

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

# REGENERACIÓN DE CROMÓFORO EN FOTORRECEPTORES NO VISUALES

Licenciado en Bioquímica Clínica Nicolas

Maximiliano Díaz

Director de Tesis: Mario Eduardo Guido



C I Q U I B I C

Tesista: Nicolas M. Diaz

Director de Tesis: Mario E. Guido

Tribunal de tesis:

Irene Martijena

María Cecilia Sánchez

Hugo Maccioni

Evaluadora Externa: Nora Rotstein

HAPPINESS ONLY REAL WHEN SHARED

"la felicidad solo es real cuando es compartida"

Christopher "Alex" McCandless

Esta tesis es dedicada a Caro, Nora y Yola

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quisiera agradecer al Consejo Nacional de investigación científica y tecnológica (CONICET), a la Universidad Nacional de Córdoba, a la facultad de ciencias químicas y a toda persona que aportó para que mi total educación y formación profesional fuera completamente gratuita.

Por otra parte quisiera agradecer a Mario y a todo el centro de Investigación en química biológica de Córdoba (CIQUIBIC) por abrirme las puertas y darme un lugar para realizar esta tesis.

Desde que entre al laboratorio de Mario, he visto pasar muchas personas por él. Entre como el más pequeño y me voy como uno de los viejos. Todas estas personas me ayudaron a progresar como científico y persona. Quisiera agradecer a Diego Valdez, Paula Nieto y a Victoria Acosta-Rodríguez que siempre me trataron como un hermano menor y me ayudaron en todo. A Lucas “el toro” Sosa por sus hilarantes comentarios y por obligarme a ver video en internet. A María Ana Contín y Edu Garbarino por sus consejos y tiempos para escucharme. A los pequeños, Paulita Wagner, Nati Monjes e Nacho Cheva por ponerme a prueba como maestro y darme cuenta que todavía me falta mucho. A Mercedes por estar ahí, en las buenas y en las malas y darme un buen consejo cuando todo fue oscuro (gracias). No me olvidaba de vos Luis P. Morera, no me voy a olvidar de tantas anécdotas, no fue fácil soportarme a mí y mi humor pero lo conseguiste, gracias por todo.

A Nati Chanaday por ser mi amiga desde que empezamos en el laboratorio del Dr. Arce y demostrarme que se puede hacer ciencia con pasión.

Quiero agradecer a Juancho y Aldana por su larga amistad, por estar ahí en las buenas y en las malas, las buenas amistades son las que aguantan el paso del tiempo. Ya vamos a ser ricos en algún momento.

No quiero olvidar a nadie, a Guille Zampar, Quio Carbajal, Mauge Chesta, Tomas Tempesti, Luz Quinteros y todo aquel que olvide agregar.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, a mis hermanos Camila, Agustín y Mariel por apoyarme siempre. A mi papá por el sacrificio que hizo por su familia y esta pudiera vivir.

Como dice arriba, esta Tesis va dedicar a tres mujeres que si ellas esta tesis no se hubiese realizado. Quiero dedicar esta tesis a mi abuela Yolanda, que sin su ayuda y apoyo no podría haber terminado la carrera de grado. Gracias abuela donde quiera que estés. Por otro lado quiero agradecer a mi mamá Nora Raquel Vélez por educarme y guiarme por el camino que me llevó a donde estoy hoy parado. Esta tesis es para vos.

Finalmente lo más importante, quiero agradecer a Carolina, mi esposa y compañera de viaje en esto que se llama vida. Vos me levantaste cada vez que me caí, me empujaste para salir adelante y nunca me soltaste la mano.

Gracias por todo.

# ÍNDICE

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	10
Summary .....	11
Abreviaturas.....	14
Introducción .....	16
Los ojos: Órganos fotosensibles .....	17
La Retina.....	18
Opsinas y fototransducción.....	27
Fotoquímica de los pigmentos visuales.....	33
Melanopsina y las Funciones no-visuales de la retina .....	38
Receptor acoplado a proteína G de la Retina y del epitelio pigmentario Retinal (RGR).....	48
Objetivos .....	52
<i>Objetivo general</i> .....	52
<i>Objetivos específicos</i> .....	52
Materiales y metodos.....	54
Resultados .....	63
La retina interna de pollos de 7 días de edad mantiene los niveles de 11 cis retinal en presencia de Luz .....	63
El receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) se expresa en la retina interna de pollos de 7 días de edad y en estadios tempranos del desarrollo embrionario. ....	68
RGR se expresa en células Gliales de Müller en retinas de pollo de 7 días y en células neurales de estadios embrionarios. ....	69
RGR se expresa en las células gliales de Müller .....	71
Expresión de RGR en retina de embriones de pollo.....	73
Purificación de células ganglionares a partir del método de “inmuno plaqueo” .....	74
Validación del anticuerpo anti melanopsina X.....	75
Caracterización de los cultivos de células ganglionares enriquecidos en melanopsina X.....	79

Expresión del receptor acoplado a Proteína G de la Retina (RGR) en células en cultivo. ....	87
Cambios en la composición de Retinoides mediados por la luz.....	89
Silenciamiento de RGR mediante oligonucleótidos morfolinos .....	95
El Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) actúa como un regulador del metabolismo de retinoides en cultivos de células ganglionares.....	97
Discusión .....	101
Anexos .....	111
Puesta a Punto y validación del método de cromatografía líquida para separar isómeros de retinoides .....	111
Estadística ANOVA.....	116
Referencias.....	120



# RESUMEN

## RESUMEN

La retina de los vertebrados contiene los fotorreceptores clásicos conos y bastones, responsables de la visión diurna y nocturna respectivamente y las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGRifs) involucradas en la regulación de las funciones no formadoras de imágenes. Los pigmentos visuales rodopsina/ Opsinas de conos de los fotorreceptores clásicos y melanopsina de las CGRifs utilizan retinaldehído como su cromóforo. El proceso de regeneración del cromóforo retinal denominado “ciclo visual” involucra el epitelio pigmentario retinal (en inglés EPR) o las células gliales de Müller. A diferencia de lo anterior, Melanopsina ha sido caracterizada como un pigmento bi/tri estable, en el cual un fotón de una longitud de onda isomeriza 11 cis retinal a all trans retinal y con un segundo fotón se re isomeriza.

Sin embargo, aún es desconocido como se metaboliza el cromóforo en la retina interna. Más aun no es claro si interviene un segundo ciclo alternativo de regeneración donde participa el Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR), una fotoisomerasa putativa de función desconocida en la retina interna.

En este trabajo de tesis investigamos el rol de RGR en la fotoisomerización de retinoides en cultivos primarios de CGR positivos para Opn4X (ortólogo de Xenopus) libres de EPR y otro tipo células provenientes de retinas de embriones de pollo. Las células Opn4x positivas demostraron una respuesta fótica significativa por microscopia de fluorescencia de calcio y fotoisomerización de all trans retinal exógeno a 11 cis retinal y otros retinoides. Se encontró expresión de RGR en retinas en desarrollo y en los cultivos primarios; cuando su expresión es silenciada, los niveles de 11 cis, all trans retinal y all trans retinol en los cultivos expuestos a luz fueron significativamente superiores y los niveles de all trans retinil ésteres inferiores respecto a su control en oscuridad. Estos resultados soportan un nuevo rol de RGR en la CGRif modulando los niveles de retinaldehídos en luz manteniendo el balance de los retinoides en la retina interna.

## SUMMARY

The vertebrate retina contains typical photoreceptor (PR) cones and rods responsible for day/night vision respectively, and intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (CGRifs) involved in the regulation of non-image forming tasks. Rhodopsin/cone opsin photopigments in visual PRs or melanopsin [Opn4] in CGRifs utilize retinaldehyde as chromophore. The retinoid regeneration process denominated “visual cycle” involves the retinal pigment epithelium (RPE) or Müller glial cells. Opn4, on the contrary, has been characterized as a bi/tristable photopigment, in which a photon of one wavelength isomerizes 11-cis to all-trans retinal (Ral), with a second photon re-isomerizing it back.

However, it is unknown how the chromophore is further metabolized in the inner retina. Nor is it yet clear whether an alternative secondary cycle occurs involving players such as the retinal G-protein-coupled receptor (RGR), a putative photoisomerase of unidentified inner retinal activity.

Here we investigated the role of RGR in retinoid photoisomerization in Opn4x (Xenopus ortholog) (+) CGR primary cultures free of RPE and other cells from chicken embryonic retinas. Opn4x (+) CGRs display significant photic responses by calcium fluorescent imaging and photoisomerize exogenous all-trans to 11-cis Ral and other retinoids. RGR was found to be expressed in developing retina and in primary cultures; when its expression was knocked down, levels of 11-cis, all-trans Ral and all-trans retinol in cultures exposed to light were significantly higher and those in all-trans retinyl esters lower than in dark controls. Results support a novel role for RGR in CGRifs to modulate retinaldehyde levels in light keeping the balance of inner retinal retinoid pools.

## PUBLICACIONES

Los resultados de esta tesis fueron publicados en la siguiente revista:

**The Visual Cycle in the Inner Retina of Chicken and the Involvement of Retinal G-Protein-Coupled Receptor (RGR).**

Díaz NM, Morera LP, Tempesti T, Guido ME. Mol Neurobiol (2016).

doi:10.1007/s12035-016-9830-5

Durante el desarrollo de esta tesis se participó en las siguientes publicaciones:

**Novel photoreceptors in the avian inner retina: horizontal cells expressing melanopsin x.**

Morera LP, Díaz NM, Guido ME. PNAS (2016)

**Early appearance of nonvisual and circadian markers in the developing inner retinal cells of chicken.**

Díaz NM, Morera LP, Verra DM, Contin MA, Guido ME. Biomed Res Int.

2014;2014:646847. doi: 10.1155/2014/646847.

**Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates.**

Díaz NM, Morera LP, Guido ME. Photochem Photobiol. 2016 Jan-Feb;92(1):29-44. doi:

10.1111/php.12545

**Differential regulation of feeding rhythms through a multiple-photoreceptor system in an avian model of blindness.**

Valdez DJ, Nieto PS, Díaz NM, Garbarino-Pico E, Guido ME. FASEB J. 2013 Jul;27(7):2702-12. doi: 10.1096/fj.12-222885.

**Differential regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in chicken retinal ganglion cells by light and circadian clock.**

Valdez DJ, Garbarino-Pico E, Díaz NM, Silvestre DC, Guido ME. Chronobiol Int. 2012 Oct;29(8):1011-20. doi: 10.3109/07420528.2012.707160.

**A novel method to prepare highly enriched primary cultures of chicken retinal horizontal cells.**

Morera LP, Díaz NM, Guido ME.

Exp Eye Res. 2012 Aug;101:44-8. doi: 10.1016/j.exer.2012.05.010

## ABREVIATURAS

CGRifs= células ganglionares intrínsecamente fotosensibles

CGR= células ganglionares de la retina

RGR= Receptor acoplado a proteína G de la Retina

EPR= epitelio pigmentario retinal

DA= adaptado a la oscuridad

LA= adaptado a la luz

GPCR= receptor acoplado a proteína G

RDH= retinol deshidrogenasa

IRBP= proteína unidora de retinal inter fotoreceptores

CRBP= proteína unidora de retinol celular

LRAT= lecitin-retinol acil transferasa

DES-1= dihidroceramida desaturasa 1

MFAT= O-acil transferasa multifuncional

NIF= no formadora de imágenes

RD= degeneración de retina o rodless

SCN= núcleo supraquiasmático

OPN4= opsina 4 o melanopsina

WT= tipo salvaje

KO= animal *knock-out* o carente del gen

HPLC= cromatografía líquida de alta *performance*

TA= temperatura ambiente

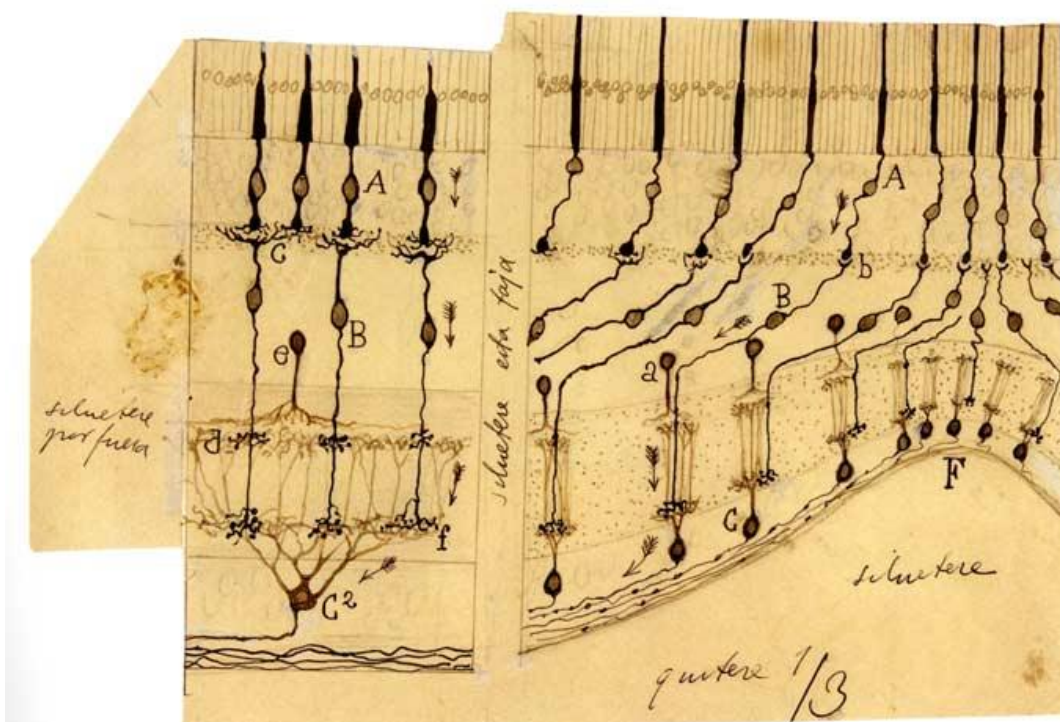
# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Nuestros ojos son maravillosos órganos de los sentidos especializados en la visión que nos permiten apreciar la belleza del mundo que nos rodea a partir de la detección de luz y formación de imágenes

A pesar que todas las partes que componen el ojo son importantes para formar una buena imagen, la parte esencial para la visión es la retina. La retina es esencialmente una parte del sistema nervioso central que se ve estimulada por la luz.

El entendimiento de la organización de la retina de los vertebrados ha sido y es el objeto de estudio de muchos talentosos científicos a través de los años. Ramón y Cajal en el siglo XIX presentó por primera vez una descripción anatómica completa de los tipos de células nerviosas que constituyen a la retina (Figura 1) en un gran número de especies de vertebrados. Luego siguió el entendimiento de la función de la “purpura visual” (rodopsina) en la fotoquímica de los fotorreceptores y su importancia fisiológica en la formación de imágenes, adaptación a luz y oscuridad y la visión cromática.



**Figura 1.** Primer esquema de la retina. Dibujado por Santiago Ramón y Cajal realizado en 1892.



## Los ojos: Órganos fotosensibles

Los ojos son órganos visuales que detectan la luz y la convierten en impulsos electroquímicos que viajan a través de neuronas. La célula fotorreceptora más simple de la visión consciente asocia la luz al movimiento. En organismos superiores el ojo es un sistema óptico complejo que capta la luz de los alrededores, regula su intensidad a través de un diafragma (iris), enfoca el objetivo gracias a una estructura ajustable de lentes (cristalino) para formar la imagen, que luego convierte en un conjunto de señales eléctricas. Estas señales llegan al cerebro a través de rutas neuronales complejas que conectan el nervio óptico del ojo con la corteza visual y otras áreas cerebrales. Los ojos con resolución espacial han evolucionado en diez diferentes tipos fundamentales y el 96 % de las especies animales poseen un sistema óptico complejo. Los ojos con resolución están presentes en moluscos, cordados y artrópodos (Halder y *col.* 1995).

Desde los días de Charles Darwin hasta el presente, se ha comprendido mucho mejor la ascendencia del ojo. Aunque estudiar la estructura del ojo ancestral a través de la evidencia fósil es problemático debido a que los tejidos blandos no dejan marcas o remanentes, la evidencia proveniente de la genética y la anatomía comparada ha respaldado cada vez más la idea de un ancestro común para todos los ojos.

La estructura y el funcionamiento del ojo son similares en la mayoría de los vertebrados. El globo ocular es básicamente una esfera llena de un líquido transparente, llamado humor acuoso, que está compuesto por un 99 % de agua. La pared está formada por capas: la más interna o retina, la intermedia o coroides, y la más externa, que se llama esclerótica.

Posee una lente llamada cristalino, que es ajustable según la distancia; un diafragma, que se llama pupila (cuyo diámetro está regulado por el iris), y un tejido sensible a la luz, que es la retina.

Con la excepción de los peces, anfibios y ofidios, el enfoque se consigue gracias al cambio de forma del cristalino mediante un músculo llamado músculo ciliar.

La luz penetra a través de la pupila, atraviesa el cristalino y se proyecta sobre la retina, donde se transforma, gracias a unas células especializadas llamadas fotorreceptores, en impulsos nerviosos, que son transmitidos, a través del nervio óptico, al cerebro.

## La Retina

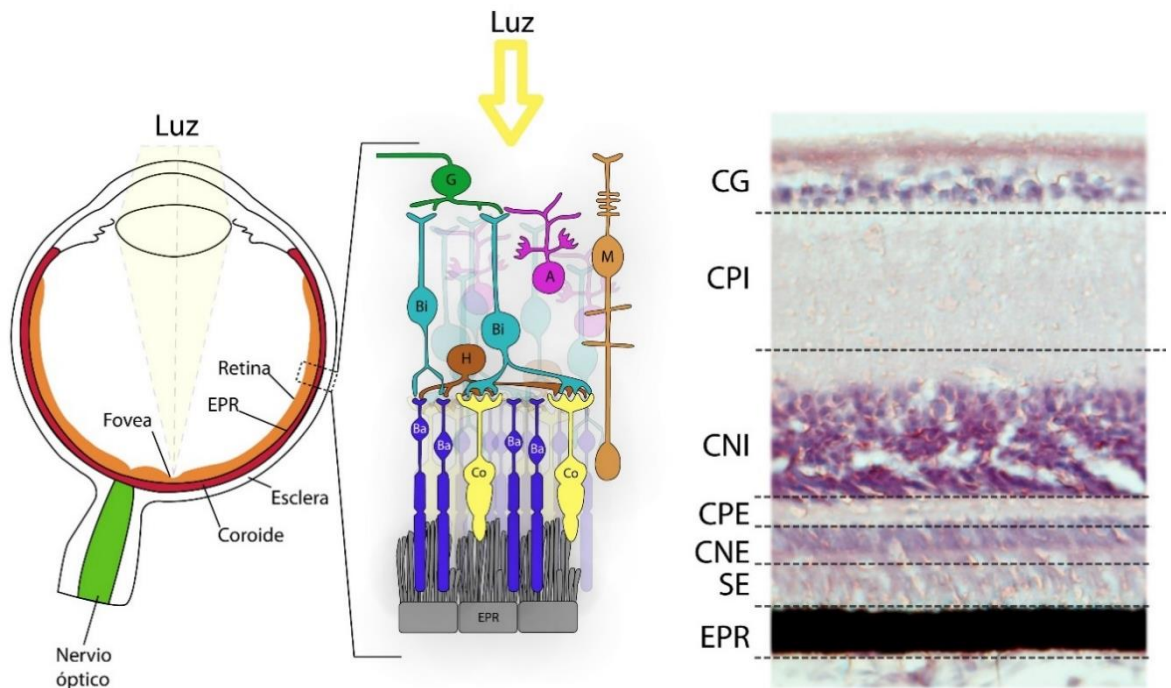
La retina (del latín *rēte*, que significa red) es la tercera capa más interna capa del ojo (figura 2, "retina"), la cual es un tejido laminar fotosensible. La óptica del ojo (córnea y lentes) crean una imagen visual sobre la retina, la cual funcionaria como una película de una cámara. El impacto de la luz sobre la retina inicia una cascada de eventos químicos y eléctricos que finalizan con el disparo del impulso nervioso.

