o OPN4, sin caracterizar específicamente cuál de estas opsinas era responsable de la fotosensibilidad observada.

En este sentido, OPN4 se clonó inicialmente a partir de melanóforos dérmicos fotosensibles cultivados de embriones de *Xenopus laevis* (Provencio, Jiang et al. 1998). Posteriormente, se ha encontrado en el cerebro, iris, y en las células de la retina de la mayoría de los vertebrados examinados (Provencio and Foster 1995; Provencio, Rodriguez et al. 2000; Provencio, Rollag et al. 2002; Chaurasia, Rollag et al. 2005; Bellingham, Chaurasia et al. 2006; Contin, Verra et al. 2006). Estas células expresan también componentes del reloj molecular y la enzima clave de la biosíntesis de Melatonina, lo que les confiere además de la capacidad fotorreceptiva intrínseca, la potencialidad para medir el tiempo y comportarse como un reloj circadiano, lo cual es esencial para la fisiología retinal. Aunque en mamíferos, OPN4 se limita al pequeño número de CGR, las CGRif, que inervan el núcleo supraquiasmático y otras áreas visuales y no visuales, en los vertebrados inferiores, las células que expresan melanopsina en la retina han sido muy divergentes. En la retina de pollo, la expresión ARNm de *Opn4* fue informado por primera vez por Tomonari en el 2005, aunque la prueba de la expresión de su proteína fue demostrada varios años después (Verra col., 2011).

Numerosa evidencia presente en la literatura sugiere que *Opn4* es un ortólogo de la opsina visual de invertebrado acoplada a proteína Gq (revisado en Díaz col., 2016). Por otra parte, la cascada de la fototransducción que opera en el CGRif *Opn4* (+) implica claramente la participación de PLC y Gq, además de las variaciones en niveles IP<sub>3</sub>, movilización de Ca<sup>2+</sup> y la activación de los canales TRP (Contin, Verra et al. 2006; Graham, Wong et al. 2008). Tomando en cuenta la similitud de las cascadas implicadas en la respuesta a la luz, junto

con evidencias sobre el origen embriológico de CHs y CGRs en la retina, la expresión de marcadores de especificación del destino celular, y la presencia de fotopigmentos no visuales, sugieren fuertemente que CHs y CGRs podrían derivar de una célula fotorreceptora antigua común. En esta tesis proporcionamos la primera evidencia de que las CHs de la retina de pollo, que expresan *Opn4x* son intrínsecamente fotosensibles. Más aún, en presencia de retinaldehído conforma un fotopigmento completamente activo. Estas células responden intrínsecamente a la luz con incrementos importantes y sostenidos en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular procedentes principalmente de depósitos internos del tipo  $IP_3$  y/o en parte del medio extracelular, que además esta cascada depende de la proteína Gq y la activación de PLC y que conduce finalmente a la liberación de GABA, neurotransmisor inhibitorio que podría actuar sobre los fotorreceptores clásicos para modular las funciones visuales.

El uso de un conjunto de inhibidores, junto a los experimentos previos en los que demostramos la presencia de Melanopsina X, tanto por RT-PCR como Western Blot, nos permite proponer algunos de los supuestos participantes en la cascada de fotorespuesta de las CHs (Esquema 6).





*Esquema 6. Esquema de la cascada implicada en la respuesta a la luz en las CHs.*