En el desarrollo embrionario de los vertebrados, la retina y el nervio óptico se desarrollan a partir del cerebro en desarrollo, por lo tanto la retina es considerada parte del sistema nervioso central y en realidad es tejido nervioso cerebral (Koch y *col.* 2006).

La retina es una estructura laminada con muchas capas de neuronas interconectadas por sinapsis (Figura 2). Las principales neuronas fotosensibles son las células fotorreceptoras o fotorreceptores. Hay dos tipos de fotorreceptores: los conos y Los bastones. Los bastones (Figura 2, células color violeta) funcionan principalmente en luz tenue y proporcionan visión monocromática, mientras que los conos soportan la visión diurna y la percepción del color (Figura 2, células amarillas). Las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGRifs) son un tercer tipo de fotorreceptor que cumple funciones subconscientes no asociadas a la formación de imágenes como lo son la regulación del reflejo pupilar, la sincronización del reloj biológico, la supresión de melatonina inducida por luz, el sueño, fotofobia, etc.

A pesar de las sofisticadas habilidades visuales que las aves y los primates comparten, el sistema visual de los no-mamíferos amniotas (aves y reptiles) posee algunas diferencias interesantes comparadas con los primates. Las diferencias cualitativas y cuantitativas en el sistema visual de las aves yacen en las particularidades de las estructuras retinales y la organización de su vía visual. Como por ejemplo la retina de las aves posee un mayor número de células ganglionares o la mayor complejidad de las

conexiones intra retinales que le permiten un procesamiento *in situ* mientras que en la retina de los mamíferos este procesamiento se produce en áreas superiores del cerebro.



**Figura 2: esquema del ojo y la retina.** Representación del ojo (panel izquierdo). Se observan las tres principales capas que forman el ojo, la capa más interna es la retina (naranja), la capa intermedia es la coroides (rojo) y finalmente la capa más externa es la esclera (blanco). La capa más interna (naranja) corresponde a la retina. La luz atraviesa la retina hasta llegar a los fotorreceptores bastones (Ba) y conos (Co) los cuales transforman la señal lumínica en una señal electroquímica que atraviesa la retina en sentido contrario hasta llegar a las células ganglionares (G), cuyos axones forman el nervio óptico (verde) el cual proyecta a diferentes áreas del cerebro. EPR= Epitelio Pigmentario Retinal; Co= Conos; Ba= Bastones; H= células Horizontales; Bi= células Bipolares; A= células Amácrinas; M= células gliales de Müller; G= células ganglionares; SE= segmentos externos; CNE = Capa nuclear externa; CPE= capa plexiforme Externa; CNI= capa nuclear interna; CPI= capa plexiforme Interna; CG= capa de células Ganglionares.

## MORFOLOGÍA RETINAL Y PROCESAMIENTO

La estructura retinal básica de los vertebrados es muy similar, usualmente caracterizada por la presencia de cinco principales capas y cinco capas de neuronas (Figura 2, panel derecho). Las cinco capas son la capa nuclear externa (CNE) y la capa plexiforme externa (CPE), la capa nuclear interna (CNI) y plexiforme interna (CPI), y la capa de células ganglionares (CCG).

Como se muestra en la figura 2: los cinco tipos de neuronas retinales se denominan: fotorreceptores (bastones (Ba) y conos (Co), células bipolares (Bi), células horizontales (H), células amácrinas (A) y células ganglionares (G). Los fotorreceptores (bastones y conos), las células bipolares y las células horizontales hacen contacto sináptico entre ellas en la capa plexiforme externa (Figura 2, CPE). Las células Bipolares, las células amácrinas y las células ganglionares hacen contacto en la capa plexiforme interna (Figura 2, CPI).

Más allá de las similitudes básicas con los primates, la retina de aves tiene importantes diferencias en el número, relaciones, distribución y subclases morfológicas de las células retinales y sus respuestas fisiológicas. Por ejemplo la capa nuclear interna de aves es especialmente rica en células horizontales y amácrinas en comparación a los primates. Santiago Ramón y Cajal notó la complejidad de las interconexiones en la retina de aves, él pensó que esto representaba un importante procesamiento dentro de la retina (Schwab y *col.* 2012). Esto puede reflejar una diferencia importante entre los sistemas visuales de primates y aves. Mientras el procesamiento complejo se produce en las zonas más altas del proencéfalo en primates en aves se puede lograr a un nivel inferior, dentro de la misma retina.

## CAPA NUCLEAR EXTERNA-FOTORRECEPTORES: CONOS Y BASTONES

Una célula fotorreceptora es un tipo especializado de neurona que se encuentra en la retina que es capaz de detectar luz. La gran importancia biológica de los fotorreceptores es convertir la luz (radiación electromagnética visible) en señales que pueden estimular determinados procesos biológicos. Para ser más específicos, las proteínas fotorreceptoras, llamadas Opsinas, absorben fotones, lo que provoca un cambio en el potencial de membrana de la célula.

Como se explicó anteriormente, existen tres tipos conocidos de células fotorreceptoras en los ojos de los vertebrados: los bastones, los conos, y las células ganglionares de la retina fotosensibles. Las dos células fotorreceptoras clásicas son los bastones y los conos, cada una contribuye con información utilizada por el sistema visual para formar una representación del mundo visual, la vista. Los bastones son más estrechos que los conos y distribuidos de manera diferente a través de la retina, pero el proceso químico de fototransducción es similar. Una tercera clase de células fotorreceptoras se descubrió durante la década de 2000 (Berson y *col.* 2002), las células ganglionares fotosensibles. Las cuáles serán descritas en mayor profundidad en capítulos posteriores.

Existen grandes diferencias funcionales entre los conos y bastones. Los bastones son muy sensibles y pueden ser activados por un solo fotón. A muy bajos niveles de luz, la experiencia visual se basa únicamente en la señal de los bastones. Esto explica por qué los colores no se pueden ver en bajos niveles de luz: un solo tipo de células fotorreceptoras está activo.

Los Conos requieren luz significativamente más brillante (es decir, un número mayor de fotones) con el fin de producir una señal. En los seres humanos, hay tres tipos diferentes de fotorreceptores conos, que se distinguen por su patrón de respuesta a diferentes longitudes de onda de la luz. La experiencia del color se calcula a partir de estas tres señales distintas, tal vez a través de un proceso oponente. Los conos responden (aproximadamente) a la luz de cortas, medianas y largas longitudes de onda. El disparo de la célula depende sólo del número de fotones absorbidos. Las diferentes respuestas de los tres tipos de células de cono se determinan por las probabilidades de que sus

respectivas proteínas fotorreceptoras absorban fotones de diferentes longitudes de onda. Así, por ejemplo, una célula de cono L contiene una proteína fotorreceptora que absorbe más fácilmente largas longitudes de onda de la luz (es decir, más "rojos"). La luz de una longitud de onda más corta también puede producir la misma respuesta, pero debe ser mucho más brillante para hacerlo.

La retina humana contiene unos 120 millones de bastones y 6 millones de conos. El número y la proporción de bastones-conos varía entre especies, depende de si un animal es principalmente diurno o nocturno. Además, hay cerca de 2,4 millones a 3 millones de células ganglionares (Figura 2, panel central (G)) en el sistema visual humano, los axones de estas células forman los nervios ópticos (Figura 2).

Aunque la retina de aves tiene una naturaleza doble (es decir, que contiene ambos fotorreceptores conos y bastones) similar a la de los primates, también posee (junto con reptiles, peces y anfibios) fotorreceptores conocidos como conos dobles (Schwab y *col.* 2012). De hecho, todas las clases de vertebrados, con la notable excepción de los mamíferos placentarios, poseen dichos conos dobles. El cono doble consiste en un cono principal (similar en estructura a un cono normal) y un cono accesorio que se curva alrededor del segmento interno del cono principal. Los conos dobles probablemente estaban presentes en los Captorhinda (amniotas ancestrales) y posiblemente en los dinosaurios también.

El segmento externo principal y accesorio del cono doble puede contener diferentes pigmentos visuales. La interacción de las señales de los conos con diferentes tipos de pigmentos es crucial para la visión del color. Las señales eléctricas generadas por los conos dobles en respuesta a diferentes longitudes de onda de la luz indican que cada miembro de la pareja tiene fuertes interacciones con el otro. Esto puede ser funcionalmente comparable con el tipo de interacción que se produce en primates, pero en el contexto de los conos individuales en un sistema tricromático puede influir en las células ganglionares de la retina. Por lo tanto, mientras que el procesamiento de color inicial se produce a nivel de las células ganglionares en primates, el sistema visual de aves puede llevar a cabo pasos de procesamiento del color dentro de los propios fotorreceptores (Schwab y *col.* 2012).

Los conos individuales, así como uno o ambos segmentos de conos dobles, también pueden contener una gotita de aceite. Las gotitas de aceite son una característica común de los conos en muchas retinas de vertebrados, pero rara vez se encuentran en los bastones. Estas gotas se componen de lípidos en la que se disuelven los pigmentos carotenoides; pueden aparecer transparente o claro, amarillo claro, verde, naranja o rojo. Se colocan en el extremo distal de los segmentos interno del cono, que abarca todo el ancho del receptor. La luz pasa a través de la gotita antes de entrar en el segmento exterior fotosensible. Las Gotas de aceite de color se supone que han evolucionado a partir de las formas de cono incoloros que se encuentran en otros vertebrados, como el pez celacanto (Bowmaker y *col.* 1991). La evidencia sugiere que las gotitas de aceite están influenciados más rápidamente por la selección natural que las opsinas. Las gotitas de aceite estaban probablemente presentes en la retina del Captorhinda y muy probablemente en los dinosaurios (Schwab y *col.* 2012).

Las aves parecen tener una excelente visión de los colores, que puede estar basado en un máximo de cuatro o cinco fotopigmentos diferentes. Esto contrasta con los tres pigmentos de los conos en los primates. La evidencia de visión tetra- o pentacromática en las aves frente a la tricromacia presente en primates provienen de análisis de las propiedades químicas de los pigmentos visuales y discriminaciones de comportamiento.

#### LA CAPA NUCLEAR INTERNA - CÉLULAS BIPOLARES.

Las células bipolares (Figura 2, panel central, (Bi)) son comunes a todas las retinas de los vertebrados. Las células bipolares de aves, reptiles y anfibios son muy similares, y consisten en dos tipos reconocidos por el anatomista Ramón y Cajal: las células bipolares exteriores (o grandes) e interiores (o pequeñas). Cajal también señaló que la capa plexiforme interna de las aves es muy gruesa en comparación con los demás amniotas. En los mamíferos, las células bipolares tienden a compartir características con peces teleósteos en lugar de reptiles o pájaros, y consisten en tres tipos reconocidos: las células bipolares de bastones, de conos y células bipolares gigantes. Una diferencia importante entre las especies es el grado en el que las células bipolares ramifican en

más de una sublámina de la capa plexiforme interna. Esto podría tener efectos en el procesamiento de objetivos de bajo contraste y fondos, o la capacidad de determinar los cambios de intensidad rápidos a través de la retina.

#### LA CAPA NUCLEAR INTERNA - CÉLULAS HORIZONTALES.

Las células horizontales y amácrinas sirven para mediar en la propagación lateral de la activación visual en la retina. Las células horizontales realizan esta modulación en la capa plexiforme externa (Figura 2, Panel derecho (CPE)). Cajal distinguió dos tipos de células horizontales comunes a las aves y los reptiles, en forma de cepillo y estrelladas. En los mamíferos y anfibios, Cajal distinguió dos clases algo diferentes, las células horizontales interiores y exteriores. El número de células horizontales es en su mayoría consistente en los peces, reptiles, aves y mamíferos. Sin embargo, Cajal observó una correlación de la estructura de bastones y la densidad con el tamaño de las células horizontales. En los mamíferos y peces teleósteos, los bastones son algo delgados y se asocian con células horizontales grandes, mientras que en las aves y reptiles los bastones tienden a estar asociados con células horizontales más pequeñas.

*Fisiológicamente, las células horizontales se pueden dividir en dos tipos generales:*

- 1) Las que hiperpolarizan o despolarizan dependiendo de la longitud de onda estimulante (cromaticidad o tipo C)
- 2) Las que hiperpolarizan para encender independientemente de la longitud de onda (luminosidad o de tipo L)

El tipo C por lo general se encuentra en especies de peces con buena visión de los colores, pero, curiosamente, las células horizontales de aves y mamíferos son del tipo L. La importancia de esta diferencia en los peces frente a los amniotas, que tienen capacidades de color algo comparables, es desconocida. Una posibilidad obvia puede ser que la célula horizontal de tipo C está especializada para responder a las condiciones espectrales únicas para el medio ambiente bajo el agua.



## LA CAPA NUCLEAR INTERNA - CÉLULAS AMÁCRINAS.

Las Células amácrinas funcionan de manera similar a las células horizontales en la transferencia de información lateralmente a través de la retina. Hay más de 20 tipos morfológicos de células amácrinas, que utilizan al menos ocho diferentes neurotransmisores. Las células amácrinas también dan forma a los complejos campos receptivos observado en algunas células ganglionares. Se encuentran en una posición para modular las señales antagónicas generadas por las células bipolares hacia el campo receptivo que rodea a las células ganglionares. La complejidad de los campos receptivos de las células ganglionares por lo general se correlaciona con la cantidad de conexiones con las células amácrinas. Las células ganglionares ON-OFF de la retina con selectividad direccional reciben el aporte de células amácrinas (Dowling 1990). Las células amácrinas poseen muy diversas formas entre los amniotas e incluso dentro de los miembros de la misma especie. Además, hay variaciones regionales en la densidad de células amácrinas.

## CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES – CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Las células ganglionares de la retina (CGR) son un tipo de neuronas situado cerca de la superficie interior (la capa de células ganglionares) de la retina. Reciben información visual de los fotorreceptores a través de dos tipos de interneuronas: las células bipolares y las células amácrinas de la retina. Las células ganglionares colectivamente transmiten información visual formadora de imágenes y no formadora de imágenes (funciones reflejas subconscientes) desde la retina en forma de potencial de acción a varias regiones en el tálamo, hipotálamo, mesencéfalo y, o cerebro medio.

Las células ganglionares de la retina varían significativamente en términos de su tamaño, las conexiones y las respuestas a la estimulación visual, pero todos comparten la característica de tener un largo axón que se extiende hacia el cerebro. Estos axones forman el nervio óptico, quiasma óptico, y el tracto óptico.

Un pequeño porcentaje de las células ganglionares de la retina son fotosensibles, sus axones forman el tracto retino-hipotalámico y contribuyen a la sincronización de los ritmos circadianos y el reflejo pupilar a la luz, el cambio de tamaño de la pupila y otras funciones (Foster y *col.* 1991, Moore 1996, Dacey y *col.* 2005, Guido y *col.* 2010, Schmidt y *col.* 2014).

Existen grandes diferencias en el número, los tipos y la distribución de células ganglionares de la retina (CGR) entre las aves y primates. Hay 1 millón de CGR en mono rhesus y el hombre en comparación con los 2 millones o más en el pollo, la paloma y la codorniz. En general, los animales nocturnos y peces de aguas profundas tienden a tener menores cantidades de células ganglionares, y en otros organismos el número de células ganglionares se correlaciona bien con el número de conos presentes en su retina. La gran variación observada en las CGR las hace difíciles de clasificar. Las CGR en las aves poseen campos receptivos muy complejos.

En general, existe una correlación inversa entre la supuesta complejidad del análisis visual que ocurren en la capa CGR y la importancia de la corteza visual. Se ha sugerido que la complejidad de los campos receptivos de CGR está relacionada con el grado de procesamiento binocular en el animal.

La distribución de las CGR difiere ampliamente entre los organismos. La alta densidad de empaquetamiento de las CGR es típicamente correlacionada con altas densidades de sus conos asociados. Estas densidades, a su vez, se supone que se equiparan con las zonas de alta agudeza visual para el organismo. Estas áreas son sitios en la retina en la que los conos se agrupan más densamente a expensas de los bastones. Las áreas bien pueden ser circulares (un área central) o alargadas (una raya visual). Debido a la típica relación de 1: 1 de los conos con las células ganglionares, la densidad de conos y células asociadas en áreas altamente desarrolladas como las de las aves diurnas, lagartos, y primates, causaría un gran abultamiento de la capa retinal. Este abultamiento no se produce debido al desarrollo de una depresión dentro de la zona, denominada fovea, que está formada por el desplazamiento lateral de las neuronas y fibras proximales (Figura 2). La fovea tiende a ser más pronunciada y más profunda en las aves diurnas en comparación con los primates (incluidos los humanos).

## Opsinas y fototransducción

Con el fin de entender cómo los componentes moleculares que nos permiten percibir la luz y transformar esa luz en señales eléctricas, primero tenemos que entender la maquinaria molecular que funciona en los fotorreceptores.

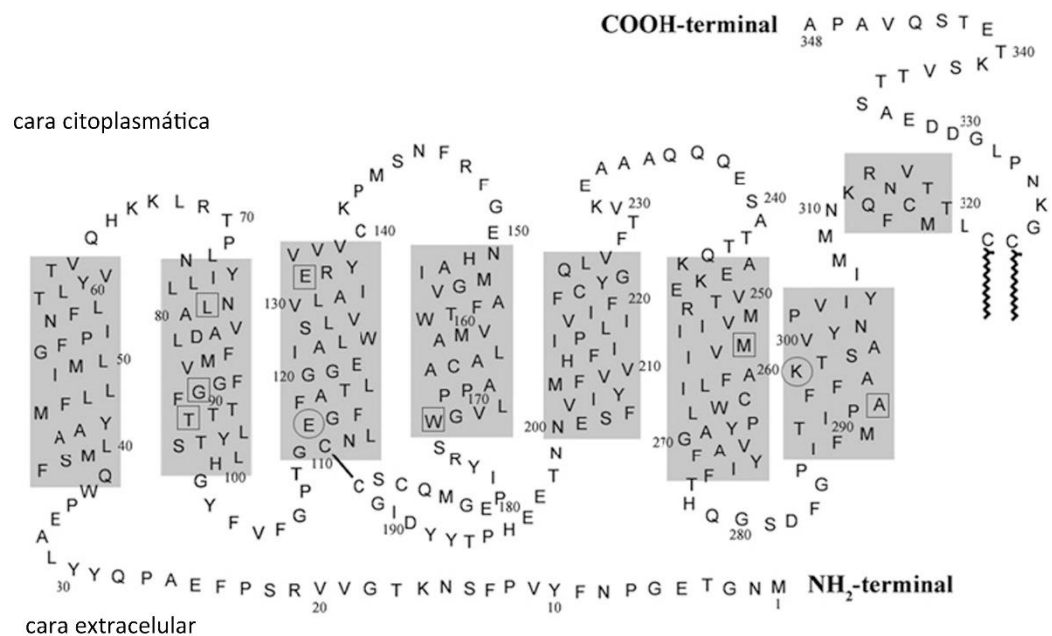
Las Opsinas son miembros de la superfamilia de proteínas conocida como Receptores acoplados a proteína-G (GPCR por sus siglas en inglés). Los GPCR se caracterizan por su estructura con siete pasos transmembranas (figura 3) y por su capacidad para activar una proteína unida a GTP (proteína-G). En vertebrados la familia de GPCR es una de las más grandes y diversas familias de proteínas con miles de miembros predichos en muchos genomas de vertebrados (Hur y *col.* 2002). Las funciones de los GPCR van desde la detección de hormonas y neurotransmisores a receptores sensoriales como receptores visuales, olfatorios y gustatorios. Mucho de lo conocido acerca de los GPCR es a través del estudio de las Opsinas.