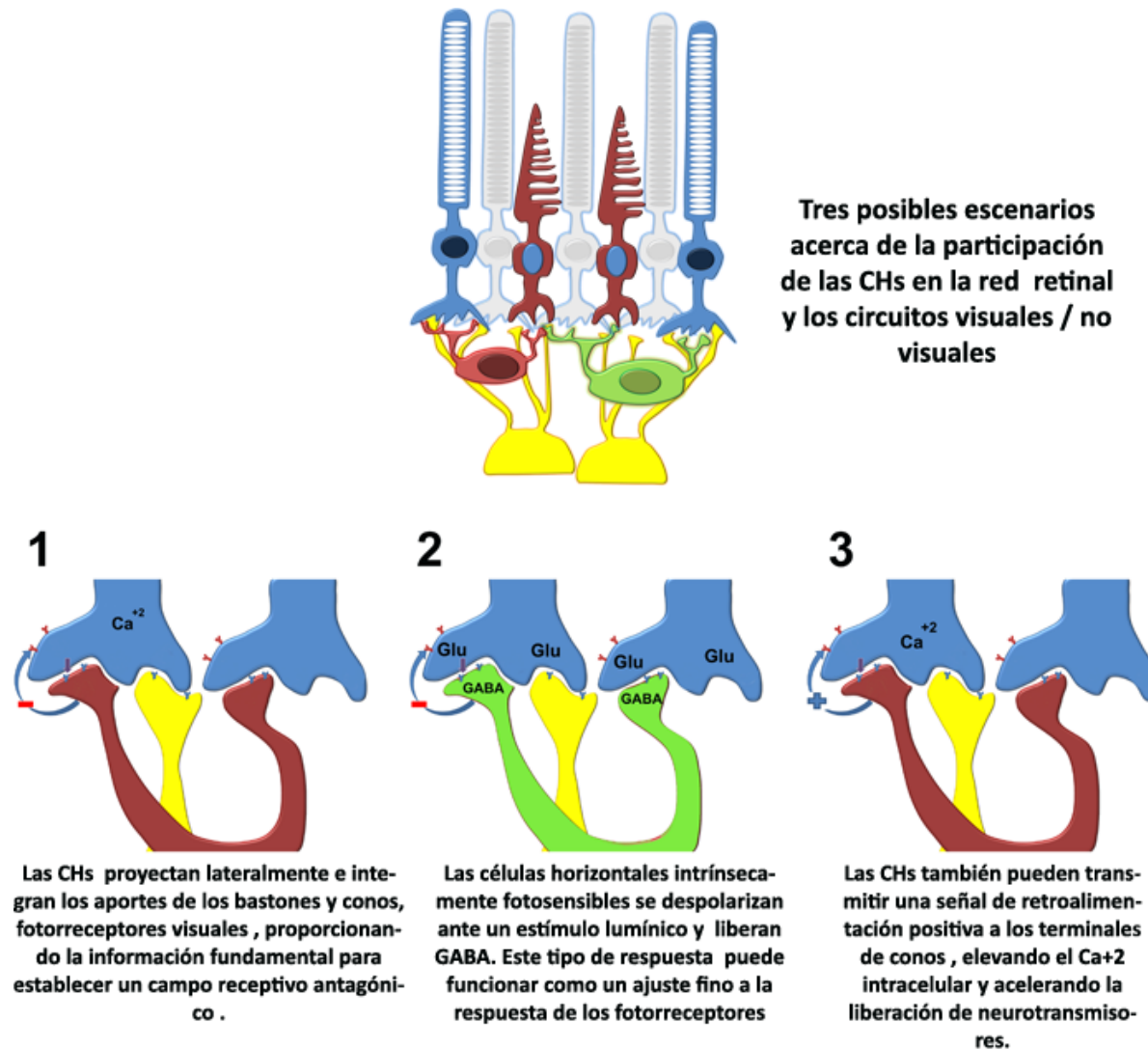
Esta novedosa sensibilidad a la luz por parte de las CHs puede proporcionar una función de regulación visual sobre los fotorreceptores más local, modificando además la liberación de neurotransmisores, y por lo tanto, la percepción de la intensidad de luz, ya que bajo iluminación las CHs podrían aumentar la retroalimentación negativa reforzando la inhibición lateral sobre los fotorreceptores vecinos.

A partir de la información disponible en literatura, junto con los aportes de esta tesis, se pueden plantear al menos, 3 diferentes escenarios acerca de la participación de las CHs en el circuito retinal. Por un lado la ya conocida y descrita retroalimentación negativa, la cual proporciona información fundamental para establecer un campo receptivo antagónico. Además reduce el rango dinámico de liberación de neurotransmisores y los niveles de  $Ca^{+2}$  en la sinapsis de fotorreceptores evitando así respuestas del tipo “todo o nada” (Esquema 7, situación 1).

En un segundo escenario encontramos a las CHs respondiendo intrínsecamente a un estímulo lumínico, como ha sido oportunamente demostrado en esta tesis (Esquema 7, situación 2). La liberación de GABA ante un estímulo de luz podría estar contribuyendo a una regulación más fina de los niveles de neurotransmisores en fotorreceptores.