Las Opsinas se caracterizan por su habilidad para unir un cromóforo basado en retinal para formar un fotopigmento sensible a la luz (Figura 4). En la retina de vertebrados podemos encontrar muchos tipos de familias de Opsinas encargadas de funciones visuales formadoras y no-formadoras de imágenes.

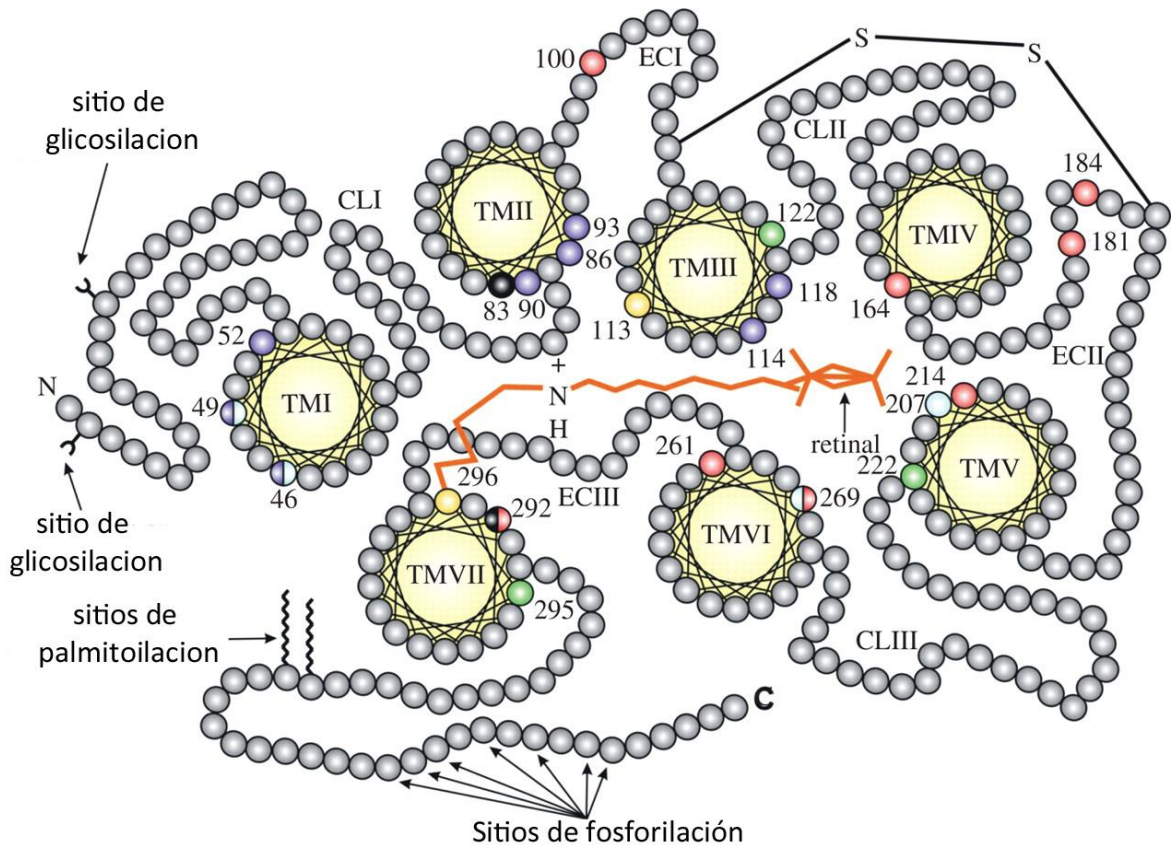
Los GPCR son una familia de proteínas difícil de estudiar estructuralmente debido a las grandes cantidades requeridas y a la escasa cantidad de proteína en estado nativo que se obtienen luego de ser extraída de la membrana plasmática. Como resultado de esto la única opsina de vertebrados cristalizada es la rodopsina bovina (Palczewski y *col.* 2000). Esta estructura se fue perfeccionando con los años (Teller y *col.* 2001), proveyendo de un entendimiento detallado de la estructura de rodopsina en oscuridad y un molde o templado para el modelado de otras Opsinas por homología (Stenkamp y *col.* 2002).

Como todos los GPCR, las Opsinas contienen siete hélices transmembranas (Figura 3). Sin embargo, estas son una clase única de GPCR ya que las Opsinas tienen unido covalentemente su ligando. Como anteriormente se mencionó, este ligando es un cromóforo basado en el retinal y forman un pigmento sensible a la luz (Figura 4). El sitio

de unión del retinal está altamente conservado en todas las Opsinas y se encuentra cercano a la lisina 296 (K296) en la séptima hélice transmembrana(Bownds 1967, Wang y col. 1980). El grupo aldehído en el cromóforo sufre una reacción de condensación con el grupo amino- $\xi$  de K296 para formar una unión covalente de Schiff. La mayoría de los pigmentos de vertebrados utiliza 11 cis retinal (vitamina A1) sin embargo algunos reptiles, peces y anfibios utilizan 11 cis 3-4 dehidroretinal (vitamina A2).

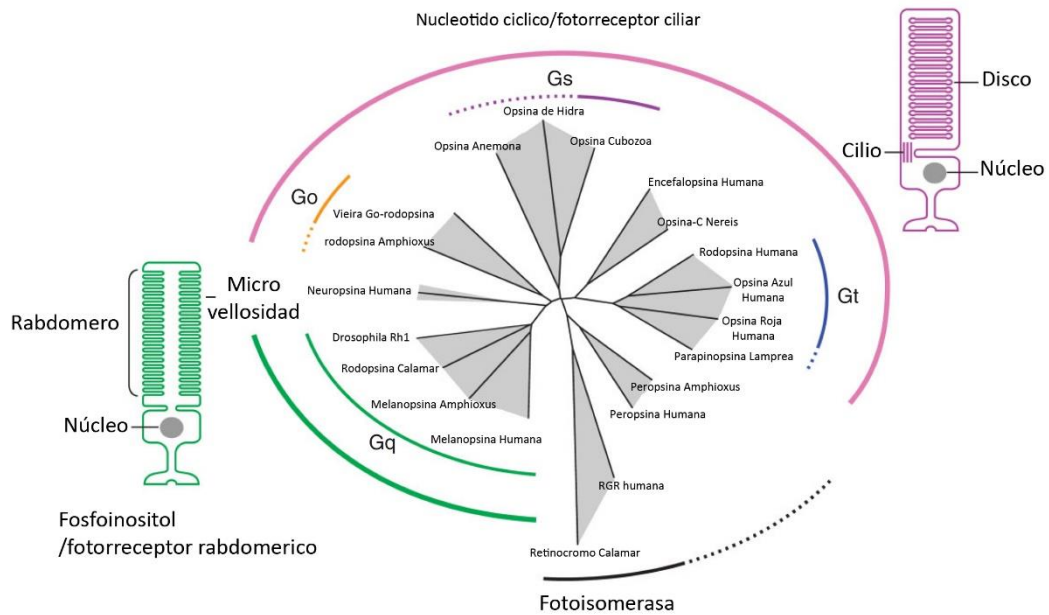


**Figura 3: Representación de una opsin.** Las Opsinas son proteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G que poseen características en común, entre ellas 7 pasos transmembrana (recuadros grises) y un residuo lisina que une un cromóforo derivado de vitamina A (11 cis retinal) (K260). Adaptado de Reeves y col. 1999.



**Figura 4: Características de una opsinina.** Esquema de una opsinina mostrando el arreglo de hélices alrededor del cromóforo retinal (estructura naranja). La numeración está basada en la secuencia de rodopsina. La lisina 296 (Amarillo) es el sitio de unión a retinal, y glutamato 113 (Amarillo) proporciona el contraión. Las variaciones en la secuencia aminoacídica determinan la sensibilidad al color, estas variaciones están representadas por diferentes colores: LWS, rojo; RH2, verde; SWS2, azul; SWS1, violeta; RH1, negro. Colores divididos indican sitios involucrados en la sintonía de más de una opsinina. Nótese que estas modificaciones tienden a agruparse alrededor del anillo del retinal. TM, transmembrana; CL, loop citoplasmático; EC, loop extracelular. Imagen adaptada de (Hunt y col. 2009)

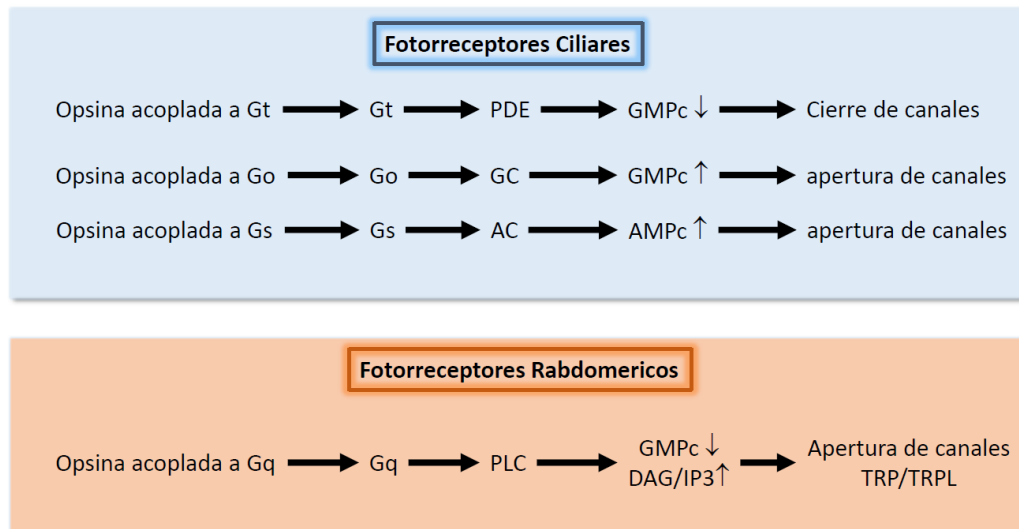
Se han identificado más de 2000 opsinas (Porter y col. 2012) por lo tanto se las clasifican en por lo menos ocho grupos basados en la similitud de sus secuencias aminoacídicas: siete grupos de Opsinas de bilaterias (Opsinas acopladas a Gt, encefalopsina/opsina-TMT, Opsinas acoplada a Gq, Opsinas acoplada a Go, neuropsina, Peropsina y el grupo de fotoisomerasas) y un grupo de Opsinas de Cnidarios (Opsinas acopladas a Gs) (Koyanagi y col. 2008a) (Figura 5).



**Figura 5: Relación filogenética entre opsinas y las cascadas de fototransducción.** El árbol filogenético sin raíz fue tomado y modificado de ((Koyanagi y *col.* 2008a). Este árbol separa las diferentes opsina según el tipo las vías de señalización (nucleótidos cíclicos o fosfoinositidos), clase de proteína G que activa (Gt, Gq, Go, Gs, etc).

Una señal lumínica capturada por una opsina es transmitida por una secuencia de reacciones bioquímicas compuestas por una proteína G, una enzima efectora y un canal iónico y que llega a respuestas celulares electrofisiológicas. Existe una relación funcional y evolutiva entre la cascada de fototransducción y el tipo de célula fotorreceptora, las cuales se pueden distinguir por sus características morfológicas de la porción fotorreceptora de la célula, denominándolas células ciliares o rabdoméricas (Figura 5). Los pigmentos visuales de vertebrados, los cuales son pigmentos en Opsinas acopladas a Gt, se encuentran en los conos y bastones y activan transducina (Gt), la cual a su vez activa una fosfodiesteras que hidroliza GMPc a 5'GMP (Figura 6). La disminución de GMPc en los fotorreceptores resulta en el cierre de canales catiónicos gatillados por nucleótidos cíclicos y llevan a una hiperpolarización de la célula (Yau y *col.* 2009). Las Opsinas acopladas a Go fueron descubiertas en los fotorreceptores de vieira y anfioxo (Kojima y *col.* 1997, Koyanagi y *col.* 2002). En las células ciliares de vieira la opsina acoplada a Go activan la proteína Go y subsecuentemente elevan los niveles de GMPc en la célula fotorreceptora para abrir los canales. En las células ciliares visuales de la

medusa cubozoa, uno de los animales más primitivos que han desarrollado ojos, la opsina acoplada a proteína G activa una proteína Gs (estimuladora), la cual activa la enzima adenilato ciclasa y elevan los niveles de AMPc (Koyanagi y col. 2008a).



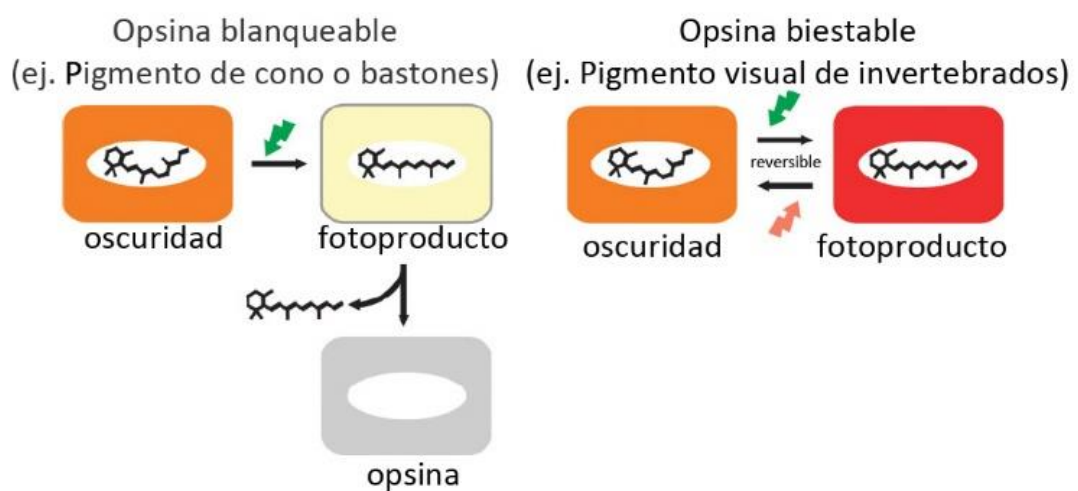
**Figura 6: Cascadas de fototransducción en animales.** En la retinas de animales se pueden distinguir dos principales cascadas de fototransducción, aquella que implica nucleótidos cíclicos **panel superior**. Esta vía se suele asociar a fotorreceptores ciliares. Mientras que existe otra cascada la cual está asociada a la activación de fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinositidos y se encuentra principalmente en fotorreceptores rabdoméricos **panel inferior**. PDE= fosfodiesterasa, GC= guanilato ciclasa, AC= adenilato ciclasa, PLC = fosfolipasa C, DAG= diacil glicerol, Inositol tri fosfato, TRP/TRPL= receptor de potencial transitorio.

Por otro lado las Opsinas acopladas a Gq utilizan una cascada de fototransducción ligada a fosfatidilinositol y no nucleótidos cíclicos (Koyanagi y col. 2008b). Las células visuales de moluscos y artrópodos, son típicas células fotorreceptoras rabdoméricas con microvellosidades. Las Opsinas acopladas a Gq activan una proteína Gq, la cual activa una fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilinositol 4,5 –bifosfato (PIP2) a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) para activar la vía de fosfoinositol. Esta cascada conlleva a la despolarización de las células rabdoméricas. En *Drosophila*, la depleción de PIP2 resulta en la apertura de los canales receptores de potencial transitorio



(TRP)/símil receptor de potencial transitorio (TRPL) para generar una respuesta despolarizante (Huang y col. 2010).

Gran cantidad de evidencia experimental revela que los grupos de Opsinas Gq, Opsinas Go, Peropsina y neuropsina contienen un pigmento “biestable” que tiene dos estados estables. Un estado oscuro y un fotoproducto que revierte a su estado oscuro original por una subsecuente absorción de luz (fig).(Koyanagi y col. 2008b, Tsukamoto y col. 2010).



**Figura 7: fotoquímica del cromóforo de los fotopigmentos.** Entre las diversas clasificaciones de las Opsinas se las puede clasificar según la estabilidad del cromóforo unido. Por un lado tenemos las opsina blanqueables o monoestables las cuales prepondera un isómero de retinal, por ejemplo las Opsinas de bastones en oscuridad unen 11 cis retinal y en luz se isomeriza a all trans retinal el cual no es estable y se libera de su parte proteica. Por otro lado tenemos a las Opsinas biestables, las cuales en condiciones de luz presentan un equilibrio entre los isómeros pudiendo reisomerizar el retinal a su estado basal utilizando una longitud de onda de menor energía.

El pigmento no-visual de vertebrado, parapinopsina, muestra características de una opsina biestable, sin embargo este pigmento se encuentra dentro del grupo de Opsinas acoplado a Gt, proteína G presente los pigmentos visuales de vertebrados con propiedades “blanqueables” (el fotoproducto del pigmento visual libera el cromóforo retinal y se blanquea) (Figura 7).



Como previamente se mencionó, en los pigmentos basados en opsina, el cromóforo retinal se une a un residuo lisina en la posición 296 por medio de una base protonada de Schiff. Un contraion, un residuo aminoacídico negativamente cargado, estabiliza la base protonada de Schiff y es esencial para la absorción de la luz por parte del pigmento visual. La ubicación de este contraion varía entre pigmentos blanqueables y biestables. Los pigmentos visuales de vertebrados con características de pigmento blanqueable (ej. Opsina de los conos y bastones) poseen un ácido glutámico como contraion en la posición 113 (Glu113) en la tercera hélice (Sakmar *y col.* 1989). Sin embargo en la mayoría de los pigmentos biestables, el residuo Glu181 en el loop que conecta la cuarta y quinta hélice actúa como contraion (Terakita *y col.* 2000, Terakita *y col.* 2004). La diferencia en la posición del contraion sugiere que el desplazamiento desde la posición Glu181 a la posición Glu113 ocurrió durante la evolución de los pigmentos visuales de vertebrados y promovió la propiedad de blanqueo.

## Fotoquímica de los pigmentos visuales

Como previamente se mencionó el cromóforo que proporciona fotosensibilidad a los pigmentos visuales es un derivado de la vitamina A o retinaldehído. La importancia de la vitamina A (todo trans o all trans retinol) se conoce desde el antiguo Egipto (Wolf 2001) donde ciertas enfermedades visuales podían ser curadas mediante la ingestión de hígado. Uno de los síntomas de la deficiencia de vitamina A es la ceguera nocturna o nyctalopia (del griego *nycta=noche* y *alao=ceguera*) descrita por el mismo Hipócrates. En 1913 McCollum demostró que el “factor A soluble en grasa” era esencial para el desarrollo de roedores, este factor era obtenido a partir de hígado o extracto de hígado. Fue George Wald quien demostró que los derivados de vitamina A constituían la base química de nuestra visión (Wald 1968a), esta contribución le valdría el premio Nobel en 1967.

Los derivados de la vitamina A o retinoides actúan en el organismo a través de dos metabolitos. Por medio de la acción de enzimas, la vitamina A o all trans retinol es oxidado para producir ácido retinoico el cual se une a receptores nucleares para

regular la expresión de genes. El otro metabolito es el aldehído de retinol o all trans retinal, este se isomeriza para dar 11 cis retinal el cual se une a Opsinas para dar un fotorreceptor funcional.