La tercera posibilidad, se refiere a la recientemente reportada retroalimentación positiva de las CHs sobre los fotorreceptores (Esquema 7, situación 3). Ha sido reportado que, al aumentar la liberación de neurotransmisores de los conos, la retroalimentación positiva puede recuperar el rango dinámico perdido en la retroalimentación negativa. El grupo de (Jackman col., 2011) reporta una regulación positiva por parte de estas interneuronas sobre los fotorreceptores, proponiendo además que éste es un fenómeno local, pero no hay evidencia acerca de los factores que estarían regulando este novedoso feedback. Las CHs

que expresan Melanopsina podrían estar desempeñando, también, una importante función en este sentido.



Esquema 7. Esquemización de los 3 posibles escenarios a través de los cuales las CHs estarían participando en la retina.

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

El conjunto de resultados obtenidos a lo largo de esta tesis de doctorado nos permite demostrar, por primera vez, la presencia de una nueva población de células fotosensibles en la retina de pollos, las Células Horizontales (CHs) que expresan el fotorpigmento no visual Melanopsina X (Opn4x). Específicamente, nuestros experimentos demuestran que las CHs son nuevos fotorreceptores que requieren la expresión de Opn4x y retinaldehído como cromóforo, para así actuar a través de una muy antigua cascada de fototransducción similar a la de los fotorreceptores rhabdoméricos de invertebrados. Demostramos además que la fotocascada implica una proteína Gq, la activación de la PLC C, la movilización de  $Ca^{+2}$ , y la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA.

En base a los hallazgos y a estudios previos presentes en literatura acerca de los circuitos de la retina, podemos especular que las CHs y las CHs intrínsecamente fotosensibles dentro de la retina actúan junto a los fotorreceptores clásicos en la regulación de las tareas visuales.

Las CHs intrínsecamente fotosensibles podrían estar involucradas en la vía visual ya que son elementos principales en el circuito retinal, que participan generando un entorno antagonista alrededor del campo receptivo de las células bipolares. Además responderían a la luz ambiental tenue, afectando a las células bipolares, así como también el acoplamiento eléctrico entre las mismas CHs o sus propiedades sinápticas. Muchas preguntas se abren a partir de estos resultados: ¿cómo afectan específicamente estas interneuronas en el circuito retinal?, ¿por qué evolutivamente estas interneuronas fotosensibles fueron conservadas en algunas especies, mientras que en otras no? Lo que es seguro, es que estos hallazgos constituyen la primera evidencia de la presencia de CHs intrínsecamente fotosensibles en la retina de aves, y que la complejidad del circuito neuronal retinal, con sus fotorreceptores

clásicos y no clásicos, y la interacción entre estos, es significativamente mayor de lo que pensábamos oportunamente.

## Abreviaturas

ADNc	ácido desoxiribonucleico copia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CA	células amácrinas
CB	células bipolares
CGR	células ganglionares
CGRif	células ganglionares intrínsecamente fotosensibles
CH	células horizontales
CI	células interplexiformes
cm	centímetro
CNE	capa nuclear externa
CNI	capa nuclear interna
Col	Colaboradores
CPE	capa plexiforme externa
CPI	capa plexiforme interna
DNAsa	deoxyribonucleasa I
E1, E...	estadio embrionario
FR	fotorreceptores
GABA	ácido $\gamma$ aminobutírico
H	hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ICQ	inmunocitoquímica
IHQ	inmunohistoquímica

mA	miliAmper
Opn4m	proteína Melanopsina ortólogo tipo M
Opn4x	proteína Melanopsina ortólogo tipo X
Min	min
ml	mililitro
NIF	del inglés <i>non-image forming</i> : visión no formadora de imágenes
nm	nanómetro
NSQ	núcleo supraquiasmático
ON	<i>over night</i> , toda la noche
p/v	peso sobre volumen
P1, P...	estadio posnatal
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo
SE	segmento externo
SI	segmento interno
TA	temperatura ambiente
UV	ultravioleta
v/v	volumen sobre volumen
WB	western blot
μl	microlitro