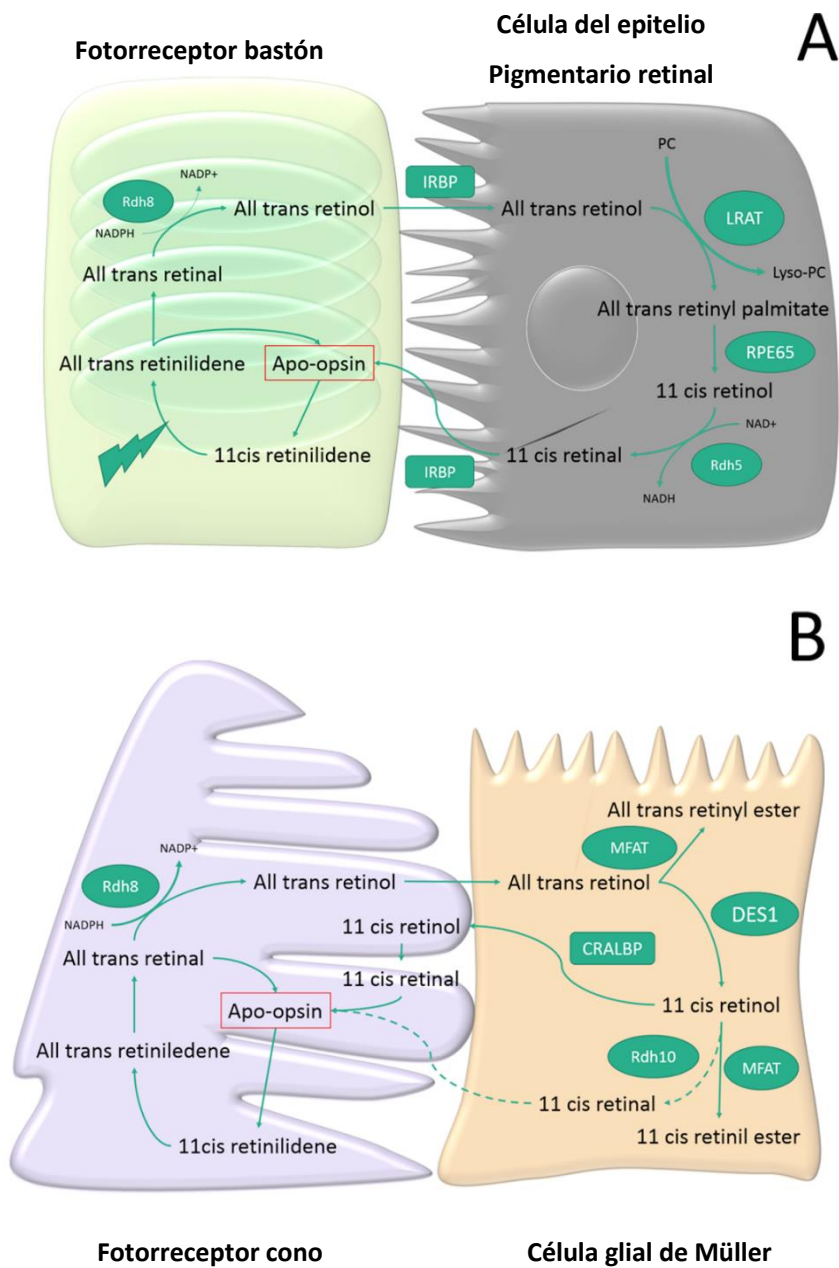
Las propiedades espectroscópicas de estos compuestos se deben a su sistema de dobles enlaces conjugados. Los electrones  $\pi$  móviles se deslocalizan a lo largo de toda la molécula resultando en una estabilización del compuesto por resonancia. Debido a su gran cantidad de dobles enlaces estas moléculas presentan una estructura planar, siendo más estable su conformación *all trans*. Alternativamente otros isómeros geométricos introducen algunos impedimentos estéricos que incrementan la energía de conformación en comparación al isómero *all trans*. Aunque algunos isómeros introducen un moderado colapso estérico (ej. 9 cis retinal y 13 cis retinal) otros isómeros como el 11 cis retinal o el 7 cis retinal son un claro ejemplo de un severo impedimento estérico en el cual la estructura planar no puede ser mantenida. Debido a este alto impedimento estérico la formación del isómero 11 cis retinal no es eficiente en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad. La isomerización Cis/trans solo se lleva a cabo de reacciones químicas que implica la utilización de luz o a través de altas intensidades de luz en solventes como etanol o hexano. Debido a estas propiedades de los retinales las células han desarrollado dos mecanismos para isomerizar el isómero trans a cis. Como anteriormente se mencionó las Opsinas de los fotorreceptores rabinómicos utilizan luz de una longitud de onda más larga para volver a su estado basal en un proceso conocido como fotoisomerización o biestabilidad; las Opsinas de los vertebrados o ciliares son incapaces de fotoisomerizar el all trans retinal por lo cual utilizan una regeneración bioquímica llamado "ciclo visual".

## REGENERACIÓN DEL CROMÓFORO DE FOTOPIGMENTOS DE VERTEBRADOS: CICLO VISUAL

Como antes se mencionó, las Opsinas de vertebrados perdieron la capacidad de regenerar su cromóforo a través de un mecanismo de fotoisomerización como lo hacen las opsinas de invertebrados (Tsukamoto y *col.* 2010). Debido a la carencia de este mecanismo otro tipo celular se adaptó para suplir esta carencia; en el caso de los vertebrados estas células son las células del epitelio pigmentario retinal o EPR, por sus siglas en inglés. Estas células desarrollaron un mecanismo independiente de la luz el cual se vale de enzimas que isomerizan all trans retinal a isómero 11 cis retinal a través de múltiples pasos enzimáticos. George Wald, descubrió que el pigmento que le daba color a la retina era un derivado de vitamina A: el 11 cis retinal. A su vez este pigmento en contacto con la luz se isomerizaba a una conformación trans y se liberaba de su opsina. Wald nombró a este proceso como “ciclo retinoide” o “ciclo visual” (Wald 1968a). Tiempo después Dowling, un estudiante de Wald, determinó el flujo de retinoides entre los fotorreceptores y EPR en condiciones de luz y oscuridad. Dowling estableció que el retinal liberado por los fotorreceptores en luz era rápidamente tomado por el EPR y esterificado. Durante la fase de oscuridad ocurre de manera inversa, desde el EPR hacia el fotorreceptor para regenerar rodopsina. Este descubrimiento definió el rol determinante del epitelio pigmentario en el ciclo visual (Dowling 1960).

Hoy en día se tiene un panorama más claro acerca del ciclo visual, conociéndose la mayoría de los pasos enzimáticos implicados en la regeneración de pigmento visual. Como previamente se mencionó, el ciclo visual comienza con la isomerización del retinal dentro del fotorreceptor desde su isómero 11 cis al isómero all trans. Esta isomerización provoca que el cromóforo se libere de su apopsina o parte proteica, debido que los retinales son moléculas reactivas estas son reducidas a all trans retinol por una retinol deshidrogenasa (RDH). El retinol no puede viajar libre dentro de la célula así que es capturado por una proteína unidora de retinoide (IRBP) la cual facilita el transporte de retinoides entre los fotorreceptores y el EPR. Dentro del EPR, el all trans retinol se une a una nueva proteína transportadora que lo llevara al retículo endoplásmico liso (CRBP), sitio donde se encuentra la maquinaria enzimática que llevará a cabo la

reisomerización. El all trans retinol es esterificado por una retinol acil transferasa (LRAT). Este punto es clave para la producción de 11 cis retinal, ya que el all trans retinil ester formado es el sustrato de la principal enzima del ciclo visual: RPE65. Esta enzima microsomal específica de EPR con un peso molecular aproximado de 65 KDa (Hamel y *col.* 1993) fue descrita en los 90s. Los ratones carentes de RPE65 (RPE65<sup>-/-</sup>) presentan una temprana ceguera debido a la total carencia de 11 cis retinal y la acumulación de all trans retinil ésteres (Redmond y *col.* 1998). Sumado a que mutaciones de esta proteína generan ceguera en humanos, se estableció el rol fundamental de RPE65 en el ciclo visual. RPE65 se expresa en el retículo endoplásmico liso junto a otras enzimas implicadas en el ciclo visual con las cuales posiblemente formen un complejo que facilite el proceso de isomerización. RPE65 es considerada una isomerohidrolasa, ya que posee la capacidad de hidrolizar el all trans retinil ester e isomerizar su producto para dar como resultado 11 cis retinol. Finalmente el producto formado por RPE65 es oxidado por otra RDH para dar 11 cis retinal, el cual es transportado a los fotorreceptores para unirse a su apopsina y completar el ciclo visual (ver figura 8).



**Figura 8: Regeneración del 11 cis retinal en retina de vertebrados. A** Ciclo visual canónico presente en los fotorreptores bastones donde las enzimas claves se encuentran en EPR. **B** Ciclo visual alternativo presente en los fotorreceptores conos, este se llevaría a cabo en células gliales de Müller.

## REGENERACIÓN DEL CROMÓFORO EN CONOS DE VERTEBRADOS

Sumado al ciclo visual anteriormente mencionado, gran cantidad de evidencia indica que los conos poseerían una fuente de pigmentos visuales diferente a la utilizada por los bastones (Wang y *col.* 2011b). Por ejemplo, los bastones se blanquean 10 veces más rápido que los conos y además los conos funcionan en condiciones de luz brillante sin saturarse. Por otra parte las retinas con mayor porcentaje de conos poseen mayor cantidad de 11 cis retinil ésteres que aquellas con dominancia de bastones (Rodríguez y *col.* 1989). Por su parte la retina neural de pollo posee la capacidad de general 11 cis retinol a partir de all trans retinol (Mata y *col.* 2002) y los cultivos de células de Müller sintetizan 11 cis retinol a partir de all trans retinol (Das y *col.* 1992). Finalmente se describió una proteína expresada en células de Müller que posee la capacidad de isomerizar el all trans retinol para formar 11 cis retinol. Esta enzima llamada dihidroceramida desaturasa-1 (DES-1) fue descrita en principio como una esfingolípido desaturasa es capaz de sintetizar 9, 13 cis mayoritariamente y en menor medida 11 cis retinol (Kaylor y *col.* 2013). A pesar de eso en combinación con la O-acil transferasa multifuncional (MFAT), DES-1 es capaz de producir grandes cantidades de 11 cis retinil palmitato (Kaylor y *col.* 2014). Basándose en la evidencia encontrada se planteó la existencia de un ciclo visual alternativo exclusivo de conos el cual utiliza all trans retinol como sustrato para formar 11 cis retinol a diferencia del ciclo visual establecido por Wald y Dowling el cual utiliza retinil ésteres como sustrato para formar 11 cis retinal. Este ciclo visual se describe en la figura 8.

## Melanopsina y las Funciones no-visuales de la retina

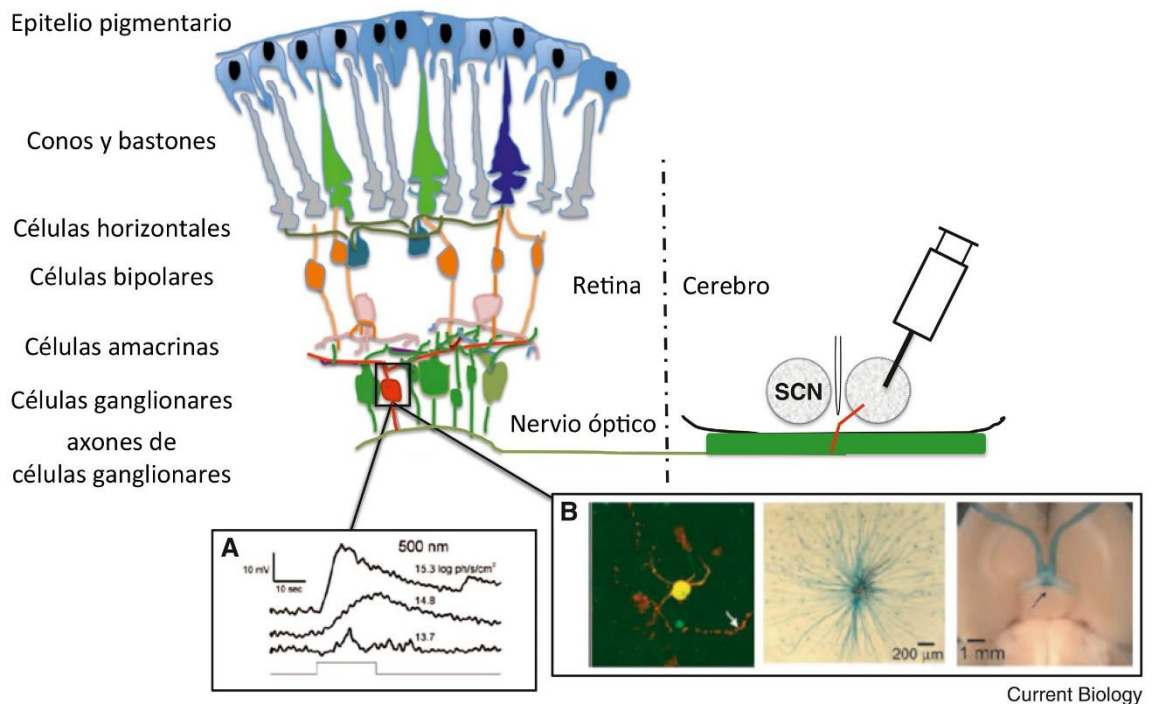
La retina cumple diversas funciones entre ellas la más notoria es la detección de luz para la formación de imágenes del mundo que nos rodea. La retina cumple con otras funciones inconscientes denominadas funciones visuales no formadora de imágenes (NIF) como por ejemplo regular la cantidad de luz que ingresa al ojo por medio del reflejo pupilar, regulación de la síntesis de melatonina, sincronización del reloj biológico interno, etc (Guido y *col.* 2010).

Desde el comienzo se creía que las células fotorreceptoras visuales clásicas eran las únicas células encargadas de detectar luz en la retina para cumplir tanto las funciones formadoras de imágenes como las no formadoras de imágenes. En 1924 Clyde Keeler, un estudiante recién graduado, describió una cepa de ratones ciegos (Keeler 1924). Estos ratones carentes de conos y bastones (los cuales nombró *Rodless* o carentes de bastones y tiempos después denominados RD por Degeneración de la Retina) sufrían de una enfermedad hereditaria mono alélica similar a la retinitis pigmentosa en humanos. Tiempo después notó que estos ratones mantenían su respuesta pupilar ante un estímulo lumínico (Keeler 1927). Por lo cual Keeler hipotetizó que debido a la falta de fotorreceptores la única manera de sensar la luz era por medio de la absorción de luz por las células pigmentarias o por estímulo directo de la capa nuclear interna o las células ganglionares.

Esta cepa de ratones fue ampliamente utilizada como modelo de ceguera (Han y col. 2013), pero la pregunta sobre el tipo celular encargado de detectar la luz permaneció pendiente por 60 años más. En los años 80 el grupo encabezado por Ebihara y Tsuji demostró que ratones con una degeneración de la retina similar a la descrita por Keeler detectaban luz para sincronizar su reloj biológico (Ebihara y col. 1980) y a su vez esta fotopercepción resultaba independiente de los bastones y posiblemente de los conos postulando la existencia de otros fotorreceptores diferentes de conos y bastones. Por otra parte Foster y col. confirmaron el resultado anterior utilizando animales con una mayor degeneración de la retina. En estas retinas totalmente carentes de fotorreceptores se demostró la presencia de 11 cis retinal lo cual indicaba la presencia de un pigmento basado en opsina retinal (Foster y col. 1991). Otra función no formadora de imágenes observada fue la inhibición aguda de la síntesis de melatonina por un estímulo lumínico (Rollag y col. 1976). En ratones carentes de fotorreceptores visuales el efecto de la luz sobre la síntesis de melanopsina se mantuvo (Lucas y col. 1999).

La identidad de estos fotorreceptores no visuales se descubrió cuando Berson y col. encontraron que un pequeño grupo de células ganglionares que proyectaban al área central del cerebro encargada de comandar los ritmos circadianos en mamíferos (Berson y col. 2002) (Figura 9). Esta área ubicada en el hipotálamo, llamada núcleo supraquiasmático (SCN) recibía proyección de un pequeño grupo de células

ganglionares. A su vez estas células ganglionares poseían la capacidad de responder a la luz intrínsecamente, debido a esta característica se las denominó células ganglionares intrínsecamente fotosensibles o CGRif.



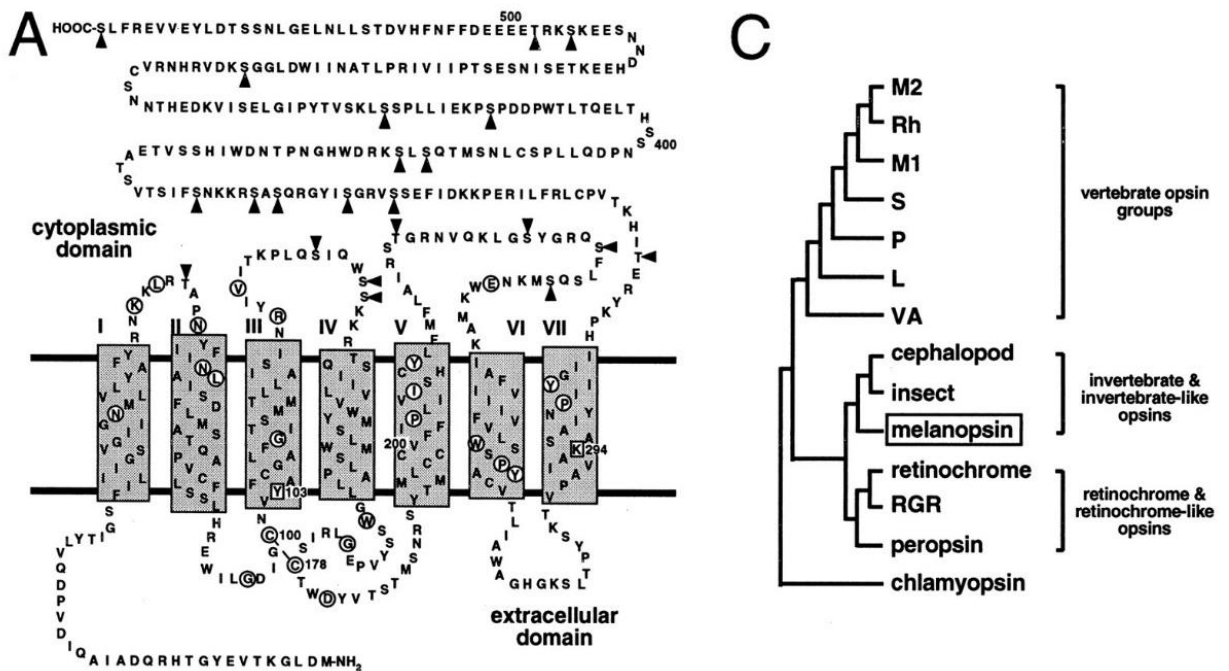
**Figura 9: Descubrimiento de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGRifs).** Las CGRifs se descubrieron por medio de marcación retrograda inyectando el núcleo supraquiasmático (SCN), lugar donde proyectan las células ganglionares. **A** Las células marcadas con el trazador demostraron ser intrínsecamente fotosensibles cambiando la polaridad de la membrana ante un estímulo lumínico. **B** Estas células que proyectan al SCN a su vez expresan el fotorpigmento melanopsina el cual se encuentra marcado en azul.

¿Qué fotorpigmento le permitía a las células ganglionares detectar luz? En ese entonces se había descrito una gran variedad de pigmentos dentro de la retina entre ellos se encontraba la Melanopsina. La Melanopsina u opsina 4 (opn4) fue descrita por primera vez por Provencio y col. (Provencio y col. 1998) en melanóforos de *xenopus Laevis* y es un pigmento basado en una opsina. Posee siete pasos o hélices transmembranas y un sitio putativo para la unión de retinal residuo (Lys294) y comparte homología con otras Opsinas, mayoritariamente Opsinas de invertebrados. La localización de melanopsina no solo se limitaba a melanóforos, sino que también se encontró expresión de cerebro,



núcleo supraquiasmático y retina, más específicamente en la retina interna. Esta opsina también se expresa en retina de simios, humanos y ratones (Provencio y col. 2000). A diferencia de *Xenopus* la expresión de melanopsina se circunscribía a un grupo de células en la capa de células ganglionares.

Ya en el reporte de Berson se proponía a melanopsina como el principal candidato para ser la opsina encargada de la fotopercepción de las CGRifs, a la par de este trabajo Hattar y col. demostraron que las CGRifs expresaban melanopsina y a su vez las CGRif/opn4+ proyectaban no solo al SCN sino también a diversas áreas del cerebro entre ellas al núcleo olivar pretecal (OPN) el cual es el principal núcleo involucrado en el reflejo pupilar (Hattar y col. 2002) y otras áreas (Figura 9 B).



**Figura 10:** Descripción de melanopsina (Opn4). A representación de la secuencia aminoacídica de melanopsina con sus 7 pasos transmembrana y su sitio de unión a retinal (K294). C Árbol filogénico de opsina donde melanopsina se encuentra muy cerca de las Opsinas de invertebrados. Imagen tomada de (Provencio y col. 1998)

La confirmación de la función de Melanopsina como el pigmento involucrado en la fotopercepción llegó por medio de la generación de Ratones *KnockOut (KO)* para melanopsina. Estos ratones carentes de melanopsina no presentaban diferencias

respecto a los “tipo salvaje” (WT) en cuanto a la morfología de la retina y la funcionalidad asociada a la formación de imágenes. Sin embargo la capacidad para detectar luz para ajustar el reloj biológico se vio muy afectada (Panda y col. 2002), a su vez su también se vio afectado el reflejo pupilar a altas intensidades de luz (Lucas y col. 2003). A pesar de carecer de *Opn4* estos animales mantenían sus funciones visuales y no visuales, esto se debía a la presencia de los fotorreceptores conos y bastones, los cuales detectaban luz y a través de las células bipolares estimulaban a las células ganglionares. El resultado que finalmente determinó la participación de melanopsina en las funciones visuales no formadoras de imágenes llegó cuando se cruzó ratones con degeneración retiniana, otrora los ratones de Keeler, con ratones KO para melanopsina. Como previamente se mencionó los ratones RD mantenían sus funciones NFI en cambio los ratones triple KO (RD/*Opn4* -/-) perdían completamente sus funciones formadoras de imágenes y NFI (Hattar y col. 2003, Panda y col. 2003). De este modo se demostró definitivamente que las células ganglionares que expresaban melanopsina eran los fotorreceptores de la retina interna que hipotetizó Keeler en 1928.

## CARACTERÍSTICAS DEL FOTOPIGMENTO MELANOPSINA

La Melanopsina es una proteína que se encuentra dentro de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Posee las principales características de un pigmento Opsina: siete hélices transmembrana, un sitio putativo de unión a retinal (Lys 294) el cual es muy cercano al descrito para rodopsina (Lys 296) y su secuencia de aminoácidos posee una gran homología con Opsinas de invertebrados (Provencio y col. 1998). Uno de los puntos principales de investigación de melanopsina se centró en la fotoquímica de este fotopigmento, sobre todo el tipo de cromóforo utilizado por el mismo. Melanopsina posee una homología del 39% y 32% con la rodopsina de calamar y de mosca respectivamente. Otra característica que comparte con las Opsinas de invertebrados es la presencia de un residuo tirosina en la posición 103 (Tyr103) en la tercera hélice transmembrana, este residuo Tyr correspondería al residuo Glu113 presente en rodopsina bovina el cual funciona como contraion para estabilizar la base protonada de Schiff. Tyr103 no podría actuar como un contraion por lo tanto

melanopsina utilizaría un contraion más similar a Glu181, una característica típica de Opsinas biestables de invertebrados.

Existen diversos reportes acerca del máximo de absorción de melanopsina. Debido a la muy baja expresión de Melanopsina en la retina (menos del 2% de las células ganglionares de ratón) (Hattar y col. 2002) los primeros reportes acerca de la fotoquímica de melanopsina fueron estudios indirectos sobre la respuesta fisiológica de animales o células. Berson y col. determinaron que las CGRif poseen un máximo de absorción cercano 484 nm (Berson y col. 2002) el cual ajusta con una opsina que utiliza retinal A1. Newman y col. lograron expresar Melanopsina por primera vez en células COS y analizaron el máximo de absorción de la proteína purificada, encontrando un máximo de absorción entre 420-440 nm (Newman y col. 2003). Este resultado discrepó de lo previamente obtenido en los espectros de acción. Tiempo después se demostró que el medio en el cual se purifica Melanopsina altera la absorción de la opsina y que este resultado es alterado por el tipo de detergente utilizado (Matsuyama y col. 2012). Tiempo después se logró expresar exitosamente Melanopsina en líneas celulares mamíferas, la expresión de Opn4 tanto en células Neuro2a (Melyan y col. 2005), Hek293 (Qiu y col. 2005) y oocitos de *Xenopus* (Panda y col. 2005) confería fotosensibilidad a estas células. Los máximos de acción obtenidos en los trabajos anteriores fueron cercanos a 480 nm lo cual es más cercano a lo obtenido por Berson y col. Por medio de la purificación de melanopsina obtenida de retinas de ratón finalmente se demostró que melanopsina endógena posee un máximo de absorción a 480 nm y a su vez melanopsina está unida a retinal (Walker y col. 2008).

Una pregunta pendiente es sobre el cromóforo de melanopsina y su regeneración. Como previamente se explicó, las Opsinas de vertebrados (ej. Opsinas de conos y bastones) requieren de células accesorias para transformar el all trans retinal en 11 cis retinal para volver funcional a las Opsinas mientras que las Opsinas de invertebrados (ej. Rodopsina de *Drosophila* y calamar) son capaces de isomerizar all trans retinal a 11 cis retinal por medio de la luz *per se*. Debido a su homología con Opsinas de invertebrados se especuló que melanopsina era una opsina biestable (Provencio y col. 1998). Las células ganglionares fotosensibles están separadas del EPR anatómicamente por lo cual es muy difícil que el ciclo visual de EPR participe de la regeneración del cromóforo de

Melanopsina. Una de la evidencia más fuerte que sustenta la biestabilidad de Melanopsina fue a partir de su expresión heteróloga en células no fotosensibles (Melyan y col. 2005, Panda y col. 2005, Qiu y col. 2005). Estos sistemas heterólogos se encontraban libres de un sistema enzimático capaz de regenerar el cromóforo de melanopsina, a pesar de ello estas células fueron capaces de responder a estímulos lumínicos prolongados, por otro lado estas células solo fueron capaces de responder a luz cuando se cultivaban en presencia de retinal. La respuesta siempre fue mayor cuando se adicionaba un isómero cis de retinal, pero cuando se adicionaba all trans retinal las células eran capaces de responder a la luz, lo cual no sería posible en fotorreceptores fotoblanqueables (ej. Rodopsina) (Contin y col. 2006). Si Melanopsina fuera dependiente del ciclo visual de EPR cualquier alteración en el ciclo visual de EPR afectaría la respuesta de las CGRifs. En los ratones KO de RPE65 y LRAT, dos enzimas clave en el ciclo visual clásico, no se vio afectada la respuesta mediada por Melanopsina (Doyle y col. 2006, Tu y col. 2006). Cuando los ratones eran previamente tratados con luz de 620 nm y luego estimulados con luz de 480 nm (máximo de respuesta de Melanopsina) estos mostraron una mayor respuesta por parte de las células del núcleo supraquiasmático que aquellos que no recibían el pre estímulo con luz de longitud de onda larga (Mure y col. 2007). Esto es una característica típica de los pigmentos biestables, sin embargo este resultado no pudo ser reproducido cuando se midió la respuesta intrínseca de las CGRif por medio de arreglo de microelectrodos (Mawad y col. 2008).

En 2012 Matsuyama y col. lograron purificar la Melanopsina humana expresada en células HEK. Por medio de la delección del sitio de interacción con proteína G se logró aumentar la eficiencia de expresión. A diferencia de trabajo previos donde se sobre expresaba Melanopsina con el fin de estudiar su fotoquímica, en este trabajo se probaron diferentes métodos para extraer Melanopsina de la membrana celular alterando lo mínimo posible su estructura y funcionalidad (Matsuyama y col. 2012). Por medio de ensayos de espectrofotometría se determinó que Melanopsina humana es una opsina biestable con la capacidad de generar 11 cis retinal. A su vez posee un máximo de absorción de 467 nm en su estado sin activar, mientras que cuando se estimula con luz se genera un estado activado o metamelanopsina con un máximo a 476 nm. Este resultado explicaría porque las células ganglionares pueden mantener su respuesta por

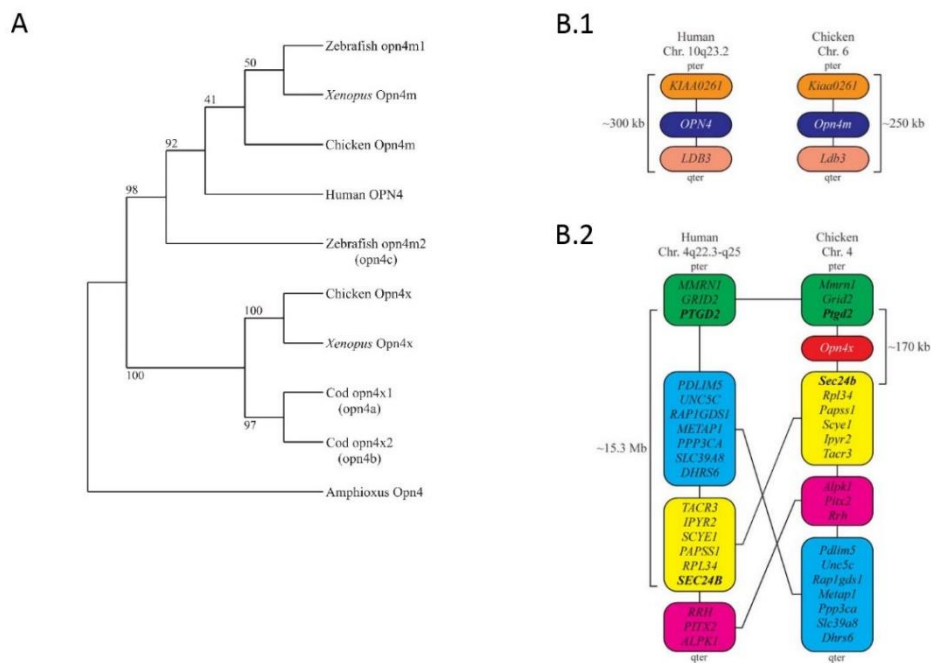
s tiempos prologado de estímulo con luz de 480 nm. Por otra parte se encontró que Melanopsina podría generar un estado extra el cual uniría 7 cis retinal, este estado denominado Extramelanopsina posee un máximo de 446 nm y se generaría luego de la estimulación de metamelanopsina con luz de longitudes de onda mayor a 530 nm. La presencia de este nuevo estado de Melanopsina generó nuevas preguntas acerca de la función de Melanopsina hasta que Emanuel y col. denominaron este comportamiento “triestabilidad”. La presencia de estos tres estados de Melanopsina le permitiría a las CGRif mantener una respuesta sostenida en el tiempo lo cual es vital para la detección de la cantidad de luz ambiental (Emanuel y col. 2015). El modelo propuesto en este trabajo se basa en la presencia de un equilibrio de los tres estados propuestos por Matsuyama: un estado oscuro o Melanopsina, un estado activado o Metamelanopsina y finalmente un estado innactivo o Extramelanopsina.

## MELANOPSINA EN ESPECIES NO-MAMÍFERAS: UNA VISIÓN EVOLUTIVA

La Melanopsina fue descrita por primera vez en melanóforos de *Xenopus Laevis* o rana africana (Provencio y col. 1998). Utilizando la secuencia aminocídica obtenida se buscó si esta opsina se encontraba presente en el genoma de otras especies y efectivamente se encontró un homólogo de Melanopsina presente en el genoma de humano y de ratón (Provencio y col. 2000). Sin embargo este homólogo de Melanopsina solo compartía un 57% de homología con Melanopsina de *Xenopus* y a su vez Melanopsina de los mamíferos solo se expresaba en un pequeño grupo de células ganglionares mientras que Melanopsina de *xenopus* está ampliamente expresada en todas las capas de la retina, melanóforos, cerebro y glándula pineal. No fue hasta el año 2006 cuando Bellingham y col. descubrieron un nuevo ortólogo de Melanopsina presente en la retina de pollo (Bellingham y col. 2006). Este nuevo ortólogo poseía mayor homología con Melanopsina de humano y ratón (74% y 71% ) por lo tanto se denominó Melanopsina M u *Opn4M* (por Mamífero), mientras que el ortólogo previamente descrito en pollo (Chaurasia y col. 2005) poseía mayor homología con Melanopsina de *Xenopus* (82%), la cual se denominó Melanopsina X u *Opn4X* (por *Xenopus*). Por medio de la búsqueda en base de datos se encontró que estos ortólogos se encontraban en el genoma de muchas especies

no-mamíferas incluida el mismo *Xenopus* el cual poseía ambos ortólogos. Sin embargo no se pudo encontrar ningún homólogo de *Opn4X* en genomas de mamíferos (Figura 11).

A su vez estos ortólogos se encontraban en diferentes locus del genoma de pollo. *Opn4M* se encuentra en el cromosoma 6 de pollo, el equivalente al cromosoma 10 en humanos, mientras que *Opn4X* se encuentra en el cromosoma 4 de pollo. Curiosamente en el cromosoma 4 de humano se observa un rearrreglo del locus donde se encontraría *Opn4X* por lo que se concluye que la pérdida del gen en mamíferos fue debido a este rearrreglo cromosómico. Se especula que la pérdida de este ortólogo por parte de los mamíferos ocurrió cuando los mamíferos entraron al “nicho nocturno” durante la era jurásica para escapar de sus predadores.



**Figura 11: Existen dos ortólogos de melanopsina en animales no-mamíferos. A** árbol filogenético que muestra la existencia de dos ortólogos de melanopsina, uno de estos ortólogos solo se encuentra en mamíferos (*Opn4m*). Mientras que las especies no-mamíferas poseen ambos ortólogos. **B1** comparación entre el locus humano y de pollo donde yace el gen de melanopsina de mamíferos (*Opn4M*), ambos locus se mantuvieron a lo largo de la evolución. **B2** comparación del locus de pollo donde yace el gen de melanopsina no-mamífera (*Opn4X*) con el locus humano en el cual se observa un rearrreglo del mismo con la pérdida de gen de melanopsina.

Melanopsina se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución (Figura 11), se ha encontrado genes de melanopsina desde vertebrados superiores como el humano hasta vertebrados primitivos muy inferiores. En 2005 Koyanagi y col. encontraron la presencia de un homólogo de melanopsina en el cefalocordado *Amphioxus*. Este homólogo de melanopsina presenta mayor homología con melanopsina de *Xenopus*, se expresa en las células rabadoméricas de este animal además de poseer comportamiento fotoquímico de una opsina biestable (Koyanagi y col. 2005). La importancia de este descubrimiento radica en lo bajo de la escala evolutiva de este animal, siendo considerado uno de los primeros vertebrados y una pieza fundamental en la comprensión del desarrollo del ojo. Este cefalocordado carece de ojo o un órgano fotosensible definido, en su lugar solo posee unas cuantas células fotosensibles: un grupo de células ciliares que representarían los ojos laterales y un grupo de células rabadoméricas o células de Joseph, la cuales expresan melanopsina. Estos resultados permitieron plantear un hipótesis acerca del origen de melanopsina, la cual se originaría a partir de una opsina con homología a melanopsina no-mamífera (Opn4X) y por una posterior duplicación de este gen se produciría el ortólogo mamífero (Opn4M) para luego perder el primero durante la evolución de los mamíferos; por otro lado nos ayuda a acercarnos a la respuesta de como una opsina rabadomérica se mantuvo a lo largo de la evolución hasta llegar a coexistir en el mismo tejido con Opsinas y fotorreceptores ciliares (conos y bastones).

Posteriormente se encontraron homólogos de melanopsina en animales de una escala zoológica mayor como por ejemplo mixinos y lampreas (Sun y col. 2014). Por otro lado, los peces tanto óseos (Bellingham y col. 2002, Drivenes y col. 2003, Davies y col. 2011, Sandbakken y col. 2012) como cartilagosos (Davies y col. 2012) poseen un número mayor de melanopsinas. En el pez cebra podemos encontrar dos tipos de Opn4X (X1 y X2) y Opn4M posee tres tipos (m1, m2 y m3), cada uno de estas proteínas provienen de un gen individual en el genoma de pez cebra. Cada una de estas Opsinas posee amplia expresión dentro de la retina, siendo Opn4m2 altamente expresada en fotorreceptores y células horizontales y Opn4X1 exhibe una expresión que abarca toda la retina interna. Esta gran variedad de genes de melanopsina se puede explicar a través de la hipótesis de Ohno o hipótesis 2R en la cual se postula que los vertebrados acuáticos sufrieron 2

rondas de duplicación de su genoma, para el caso de melanopsina, dando 5 genes de la misma (Davies y col. 2011).

En aves solo encontramos dos ortólogos de melanopsina (Bellingham y col. 2006), a su vez cada uno de estos ortólogos posee diferentes isoformas generadas por “*splicing*” alternativo; de este modo, Opn4M posee tres isoformas denominadas L (long), S (short) y SS (Super Short); y Opn4X posee dos isoformas denominadas L y S (Torii y col. 2007). Por medio de hibridación in situ se localizó el mensajero de Opn4X en las células ganglionares, bipolares e horizontales (Tomonari y col. 2005). En nuestro laboratorio se estudió la expresión de Opn4X a lo largo del desarrollo de la retina de pollo. Utilizando inmunohistoquímica se encontró que en estadio embrionario de 8 días (E8) la expresión de Opn4X se encuentra mayormente circunscrita a la capa de células ganglionares y nervio óptico; y a partir del día 15 de estadio embrionario la expresión es mayoritaria en las células horizontales (Verra y col. 2011).

## Receptor acoplado a proteína G de la Retina y del epitelio pigmentario Retinal (RGR)

En el año 1993 Jiang y col. descubrieron una nueva opsina presente en el epitelio pigmentario retina (Jiang y col. 1993). Esta nueva opsina compartía homología con la familia de receptores acoplados a proteína G. debido a su expresión en el epitelio pigmentario retinal y en retina se la denominó receptor acoplado a proteína G del epitelio retinal y retina o RGR, esta opsina comparte un 46% de homología con rodopsina y el retinocromo, el cual es una fotoisomerasa presente en la retina de calamar (Hara y col. 1968). Otra característica importante descrita en el trabajo fue la presencia de un residuo de lisina hidrofóbica en el séptimo paso transmembrana; esta lisina es fundamental en el funcionamiento de las opsinas ya que ésta se une al retinaldehído proporcionándole su fotosensibilidad. Esta opsina posee una expresión intracelular en la retina bovina (Pandey y col. 1994) y de humanos (Shen y col. 1994). Su expresión se limita al EPR y las células de Müller; por medio de microscopía electrónica se demostró que su expresión es abundante en EPR, con una gran expresión en lo que



sería retículo endoplásmico, salvo en la zona basolateral de las células. Mientras que su expresión en la retina neural se circunscribe a los procesos en la capa plexiforme interna y los terminales o “pies” de las células de Müller, estos rodean a las células ganglionares y forman la membrana limitante de la retina. Por medio de la utilización de retinaldehído marcado con  $^3\text{H}$  se determinó que RGR une all trans retinal en mayor proporción al 11 cis retinal (Shen y *col.* 1994). Esta opsina posee dos máximos de absorción dependientes del pH del medio (Hao y *col.* 1996). A pH bajos RGR posee un máximo de absorción cercano a 469 nm, mientras que a pH neutro posee un máximo de absorción cercano a 370 nm. Esta particularidad de RGR es común en Opsinas de invertebrados como el retinocromo y la metarodopsina de calamar. La capacidad de poseer especies tautoméricas dependientes del pH posiblemente se deba a la falta de un contraion para estabilizar la base de Schiff protonada formada entre el cromóforo y el amino  $\xi$  del aminoácido lisina. Mientras que rodopsina posee un aminoácido glutámico en su posición 113 el cual estabiliza la carga de base de Schiff protonada, en RGR este aminoácido es sustituido por Histidina provocando variaciones en su espectro de absorción dependiendo del pH del medio.