# BIBLIOGRAFIA



- Adler, R. (2000). "A Model of Retinal Cell Differentiation in the Chick Embryo." Progress in Retinal and Eye Research **Vol. 19**(No. 5): pp. 529 to 557.
- Balasubramanian, V. and P. Sterling (2009). "Receptive fields and functional architecture in the retina." J Physiol **587**(Pt 12): 2753-2767.
- Beaudet, A., M. Cuenod, et al. (1981). "Selective bidirectional transport of [3H]d-aspartate in the pigeon retino-tectal pathway." Neuroscience **6**(10): 2021-2034.
- Belecky-Adams, T., S. Tomarev, et al. (1997). "Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(7): 1293-1303.
- Bellingham, J., S. S. Chaurasia, et al. (2006). "Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates." PLoS Biol **4**(8): e254.
- Berson, D. M., F. A. Dunn, et al. (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." Science **295**(5557): 1070-1073.
- Blose, S. H., D. I. Meltzer, et al. (1984). "10-nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin." J Cell Biol **98**(3): 847-858.
- Bowmaker, J. K. (1998). "Evolution of colour vision in vertebrates." Eye (Lond) **12** ( Pt **3b**): 541-547.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brocco, M. A. and P. Panzetta (1999). "Survival and process regrowth of purified chick retinal ganglion cells cultured in a growth factor lacking medium at low density.

- Modulation by extracellular matrix proteins." Brain Res Dev Brain Res **118**(1-2): 23-32.
- Bruhn, S. L. and C. L. Cepko (1996). "Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina." J Neurosci **16**(4): 1430-1439.
- Cailleau, V., M. Bernard, et al. (2005). "Differential regulation of melatonin synthesis genes and phototransduction genes in embryonic chicken retina and cultured retinal precursor cells." Mol Vis **11**: 472-481.
- Connaughton, V. P., D. Graham, et al. (2004). "Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina." J Comp Neurol **477**(4): 371-385.
- Contin MA, V. D., Guido ME. (2006). "An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells." FASEB J **20**(14):2648-50.
- Contin, M. A., D. M. Verra, et al. (2006). "An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells." Faseb J **20**(14): 2648-2650.
- Contin, M. A., D. M. Verra, et al. (2010). "Light-activation of the Phosphoinositide Cycle in Intrinsically Photosensitive Chicken Retinal Ganglion Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci.
- Contin, M. A., D. M. Verra, et al. (2010). "Light activation of the phosphoinositide cycle in intrinsically photosensitive chicken retinal ganglion cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(11): 5491-5498.

- Chaurasia, S. S., M. D. Rollag, et al. (2005). "Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types." Journal of neurochemistry **92**(1): 158-170.
- Cheng, N., T. Tsunenari, et al. (2009). "Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts." Nature **460**(7257): 899-903.
- Diaz, N. M., L. P. Morera, et al. (2016). "Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates." Photochemistry and photobiology **92**(1): 29-44.
- Diaz, N. M., L. P. Morera, et al. (2014). "Early appearance of nonvisual and circadian markers in the developing inner retinal cells of chicken." Biomed Res Int **2014**: 646847.
- Doh, S. T., H. Hao, et al. (2010). "Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques." BMC Dev Biol **10**: 8.
- Dowling, J. E. and B. B. Boycott (1966). "Organization of the primate retina: electron microscopy." Proc R Soc Lond B Biol Sci **166**(2): 80-111.
- Doyle, S. and M. Menaker (2007). "Circadian photoreception in vertebrates." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 499-508.
- Drivenes, O., A. M. Soviknes, et al. (2003). "Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain." The Journal of comparative neurology **456**(1): 84-93.
- Edqvist, P. H., M. Lek, et al. (2008). "Axon-bearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin." BMC Dev Biol **8**: 46.

- Edqvist, P. H., S. M. Myers, et al. (2006). "Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10." Eur J Histochem **50**(2): 147-154.
- Euler, T. and H. Wässle (1995). "Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina." J Comp Neurol **361**(3): 461-478.
- Fernald, R. D. (2006). "Casting a genetic light on the evolution of eyes." Science **313**(5795): 1914-1918.
- Francois, J. and J. P. Deweer (1950). "[Dissociation between visual function and pupilomotor function of the optic nerve]." Ann Ocul (Paris) **183**(11): 913-927.
- Frigato, E., D. Vallone, et al. (2006). "Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles." Die Naturwissenschaften **93**(8): 379-385.
- Fu, Y., H. Zhong, et al. (2005). "Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(29): 10339-10344.
- Gallego, A. (1971). "Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina." Vision Res Suppl **3**: 33-50.
- Gallego, A. (1986). "Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells." Progress in Retinal Research(5): 165-206.
- Graham, D. M., K. Y. Wong, et al. (2008). "Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade." Journal of neurophysiology **99**(5): 2522-2532.