El cromóforo endógeno preponderante de RGR es all trans retinal (Hao y *col.* 1999). Cuando se expone RGR a luz de 470nm ó 370 nm isomeriza el all trans retinal unido a 11 cis retinal, siendo más efectiva la luz UV. Cuando RGR es desnaturalizado con SDS pierde su capacidad para fotoisomerizar el all trans retinal demostrando que la isomerización es dependiente de RGR y no una isomerización inespecífica.

La eficiencia de isomerización de RGR es un 34% de la eficiencia de rodopsina y siete veces superior al de CRALBP, una proteína transportadora de retinal sin capacidad de fotoisomerizar. Estudios cinéticos de la isomerización de all trans retinal por parte de RGR demostraron que a pesar de generar 11 cis retinal y poseer un coeficiente de extinción alto, este no se liberaría del 11 cis retinal. Este resultado se opone a la hipótesis de que RGR funcionaria como una fotoisomerasa similar al retinocromo.

Cuando se purificó RGR por primera vez (Shen y *col.* 1994) se encontró que esta copurificaba con una proteína de 32 KDa. En ese entonces se desconocía la identidad de esta última proteína. Por medio de espectrometría de masa se logró identificar esta proteína como 11 cis retinol deshidrogenasa (cRDH) (Chen y *col.* 2001b). Esta retinol

deshidrogenasa microsomal se expresa en EPR y es capaz de reducir el 11 cis retinol a 11 cis retinal. Cuando se agrega NADH a la mezcla de RGR mas cRDH, y se expone a luz monocromática de 470 nm aumenta la producción de 11 cis retinal, esto indica que RGR y cRDH interaccionan para aumentar la síntesis de 11 cis retinal.

Para elucidar la función de RGR en la retina se generó un ratón carente ó *knockout* (KO) para RGR (Chen y col. 2001a). La morfología de la retina de estos ratones es normal hasta los 9 meses de vida mantenidos en condiciones normales de luz. A partir de los 9 meses la retina de estos animales comienza a degenerar causando una gradual pérdida de visión. Cuando estos animales son expuestos a luz constante por 8 horas sufrieron una pérdida cercana al 50% de retinal total y rodopsina en la retina. Su visión se vio drásticamente afectada. En estos ratones se pudo observar un gran acumulo de all trans retinil ésteres.

Si RGR realmente funciona como una fotoisomerasa capaz de generar 11 cis retinal se debería observar formación de 11 cis retinal en el EPR de ratones carentes de RPE65, la enzima clave para la producción de 11 cis retinal. En ratones RPE65  $-/-$  no se observaron cambios en la expresión de RGR, a pesar de ello la expresión de RGR; no fue suficiente para compensar la producción de 11 cis retinal (Van Hooser y col. 2002). Este resultado indicaría que RGR no funcionaría como una fotoisomerasa clásica similar al retinocromo de calamar.

Hasta ese entonces la función fisiológica de RGR no era conocida. En 2008 Radu y col. Lograron demostrar que RGR funciona como una opsina que detectaría luz en el epitelio pigmentario retinal (Radu y col. 2008). Cuando se silenció RGR en células de EPR humanas por medio de SiRNA se observó que estas acumulaban all trans retinil ésteres. Cuando se determinó el contenido de retinales en los ojos de ratones RGR  $-/-$  se observó un acúmulo de all trans retinil ésteres, all trans retinol y una disminución de 11 cis retinal, resultado similar a lo reportado previamente por Chen y col. Debido a que el principal retinoide acumulado en los ratones RGR  $-/-$  era los ésteres de retinol investigaron las enzimas encargadas en la síntesis de los mismo. Los homogenatos de EPR de ratones RGR  $-/-$  poseían mayor actividad Lecitina:Retinol Acil Transferasa y retinil ester hidrolasa en oscuridad. Este último resultado indicaría que RGR inhibiría la función de estas enzimas en oscuridad, mientras que en condición fóticas RGR dejaría de inhibir.

Este mecanismo propuesto es un nuevo mecanismo para la movilización de ésteres de retinol dentro del EPR, en el cual se acumulan los mismos en pequeñas gotas de grasa llamados retinosomas (Orban y *col.* 2011).

Hasta el presente todos los estudios realizados en relación a RGR han sido dirigidos a investigar su rol en el ciclo visual y específicamente en el EPR. A pesar de su expresión en los pies de las células de Müller, no se ha investigado su función en el contexto de las CGRifs.

## OBJETIVOS

*En base a las preguntas previamente planteadas se establecieron los siguientes objetivos:*

### *Objetivo general*

- *Determinar el o los tipos de mecanismos involucrados en la regeneración del cromóforo 11-cis-retinaldehído en la retina interna de pollos.*

### *Objetivos específicos*

- *Determinar la capacidad de la retina interna para regenerar 11-cis-retinal.*
- *Determinar y localizar componentes del ciclo visual en la retina interna.*
- *Localizar el o los tipos celulares que llevan a cabo la isomerización del retinal.*
- *Investigar la expresión de RGR en la retina y cultivos primarios.*
- *Determinar el rol de RGR en el ciclo visual de la retina interna.*

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y METODOS

### MANEJO DE ANIMALES

Los animales utilizados fueron proporcionados por AVICO s.r.l. para los experimentos de histología y contenido de retinoides en las capas retinales se utilizaron animales de 7 días de edad. Para los experimentos de cultivo celular de neuronas se utilizaron huevos fértiles de 8 días incubación los cuales corresponden a un estadio embrionario de 8 días.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con el uso de animales para la oftalmología e investigación de la visión de ARVO. Estos protocolos fueron aprobados por un comité local para el cuidado de animales (facultad de ciencias químicas, Universidad nacional de Córdoba, Exp.15-99-39796).

### PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Para realizar los cortes histológicos se realizó en base al trabajo de Barthel y Raymon (Barthel y *col.* 1990) con pequeñas adaptaciones. Los animales fueron anestesiados con 2,5 mL/Kg de equitesin (426 mg de hidrato de cloral, 96 mg de pentobarbital, 212 mg de MgSO<sub>4</sub>, 3,5 mL de propilenglicol y 1 ml de etanol absoluto en un volumen final de 10 mL) y luego sacrificados por decapitación y los ojos enucleados. Se realizaron cortes radiales en la córnea a la altura de la ora serrata y el lente removido. Las copas de los ojos fueron fijadas en paraformaldehído 4%, sacarosa 5% (0,15 M) en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 a temperatura ambiente por 60 minutos. Luego de lavar tres veces por 10 minutos a temperatura ambiente con sacarosa 5% en PBS los ojos fueron crioprottegidos con concentraciones crecientes de sacarosa. Estas soluciones se realizaron por la mezcla de sacarosa 5% (0,15 M) y sacarosa 20% (0,6 M) en PBS en las siguientes relaciones 2:1, 1:1 y 1:2. Los ojos fueron infiltrados por 30 minutos con cada solución de concentración creciente a temperatura ambiente y finalmente colocados en sacarosa 20% toda la noche a 4°C.

## MONTAJE Y CORTE HISTOLÓGICO

Luego de la crioprotección el tejido fue infiltrado con una mezcla de 2 partes de sacarosa 20% y una parte de medio de montaje OCT (Sakura tissue-Tek) por 30 minutos a temperatura ambiente antes de su congelación. El ojo fue llevado a un molde de papel aluminio y relleno con la mezcla de sacarosa-OCT. El molde fue sumergido en nitrógeno líquido. Luego de su congelación el bloque fue envuelto en papel aluminio y conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Las secciones radiales del ojo fueron cortadas a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en un criostato Leica CM 1510. Los cortes de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  de espesor fueron montados en vidrios superfrost cargados positivamente (superfrost, Fisher scientific) y secados a temperatura ambiente. Los cortes fueron guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Antes de la tinción histológica, los cortes se retiraron del congelador y se secaron a temperatura ambiente con corriente de aire.

## INMUNOHISTOQUÍMICA E IMMUNOCITOQUÍMICA

Los cortes de ojos de un espesor de entre 10-15  $\mu\text{m}$  fueron descongelados a temperatura ambiente y secados en corriente de aire. Se lavó con PBS 5 minutos a temperatura ambiente para retirar el exceso de sacarosa-OCT. Seguido, los cortes se permeabilizaron con Tritón X-100 0,2% por 5 minutos.

Para inmunotinción de cultivos celulares, se realizó un procedimiento similar. Las células crecidas en cubreobjetos pretratados con laminina y polilisina se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS por 10 min temperatura ambiente (TA).

Luego de la permeabilización, las muestras fueron incubadas con un buffer bloqueante (PBS suplementado con albumina sérica bovina (BSA) 0,5%, Glicina 1%, Tween20 0,1% y  $\text{NaNO}_3$  0,1%) por 1 hora a TA para disminuir las uniones inespecíficas del anticuerpo.

Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios dirigidos contra una proteína específica. Los anticuerpos primarios se diluyeron en buffer bloqueante para disminuir la unión inespecífica de los mismos. Las muestras se incubaron a 4°C toda la noche independientemente del anticuerpo utilizado.

Transcurrida la incubación con anticuerpo primario las muestras fueron incubadas por una hora a TA con un anticuerpo secundario anti IgG, estos variaron según el origen animal del anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados fueron Alexa Fluor 488 anti IgG de ratón y de conejo; Alexa fluor 546 anti IgG de ratón y de conejo. Los anticuerpos secundarios anti IgG se utilizaron en una dilución 1:1000 con buffer bloqueante.

Transcurrida la incubación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos a TA. Luego se incubó con una contratinción para marcar material nuclear. Para ello se utilizó Hoechst 33258 (thermo scientific, H3569) en una dilución 1:1000 en agua por 10 minutos. Luego se montaron la muestras utilizando líquido de montaje FluorSave (millipore, 345789) y se cubrió con un cubreobjeto, dejando secar hasta su visualización.

#### PURIFICACIÓN DE CÉLULAS DE LA CAPA DE GANGLIONARES (CCG), CAPA NUCLEAR INTERNA (CNI) Y FOTORRECEPTORES (CFR)

Las diferentes capas celulares de la retina fueron aisladas de acuerdo a una modificación del método de Yates & Keen (Yates y col. 1976), realizada en nuestro laboratorio (Guido y col. 1999). Brevemente, los ojos de los animales sacrificados fueron cortados a la altura del *ora serrata*, se retiró el iris, humor acuoso y vítreo y se sumergieron en una solución de sacarosa al 20% para luego ser rápidamente congeladas en nitrógeno líquido. Las copas ópticas congeladas se liofilizaron durante 24 horas. Una vez deshidratados, se pegaron sobre cinta de embalar transparente dejando la capa de células ganglionares (CCG) sobre la cara de la cinta con pegamento y la capa de fotorreceptores (CFR) hacia arriba. La retina se cubre con otra cinta dejando la retina flanqueada por dos cintas, cuando se despegan las cintas se separan las capas de la retina. Este proceso se repite 9 veces, la primera y segunda cinta corresponde a CFR, la quinta cinta corresponde a la capa nuclear interna (CNI) y



finalmente la novena cinta corresponde a CCG. Las células adheridas a la cinta se despegan con repetidos lavados con buffer.

#### CULTIVO ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS GANGLIONARES QUE EXPRESAN MELANOPSINA X (OPN4X)

Las células ganglionares fueron purificadas a partir de embriones de pollo de 8 días de gestación. Las retinas se diseccionaron en buffer Hanks libre de Calcio y Magnesio (CMF) frío. Las retinas fueron digeridas con 165 UI de papaína (P3125 Sigma-Aldrich) y 0,4% Desoxiribonucleasa I (18047-019 Invitrogen) por 25 minutos a 37°C. Transcurrida la digestión, se agregó inhibidor ovomucoide de Tripsina (30mg/mL) y las retinas fueron trituradas por succión repetida con pipeta. Las células disociadas se resuspendieron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y se llevaron a una placa de petri pretratada con proteína A (2,5 µg/ml) (sigma) y anticuerpo policlonal de conejo anti melanopsina X de pollo (dilución 1:2000) (Bio-Synthesis Inc., Lewisville, TX, USA). Las células fueron incubadas en la placa por 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas exhaustivamente con CMF para remover las células que no se unieron, las células adheridas fueron tratadas con tripsina para romper la unión a la placa, se centrifugaron y se resuspendieron en un medio específico para el crecimiento de células ganglionares (B27 Life Technologies, Invitrogen, GIBCO, Carlsbad, CA; dilución: 1/50 v/v; forskolins de *Coleus forskohlii* Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 4.25 µg/ml in DMSO; BDNF humana recombinante R&D Systems, Minneapolis, MN. 50µg/ml). Las células se crecieron en placas para cultivo previamente tratadas con Laminina 5 µg /ml y polilisina 10 µg/ml.

## PURIFICACION DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN total de los cultivos y tejido fue extraído siguiendo el método de Chomczynski and Sacchi usando el kit TRIzol para aislar ARN (invitrogen). La integridad del ARN fue verificada en un gel de agarosa al 1% y cuantificada por espectrofotometría UV (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek). Finalmente, 2 $\mu$ g de ARN total fueron tratados con DNAsa (promega) para eliminar contaminación con ADN genómico. El ADNc fue sintetizado con la retrotranscriptasa M-MLV (promega) utilizando como molde "Random primer" (promega).

### Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó de acuerdo a Contin et al 2006, con una desnaturalización inicial de un minuto a 94°C, 25-35 ciclos de 60 seg a 94°C, 50 seg a 60-65°C, 90 seg a 72°C y una elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados electroforesis en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio.

**Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para RT-PCR fueron las siguientes.**

#### **Brn3:**

Forward: CCATCCTGCACGAGCCCAAGTA

Reverse: GCCCCGTAGCAAGGTCTCATCAA

#### **Gq:**

Forward: TCAAAACATCTTCACTGCCATG

Reverse: TCCACGTCGCTGAGATAGTATT

#### **RGR:**

Forward: TTGAAGACGCTGGTCATTTGC

Reverse: CTGCCATATTCCTCCTCTGTAGTT

#### **Opn4x:**

Forward: TGCTTTGTCAACAGCTTGACAGA

Reverse: CAGCAATAATCTGTATGGTGCCTTC

**GAPDH:**

Forward: AGGCGAGATGGTGAAAGTCG

Reverse: TCTGCCCATTTGATGTTGCT

SILENCIAMIENTO DE RGR

Se utilizó un oligonucleótido sintético antisentido sustituido con morfolinos contra el ARNm de RGR de pollo (NM\_001031216): RGR Morfolino (5'-GATGTGAAGTGACCATTCTGTGAT) (gene-tool LLC, Philomath, USA). Se transfectaron los cultivos utilizando polietilimina (PEI 20 KDa) (764965 Sigma-Aldrich). La mayor reducción en los niveles de ARNm se obtuvo mezclando 5 µg de oligomorfolino (200 nM concentración final), 5µL de PEI 1 mg/mL y DMEM para completar un volumen final de 150 µL. luego de la una incubación de 5 min a TA se agregó 450 µL de DMEM para llegar a un volumen de 600 µL, lo suficiente para una placa de cultivo de 6 mm. La mezcla fue agregada a las placas de cultivos conteniendo los cultivos primarios. Las células fueron incubadas con el medio de transfección a 37°C por 4 h. Concluido este tiempo el medio fue remplazado con medio fresco y las células se mantuvieron por 24h antes del ensayo.

MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON FLUO-4 AM

Las células fueron crecidas en cámaras de 8 pocillos para microscopia (Nunc™, NY-USA) con DMEM incoloro (GIBCO) conteniendo 0.1% de ácido plurónico F-127 y 5 µM del colorante indicador de calcio Fluo-4 AM (Invitrogen-Molecular Probes) por 60 min a 37°C la medición de calcio intracelular se llevó a cabo de acuerdo a Contin et al. 2010. El indicador de Calcio fue excitado a 515 nm (25.8 µW laser intensity) con un láser acoplado a un microscopio confocal (Olympus FluoView-1000). La fluorescencia emitida fue capturada cada 2 seg usando un objetivo de inmersión en aceite PlanApo N 60×Uplan SApo (NA: 1.42; Olympus). Se cuantificaron los niveles de intensidad de fluorescencia

de cada foto usando el software Fluoview 10.1; la intensidad de fluorescencia media de cada célula fue corregida substrayendo la fluorescencia media de áreas sin células. La intensidad de fluorescencia fue medida en cada célula y en cada imagen tomada dentro de la serie. Los cambios en los niveles de fluorescencia fueron cuantificados como la relación entre la intensidad de fluorescencia luego del estímulo de 1000 lux (F) y la intensidad media de la célula previo a su estimulación ( $F_0$ ). Los valores de  $F/F_0$  no son lineales con la concentración de calcio pero nos proveen información cualitativa sobre los cambios en el calcio intracelular.

## ANALISIS DE RETINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)

Los cultivos primarios fueron homogeneizados en PBS conteniendo 200 mM de hidroxilamina. Luego se agregó 1 mL de etanol calidad HPLC. Los retinoides fueron extraídos con 3 mL de hexano calidad HPLC. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min para separar las fases (orgánica y acuosa). La fase orgánica fue recolectada, secada bajo corriente de nitrógeno, re disuelto en 200  $\mu$ L de hexano. Las muestras extraídas fueron analizadas mediante HPLC de fase directa usando diferentes fases móviles que consisten en diferentes proporciones de Hexano: Dioxano (retiniloximas y all trans retinol se utilizó una proporción Hexano:dioxano 99,5:0,5; all trans retinil palmitato se utilizó Hexano:dioxano 99,9:0,1) aun flujo de 1,5 mL/ min en una columna de sílica (Agilent-Zorbax- Rx Sil 5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm; retiniloximas y all trans retinol / Zorbax-Sil 5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm; all trans retinil palmitato) en un cromatógrafo Agilent 1260 equipado con un detector con arreglo de fotodiodo (Agilent Technologies, Wilmington, DE). La identidad de cada retinoide fue confirmada por el análisis espectral y co-elución con estándares de retinoides. Los estándares de All trans retinal, All trans retinol y All trans retinil palmitato fueron obtenidos de Sigma Aldrich mientras que 11 cis retinal se obtuvo de Santa Cruz (sc-208843). La cuantificación de los retinoides se llevó a cabo comparando las áreas de los picos obtenidos con respecto a las áreas obtenidas en una curva de calibración realizada con los estándares.

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las cantidad de proteínas presente en las muestras fue cuantificada por el método de Bradford el cual utiliza como colorante Comassie brilliant blue (Bio-Rad). Se realizó una curva de calibración, utilizando como testigo albumina sérica bovina (BSA). Las determinaciones se realizaron en una placa de 96 pocillos (Corning) midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Epoch (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek).

## WESTERN BLOT

Las muestras con concentraciones conocidas de proteínas (50µg) fueron solubilizadas con buffer de Laemli 2x, calentadas a 90°C por 5 min, y luego sembradas en un gel de poliacrilamida al 10%. La separación electroforética se realizó a voltaje constante de 150 voltios. Luego de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm (Sigma-Aldrich GE10600016 SIGMA) mediante amperaje constante a 350 mA por 1 h. La membrana transferida fue bloqueada con 5% leche descremada en PBS por 60 min TA. Luego se incubó con los anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés toda la noche a 4°C. Transcurrida la incubación, se quitó el exceso de anticuerpo por medio de lavados (tres lavados de 5 min a TA con PBS/Tween 0,1 %) y se incubó con anticuerpo secundario infrarrojos Odyssey (LI-COR) en una dilución 1:25000 en PBS/Tween 0,1%/leche descremada 2,5% por 60 min a TA. La muestra fueron reveladas en un escáner infrarrojo Odyssey (Li-Cor®)

## TÉCNICA DE FLISA (FLUORESCENT-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para determinar el título del anticuerpo de melanopsina X se realizó un ensayo de FLISA el cual es una variante del método de ELISA, que a diferencia de este último utiliza un anticuerpo fluorescente para su detección. Brevemente, se diluyó en péptido antigénico con buffer bicarbonato/carbonato (3 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 6 g de NaHCO<sub>3</sub> en 1000 ml de agua

destilada; pH=9.6) a una concentración final de 20 µg/mL. Se agregó 50 µL de la solución anterior a una placa de 96 pocillos y se la incubo por 2 h a TA. Luego se retira el contenido de péptido y se lavó 3 veces con buffer PBS. Los pocillos fueron incubados con buffer bloqueante (leche descremada al 5% en PBS) por 2 h a TA. Transcurrido el tiempo, se retiró el buffer bloqueante y se lavó con PBS. Los pocillos fueron incubados con diferentes diluciones seriadas del anticuerpo toda la noche a 4°C y luego incubados con un anticuerpo secundario fluorescente secundario infrarrojos Odyssey (LI-COR). La muestra fueron reveladas en un escáner infrarrojo Oddissey (Li-Cor®).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el programa Sigma Plot XI. Se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) y una prueba post hoc SNK. Además se utilizó la prueba T de Student cuando correspondía (nivel de significancia  $p \leq 0,05$ ).

# RESULTADOS

## RESULTADOS

### La retina interna de pollos de 7 días de edad mantiene los niveles de 11 cis retinal en presencia de Luz

La retina interna de los animales vertebrados posee una importante variedad de Opsinas y fotoreceptores (Melanopsina, Neuropsina, Encefalopsina, opsina VA, Peropsina, RGR, etc.) (Terakita 2005). Melanopsina es la opsina mejor estudiada dentro de la retina interna. Por su homología con Opsinas de invertebrados y por evidencia experimental (Qiu y col. 2005, Mure y col. 2007, Matsuyama y col. 2012) se ha postulado que posee capacidad de fotoisomerizar all trans retinal en 11 cis retinal, en otras palabras se comporta como un opsina “biestable”. A pesar de la importante cantidad de evidencia, toda ella proviene de estudios electrofisiológicos (Melyan y col. 2005, Qiu y col. 2005, Mure y col. 2007), en células aisladas (Walker y col. 2008) y hasta con melanopsina purificada (Matsuyama y col. 2012). Sin embargo hasta el presente no se ha planteado evidencia *in vivo* de la fotoquímica en la retina interna de vertebrados. En base a resultados obtenidos en las tesis desarrolladas en nuestro laboratorio por parte de Diego Valdez y Daniela Verra y a fin de investigar la fotoquímica de la retina interna del pollo se decidió abordar esta cuestión por medio de la técnica de HPLC. Para ello se colocaron animales de 7 días de edad bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Un día antes del experimento los animales se mantuvieron en oscuridad constante, se separaron dos grupos: uno denominado luz y otro oscuridad. Los animales del grupo oscuridad fueron sacrificados sin encender la luz y el grupo luz fue estimulado con 30 minutos de luz blanca fría de 1000 lux, el diseño experimental se resume en la figura 12. Se aislaron las diferentes capas de la retina como previamente se describió el apartado de Materiales y Métodos. Se extrajeron los retinoides presentes en las capas y se cuantificó el contenido de 11 cis retinal por HPLC. Los primeros experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del doctor Andrew Tsin en la universidad de Texas en San Antonio (UTSA).

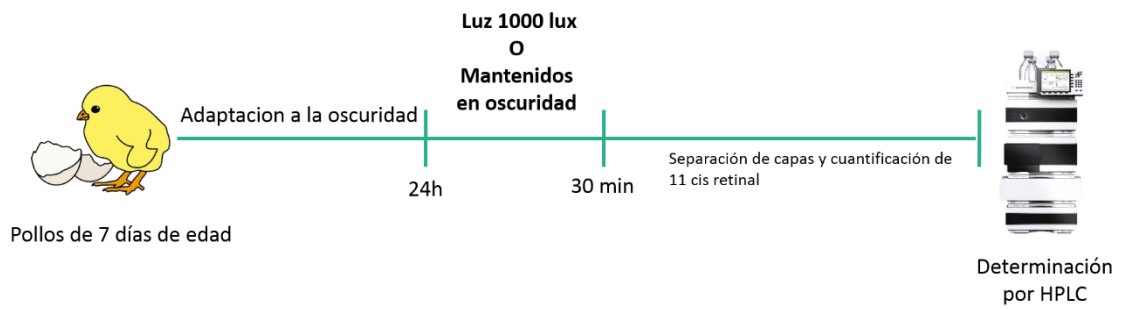
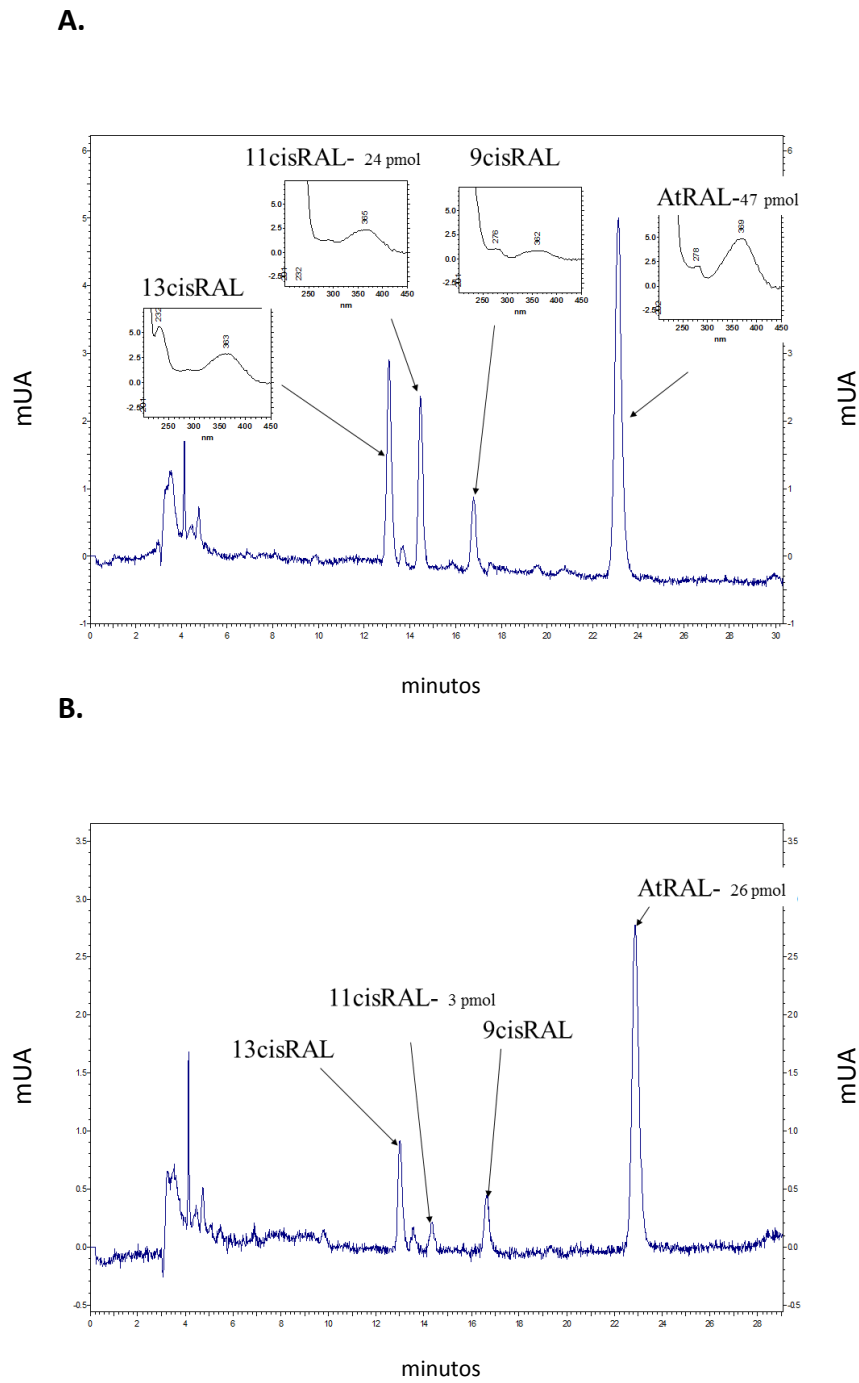


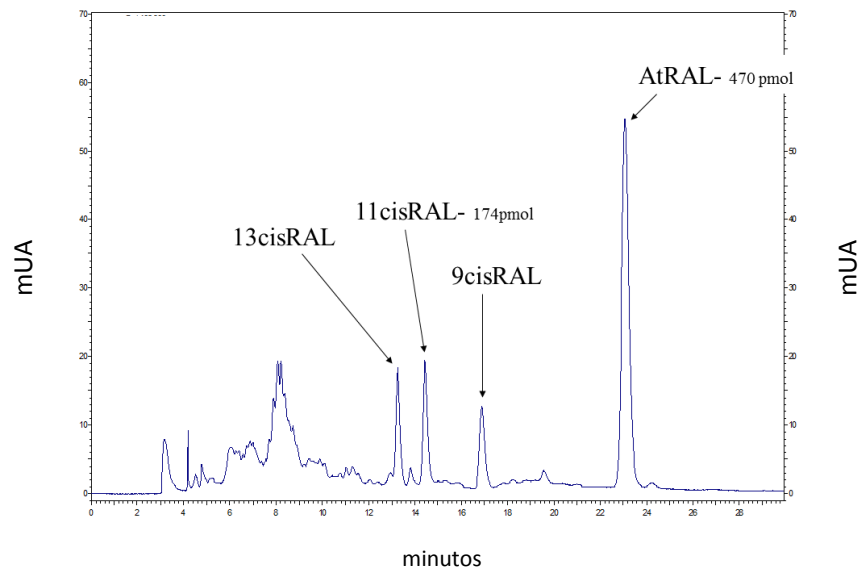
Figura 12: **Diseño experimental del experimento de isomerización en la retina.** Pollos de 7 días de edad se adaptaron en oscuridad por 24 h. los animales fueron separados en dos grupos: un grupo fue mantenido en oscuridad (grupos oscuridad) mientras que otro grupo se fue estimulado con luz blanca fría de 1000 lux por 30 min. Luego de la estimulación los animales fueron sacrificados y enucleados. Se separaron las capas de la retina y se le cuantificó el contenido de 11 cis retinal en cada capa por medio de HPLC.



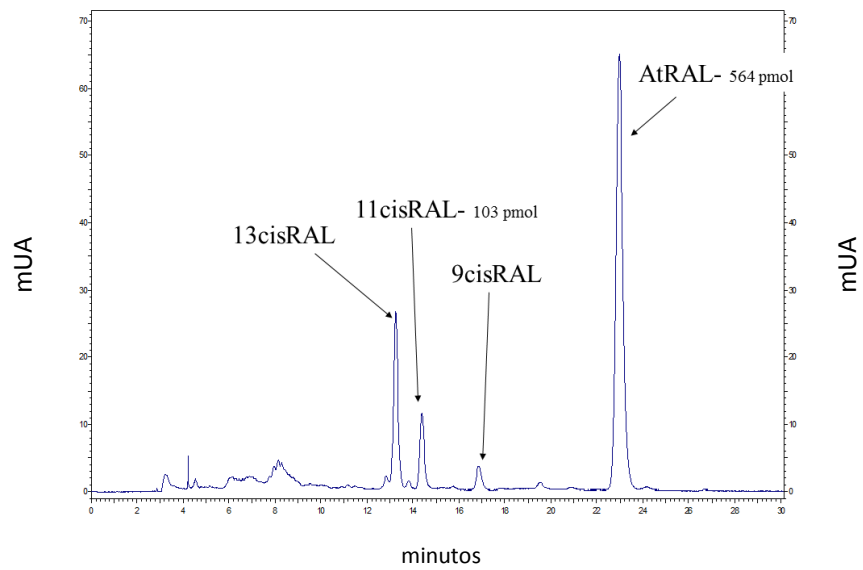


**Figura 13:** Cromatograma representativo de cromatografía líquida del alto rendimiento (HPLC) en células ganglionares. A. cromatograma correspondiente a un extracto de células ganglionares adaptadas a luz. Cada pico del cromatograma está acompañado de su correspondiente espectro de absorción. B. cromatograma correspondiente a un extracto de células ganglionares en condiciones de oscuridad

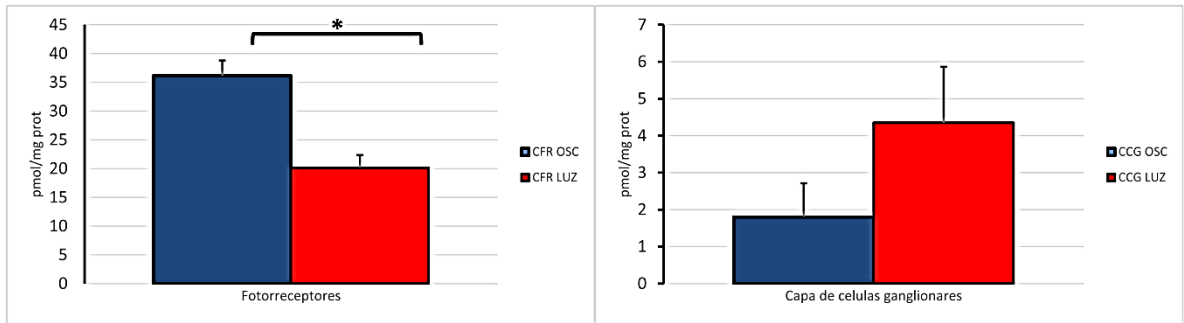
**A.**



**B.**



**Figura 14:** Cromatograma representativo de cromatografía líquida del alto rendimiento (HPLC) en fotorreceptores. **A.** Cromatograma correspondiente a un extracto de fotorreceptores adaptadas a luz. **B.** Cromatograma correspondiente a un extracto Fotorreceptores en condiciones de oscuridad.



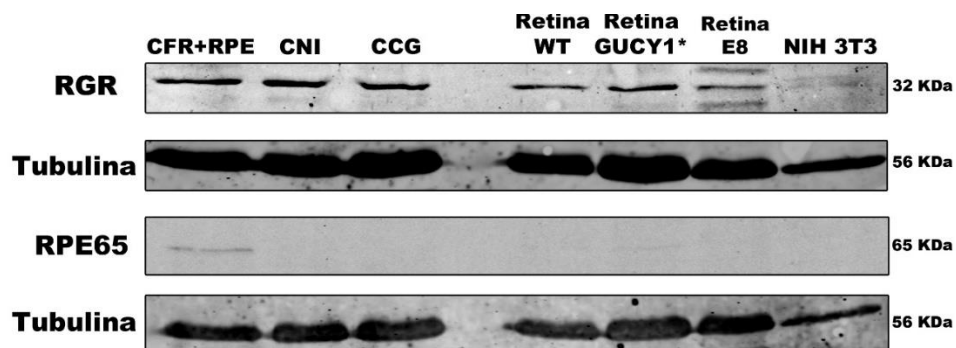
**Figura 15: Contenido de 11 cis retinal en la capa de la retina. Panel izq:** contenido de 11 cis retinal presente en fotorreceptores (CFR) en oscuridad (barra azul) y con 30 minutos de luz blanca fría de 1000 lux (barra roja). Se observó diferencias significativas entre el grupo luz y oscuridad ( $p < 0.05$ ). **Panel der:** contenido de 11 cis retinal presente en la capa de células ganglionares (CCG) en oscuridad (barra azul) y en Luz (barra roja). No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Análisis estadístico: prueba T de Student con una significancia  $*p = 0.05$   $n = 3$  (experimentos individuales).

Como era de esperar, en la capa de fotorreceptores se observó una disminución significativa del contenido de 11 cis retinal en las muestras provenientes de retinas expuestas a la luz (Figura 15, panel izquierdo) (Wald 1968b). Los fotorreceptores carecen de la maquinaria capaz de convertir 11 cis retinal en all trans retinal, por lo cual en condiciones fóticas el contenido de 11 cis retinal disminuye con un correspondiente aumento de all trans retinal. Para mantener el funcionamiento de la maquinaria fotorreceptiva se necesita del constante aporte por parte del epitelio pigmentario retinal (EPR). Por otra parte, en células ganglionares el contenido de 11 cis retinal no sufrió un cambio significativo luego de la exposición a la luz (Figura 15, panel derecho), si bien se observó una tendencia a mayor contenido de 11 cis retinal, en luz debido a la alta dispersión, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Este resultado indica que la retina interna de aves (incluye células ganglionares) utiliza un mecanismo diferente al observado en los fotorreceptores clásicos conos y bastones. La retina interna se encuentra anatómicamente separada del EPR (Figura 2), por lo tanto podemos descartar la participación del mismo en la mantención de los niveles de 11 cis retinal. Dos posibles hipótesis pueden explicar el fenómeno observado anteriormente: **1)** este fenómeno observado se debe a la biestabilidad de las Opsinas presentes en la retina interna (melanopsina, opn5); **2)** la isomerización se deba a la presencia de una fotoisomerasa con la capacidad de isomerizar all trans retinal en 11 cis retinal (RGR o

Peropsina); Asimismo las células gliales de Müller funcionan como células soporte isomerizando all trans retinal por medio de ciclo enzimático similar al presente en EPR.

El receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) se expresa en la retina interna de pollos de 7 días de edad y en estadios tempranos del desarrollo embrionario.

Un posible efector del fenómeno observado anteriormente es el Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR). Debido a su homología con el retinocromo del calamar (Hara y *col.* 1968, Shen y *col.* 1994) esta proteína fue descrita en primera instancia como una posible fotoisomerasa reversa. Posteriormente se demostró su capacidad para isomerizar all trans retinal en 11 cis retinal por medio de la luz (Hao y *col.* 1999). Por ellos decidimos investigar la expresión de RGR en la retina de aves. Para ello se consiguió un anticuerpo específico dirigido contra esta proteína y se realizaron ensayos de western blot (Figura 16).