- Guido, M. E., E. Garbarino-Pico, et al. (2010). "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system." Progress in neurobiology **92**(4): 484-504.
- Guido, M. E., E. Garbarino-Pico, et al. (2010). "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system." Prog Neurobiol **92**(4): 484-504.
- Hageman, G. S. and L. V. Johnson (1991). The photoreceptor-retinal pigmented epithelium interface. . "Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision" J. R. Heckenlively and G. B. Arden. St. Louis, 1991, Mosby Year Book: 53-68.
- Hankins, M. W., S. N. Peirson, et al. (2008). "Melanopsin: an exciting photopigment." Trends in neurosciences **31**(1): 27-36.
- Hattar, S., H. W. Liao, et al. (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity." Science **295**(5557): 1065-1070.
- Hicks, D. and R. S. Molday (1986). "Differential immunogold-dextran labeling of bovine and frog rod and cone cells using monoclonal antibodies against bovine rhodopsin." Exp Eye Res **42**(1): 55-71.
- Hughes, S., A. Jagannath, et al. (2015). "Photic regulation of clock systems." Methods in enzymology **552**: 125-143.
- Hughes, W. F. and S. C. McLoon (1979). "Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction." Exp Neurol **66**(3): 587-601.
- Hyer, J., T. Mima, et al. (1998). "FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain." Development **125**(5): 869-877.

- Jackman, S. L., N. Babai, et al. (2011). "A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors." PLoS biology **9**(5): e1001057.
- Jenkins, A., M. Munoz, et al. (2003). "VA opsin, melanopsin, and an inherent light response within retinal interneurons." Current biology : CB **13**(15): 1269-1278.
- Jones, K. A., M. Hatori, et al. (2013). "Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction." Nat Chem Biol **9**(10): 630-635.
- Keyser, K. T., L. R. Britto, et al. (1990). "Presumptive catecholaminergic ganglion cells in the pigeon retina." Vis Neurosci **4**(3): 225-235.
- Kolb, H., R. Nelson, et al. (2001). "Cellular organization of the vertebrate retina." Prog Brain Res **131**: 3-26.
- Kolb, H., E. Netzer, et al. (1997). "Neural circuitry and light responses of the dopamine amacrine cell of the turtle retina." Mol Vis **3**: 6.
- Koyanagi, M., K. Kubokawa, et al. (2005). "Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells." Current biology : CB **15**(11): 1065-1069.
- Kram, Y. A., S. Mantey, et al. (2010). "Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics." PLoS One **5**(2): e8992.
- Kramer, R. H. and C. M. Davenport (2015). "Lateral Inhibition in the Vertebrate Retina: The Case of the Missing Neurotransmitter." PLoS biology **13**(12): e1002322.
- Kumbalasiri, T. and I. Provencio (2005). "Melanopsin and other novel mammalian opsins." Experimental eye research **81**(4): 368-375.
- Kumbalasiri, T., M. D. Rollag, et al. (2007). "Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light." Photochemistry and photobiology **83**(2): 273-279.

- Lamb, T. D., S. P. Collin, et al. (2007). "Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup." Nat Rev Neurosci **8**(12): 960-976.
- LaVail, M. M. (1983). "Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina." Trans Ophthalmol Soc U K **103** ( Pt 4): 397-404.
- Lima, L. H., S. A. M., et al. (2006). "Melanopsin in chicken melanocytes and retina." Biological Rhythm Research **37**(5): 393-404.
- Livesey, F. J. and C. L. Cepko (2001). "Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina." Nat Rev Neurosci **2**(2): 109-118.
- Lukasiewicz, P. D. (2005). "Synaptic mechanisms that shape visual signaling at the inner retina." Prog Brain Res **147**: 205-218.
- Mariani, A. P. (1987). "Neuronal and synaptic organization of the outer plexiform layer of the pigeon retina." Am J Anat **179**(1): 25-39.
- Mey, J. and S. Thanos (2000). "Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis." Brain Res Brain Res Rev **32**(2-3): 343-379.
- Morera, L. P., N. M. Diaz, et al. (2012). "A novel method to prepare highly enriched primary cultures of chicken retinal horizontal cells." Exp Eye Res **101**: 44-48.
- Nayak, S. K., T. Jegla, et al. (2007). "Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light." Cellular and molecular life sciences : CMLS **64**(2): 144-154.
- Nguyen-Legros, J. and D. Hicks (2000). "Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium." Int Rev Cytol **196**: 245-313.
- Niemeyer, B. A., E. Suzuki, et al. (1996). "The Drosophila light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL." Cell **85**(5): 651-659.

- Olson, M. D. (1979). "Scanning electron microscopy of developing photoreceptors in the chick retina." Anat Rec **193**(3): 423-438.
- Panda, S., S. K. Nayak, et al. (2005). "Illumination of the melanopsin signaling pathway." Science **307**(5709): 600-604.
- Panda, S., I. Provencio, et al. (2003). "Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice." Science **301**(5632): 525-527.
- Peichl, L. and J. Gonzalez-Soriano (1994). "Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig." Vis Neurosci **11**(3): 501-517.
- Peichl, L., D. Sandmann, et al. (1998). Comparative anatomy and function of mammalian horizontal cells. Development and Organization of the Retina From Molecules to Function. L. M. Chalupa and B. L. Finlay. New York, Plenum Press. **299**.
- Poche, R. A. and B. E. Reese (2009). "Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology." Development **136**(13): 2141-2151.
- Provencio, I. and R. G. Foster (1995). "Circadian rhythms in mice can be regulated by photoreceptors with cone-like characteristics." Brain research **694**(1-2): 183-190.
- Provencio, I., G. Jiang, et al. (1998). "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(1): 340-345.
- Provencio, I., I. R. Rodriguez, et al. (2000). "A novel human opsin in the inner retina." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(2): 600-605.



Provencio, I., M. D. Rollag, et al. (2002). "Photoreceptive net in the mammalian retina.

This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night."

Nature **415**(6871): 493.

Qiu, G., M. J. Seiler, et al. (2005). "Photoreceptor differentiation and integration of retinal

progenitor cells transplanted into transgenic rats." Experimental eye research **80**(4):

515-525.

Schonbach, C. and J. Schonbach (1972). "Protein renewal in the photoreceptor outer

segments of the pigeon retina." Experientia **28**(7): 836-837.

Sernagor, E., S. Eglén, et al. (2006). Retinal development. Cambridge, Cambridge

University Press.

Tanabe, K., Y. Takahashi, et al. (2006). "Cadherin is required for dendritic morphogenesis

and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells." Development

**133**(20): 4085-4096.

Tarres, M. A., M. Baron, et al. (1986). "The horizontal cells in the retina of the owl, *Tyto*

*alba*, and owllet, *Carinae noctua*." Exp Eye Res **42**(4): 315-321.

Terakita, A., H. Tsukamoto, et al. (2008). "Expression and comparative characterization of

Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin." J Neurochem **105**(3):

883-890.

Thoreson, W. B. and S. C. Mangel (2012). "Lateral interactions in the outer retina." Prog

Retin Eye Res **31**(5): 407-441.

Tomonari, S., A. Takagi, et al. (2005). "A non-canonical photopigment, melanopsin, is

expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken

retina." Developmental dynamics : an official publication of the American

Association of Anatomists **234**(3): 783-790.

- Tu, D. C., L. A. Owens, et al. (2006). "Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(27): 10426-10431.
- Turner, D. L. and C. L. Cepko (1987). "A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development." Nature **328**(6126): 131-136.
- Verra, D. M., M. A. Contin, et al. (2011). "Early onset and differential temporospatial expression of melanopsin isoforms in the developing chicken retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(8): 5111-5120.
- Wald, G. (1951). "The chemistry of rod vision." Science **113**(2933): 287-291.
- Werblin, F. (1991). "Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture]." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(3): 459-483.
- Werblin, F. S. and J. E. Dowling (1969). "Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording." J Neurophysiol **32**(3): 339-355.
- Wolf, H. K., R. Buslei, et al. (1996). "NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology." J Histochem Cytochem **44**(10): 1167-1171.
- Xie, H. Q. and R. Adler (2000). "Green cone opsin and rhodopsin regulation by CNTF and staurosporine in cultured chick photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(13): 4317-4323.
- Zuker, C. S. (1996). "The biology of vision of *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(2): 571-576.