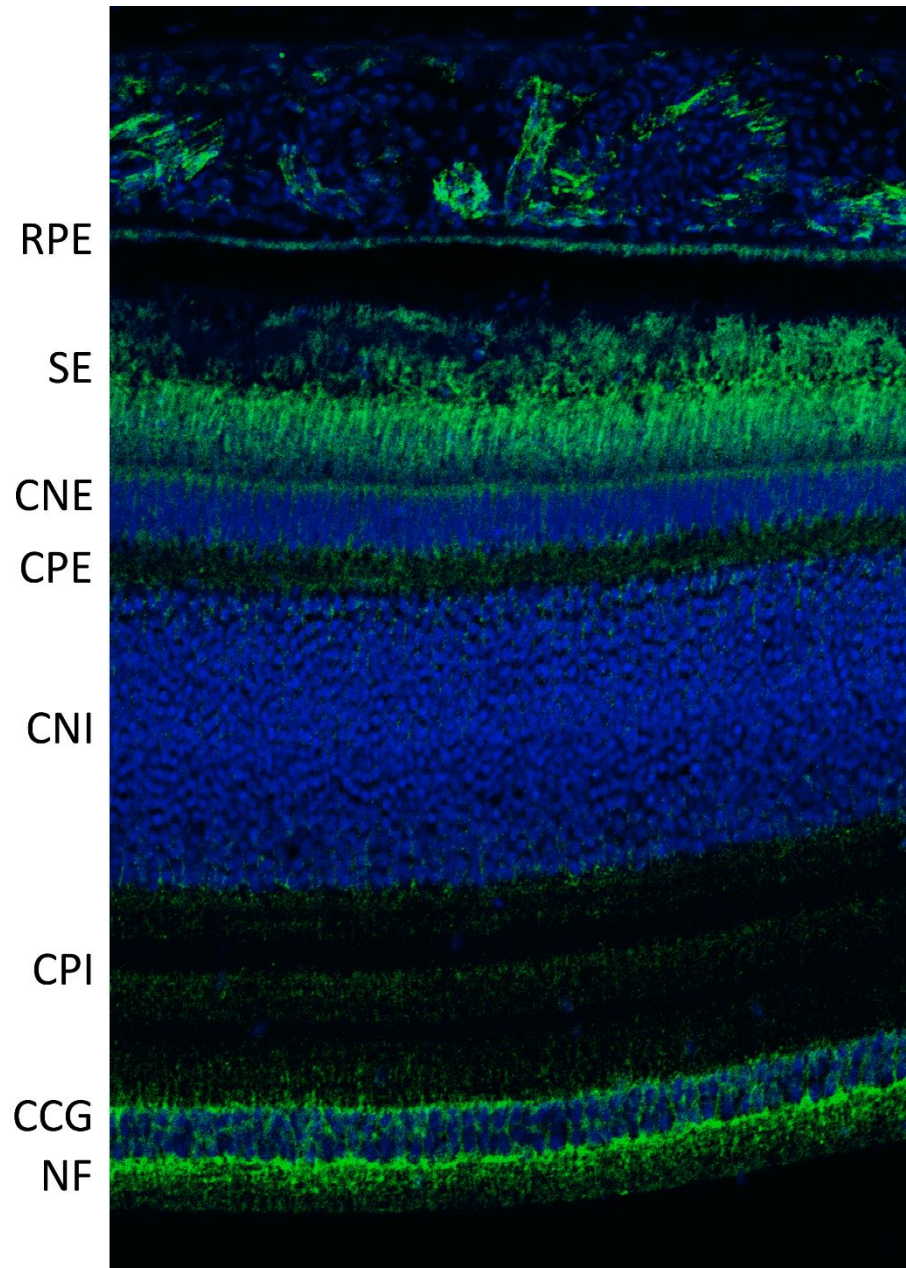
**Figura 16:** expresión del receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) en la retina de pollo. Por medio de un anticuerpo dirigido contra la proteína RGR se determinó la expresión de RGR en las diferentes capas de la retina; Fotorreceptores parcialmente contaminados con EPR (CFR+EPR), Capa nuclear interna (CNI), Capa de Células Ganglionares (CCG). RGR se expresa en la retina de Aves adultas (Retina WT), retina de pollos ciegos de 3 meses de edad (Retina GUCY1\*) y en retinas embrionarias de 8 días (retina E8). Como control negativo se utilizó un extracto de células NIH3T3 (NIH3T3). Como control de carga se utilizó tubulina y control de contaminación con EPR se utilizó el marcador RPE65.

Utilizando el anticuerpo anti-RGR se detectó una banda de  $\approx 32$  KDa comparado al estándar de peso molecular, este peso molecular concuerda con el peso previamente reportado de RGR bovino y humano (Shen y *col.* 1994). Se detectó la expresión de RGR en todas las capas de la retina analizadas, desde las más externas (fotorreceptores) hasta las más internas (células ganglionares). En mamíferos, RGR se expresaría en epitelio pigmentario y células gliales de Müller, con excepción del ratón donde RGR solo se expresaría en el EPR. La expresión en todas las capas de la retina de pollo es consecuente con su expresión en células de Müller, ya que estas se extienden a lo largo de toda la retina (Bringmann y *col.* 2006). Ya que RGR se expresa también en EPR, utilizamos un anticuerpo contra un marcador de EPR: RPE65, enzima clave del ciclo visual. Solo se observó marca en las muestras provenientes de fotorreceptores contaminados con EPR, lo cual nos indica que RGR presente en la demás muestras provenía específicamente de RGR presente en la retina y no por contaminación con EPR. Además, también se observó la expresión de RGR en retinas de pollos GUCY1 los cuales carecen de fotorreceptores (Cheng y *col.* 1980). En nuestro laboratorio se investigó sus funciones no visuales y se demostró que su retina interna es funcional a pesar de la degeneración de los fotorreceptores (Valdez y *col.* 2009). Por último se encontró que RGR se expresa en retinas de embriones de 8 días de incubación (Figura 16, Retina E8). En este estadio las células gliales de Müller aún no se desarrollan y las células ganglionares son post mitóticas y completamente diferenciadas (Doh y *col.* 2010).

RGR se expresa en células Gliales de Müller en retinas de pollo de 7 días y en células neurales de estadios embrionarios.

En humanos y bovinos RGR se expresa en el EPR (Pandey y *col.* 1994, Shen y *col.* 1994) mientras que en roedores se reportó que solo se expresa en EPR (Tao y *col.* 1998). Existen pocas referencias acerca de la expresión de RGR en aves, el único reporte existente muestra la expresión del ARNm en el EPR y en la capa de células ganglionares (CCG) (Bailey y *col.* 2004). Utilizando el mismo anticuerpo dirigido contra RGR realizamos

inmunotinciones fluorescentes para determinar el tipo celular que expresa RGR en la retina de pollo (Figura 17, 18 y 19)).



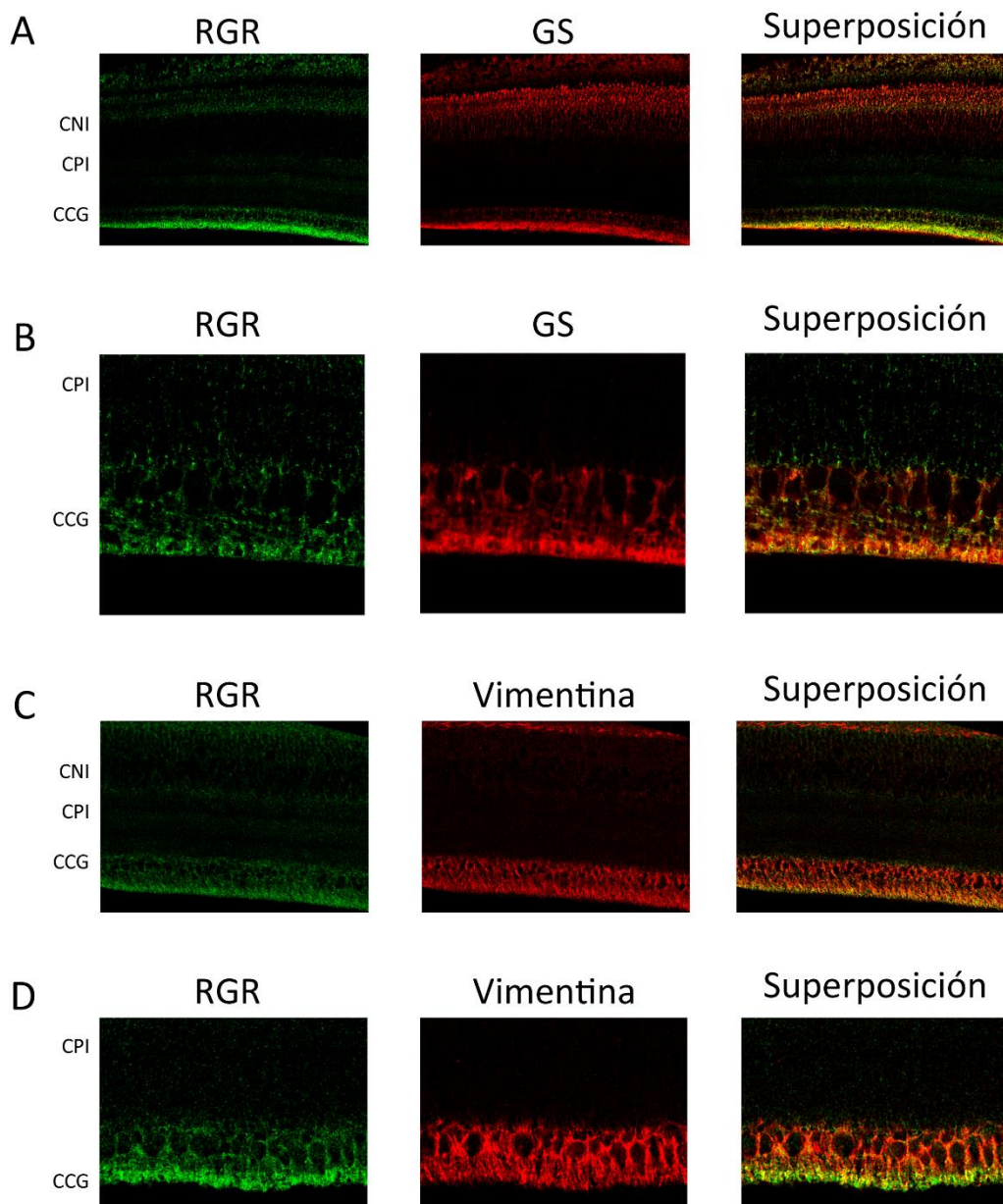
**Figura 17:** Inmunofluorescencia de RGR en retina de pollos de 7 días de edad. Se observa una fuerte marcación (en verde) en la capa de células ganglionares (CCG) y neurofilamentos (NF). Los núcleos se tiñeron con Hoescht (marca azul). Se observa marca tenue en las otras capas de la retina, capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme externa (CPE), Capa nuclear externa (CNE), Segmentos Externos (SE) y epitelio pigmentario retinal (EPR). Aumento 200X

Por Inmunofluorescencia de la retina de pollo se detectó una intensa señal en la zona correspondiente a la capa de células ganglionares y en el epitelio pigmentario retinal; también se observó una marca más débil a lo largo de retina. Dentro de la capa de células ganglionares existen diferentes tipos celulares, como su nombre indica las células mayoritarias son las células ganglionares, pero también podemos encontrar células amácrinas desplazadas y los segmentos terminales de las células gliales de Müller o “pies”. Se detectó una intensa marcación en la zona de los fotorreceptores (SE), esta marca es inespecífica y es debida a la presencia de autofluorescencia en la retina, ocasionada por la presencia de pigmentos (retinoides, carotenoides, etc).

## RGR se expresa en las células gliales de Müller

Para identificar el tipo celular que expresa RGR realizamos una doble Inmunofluorescencia contra RGR y diferentes marcadores. En base a reportes previos (Jiang y *col.* 1993, Pandey y *col.* 1994) y a los resultados anteriormente expuestos decidimos utilizar marcadores de células gliales de Müller. Se comparó la expresión de RGR respecto a dos marcadores, Glutamina Sintetasa (GS) y vimentina. Glutamina sintetasa es una enzima encargada de metabolizar el glutamato y el amonio para formar glutamina, este proceso es llevado a cabo en la células gliales del sistema nervioso. Mientras que vimentina es un filamento intermedio específico de las células gliales.





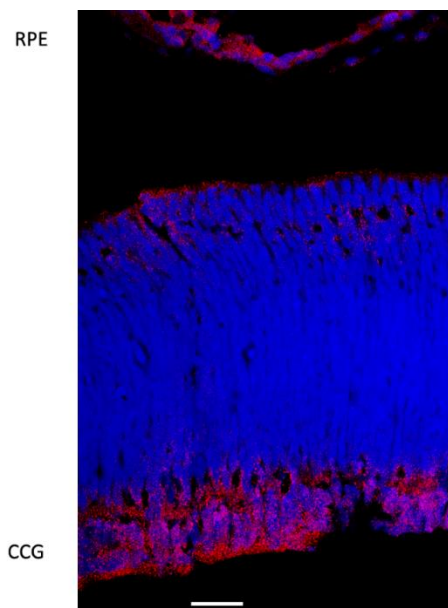
**Figura 18: Colocalización de RGR con marcadores de células de Müller.** **A** Inmunohistoquímica para RGR (verde) y glutamina sintetasa (GS; Rojo) aumento de 600X. **B** Magnificación de la imagen A en la capa de células ganglionares (CCG). **C** Inmunohistoquímica para RGR (verde) y vimentina (Rojo). Magnificación 600x. **D** Magnificación de la imagen C en la capa de células ganglionares. CNI= capa nuclear interna, CPI= capa nuclear interna, CCG= capa de células ganglionares.



Por medio de microscopía de fluorescencia confocal se puede observar una gran colocalización de GS y Vimentina con RGR, principalmente en la zona de los pies de las células de Müller (Figura 18). Este resultado concuerda con los resultados previamente reportados en bovinos y humanos (Pandey y *col.* 1994). Los pies terminales de las células de Müller están rellenos de retículo endoplasmático liso altamente empaquetado, en el retículo endoplasmático liso se lleva a cabo las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo lipídico.

## Expresión de RGR en retina de embriones de pollo

Por medio de western blot se encontró la expresión de RGR en homogenatos de retinas embrionarias de 8 días de desarrollo (Figura 16). Por esta razón se estudió la expresión de RGR en retina de embriones de 8 días.



**Figura 19: Expresión de RGR en retina embrionaria de 8 días.** Inmunohistoquímica para RGR en retina de 8 días de desarrollo. Se observa expresión en la zona de las células ganglionares mientras que la expresión es minoritaria en la capa de neuroblastos. Barra de escala= 50  $\mu$ m. CCG= capa de células ganglionares, EPR= epitelio pigmentario retinal.

Por medio de inmunohistoquímica se detectó una expresión diferenciada de RGR en la zona de las células ganglionares. En esta etapa del desarrollo embrionario de la retina las células ganglionares son las primeras en madurar y terminar su ciclo de mitosis (Mey y col. 2000, Doh y col. 2010). En el corte de retina de 8 días se puede observar claramente que la capa de células ganglionares está diferenciada de los neuroblastos que darán origen a los otros linajes celulares (Figura 19). Por otra parte se observa una clara expresión de RGR en el epitelio pigmentario retina (EPR), el cual se encuentra desarrollado desde un estadio embrionario temprano (Steinfeld y col. 2013), este resultado es concordante con lo previamente reportado. Por otra parte la expresión de RGR en la capa de células ganglionares no había sido reportada previamente. En este estadio las células gliales de Müller no se han diferenciado. Esta glía radial recién completa su desarrollo en el día 18 de gestación (Doh y col. 2010).

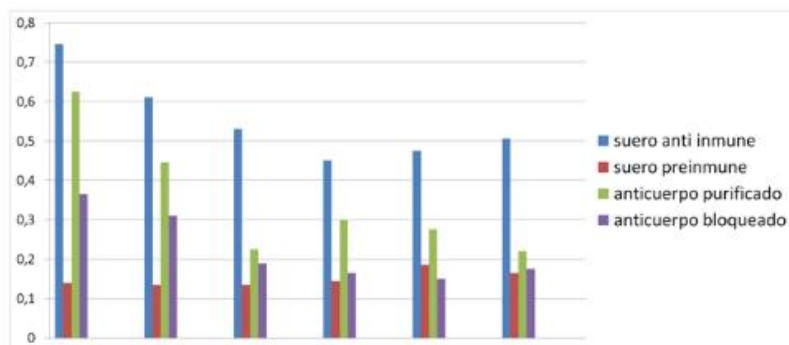
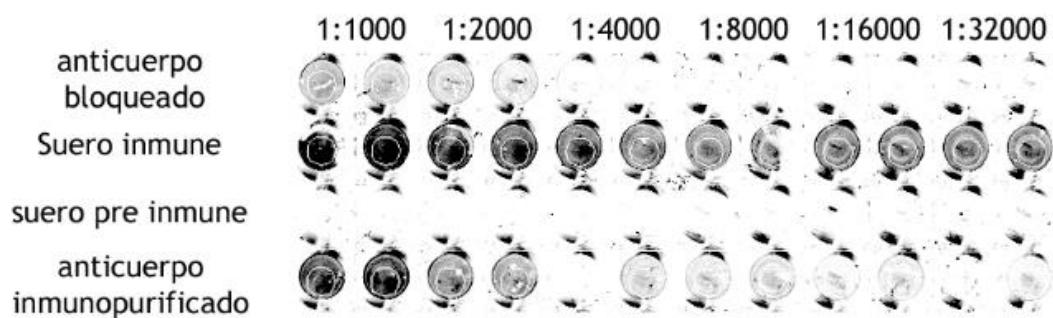
## Purificación de células ganglionares a partir del método de “inmuno plaqueo”

Debido a la observación de la expresión de RGR en la capa de células ganglionares de la retina embrionaria de 8 días se decidió abordar esto último a través de cultivos neuronales de células. Para purificar las células ganglionares se utilizó la técnica de inmuno plaqueo o en inglés “immunopanning”. Basándonos en trabajos previos del laboratorio (Contin y col. 2006, Contin y col. 2010) y literatura de otros laboratorios (Brocco y col. 2002, Hartwick y col. 2007, Winzeler y col. 2013) se realizó la purificación de las células ganglionares. A diferencia de los trabajos previamente citados, en nuestro estudio se seleccionaron las células ganglionares que expresan la proteína melanopsina X a partir de un anticuerpo específico dirigido contra una sección extracelular de la proteína. La utilización del anticuerpo anti melanopsina X no fue arbitraria, ya que utilizar cultivos enriquecido en melanopsina X nos facilitara estudiar el metabolismo de retinoides en estas células y la implicancia de RGR en el mismo.

## Validación del anticuerpo anti melanopsina X

Se diseñó un anticuerpo dirigido contra la opsina melanopsina X. El anticuerpo fue producido por la empresa Bethyl laboratorios. La secuencia peptídica que se utilizó como epítopo fue la siguiente: NH<sub>2</sub>-RQKRDLLPDSYSCSEE-COOH.

Para confirmar el correcto funcionamiento del anticuerpo, el mismo fue validado por diversas técnicas.

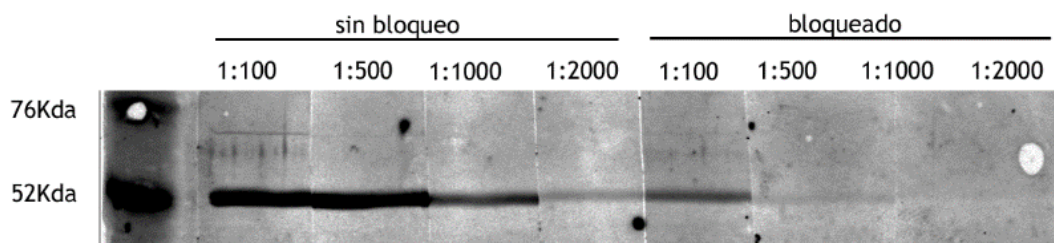


**Figura 20:** Validación y titulación del anticuerpo contra Melanopsina X por medio de la técnica de FLISA (Fluorescence-linked immunosorbent assay). Panel superior: titulación del anticuerpo por medio de FLISA. Panel inferior: cuantificación densitométrica de los pocillos.

Por medio de la técnica de FLISA se determinó que el suero de los animales inyectados poseían un alto título (>1:32000), mientras que el suero pre inmune no poseía título. Por otra parte debido que el suero posee uniones inespecíficas de anticuerpos policlonales, se procedió a purificar los anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido de melanopsina X por medio de una columna de sefarosa unida al péptido. El anticuerpo purificado poseía un título menor que el suero inmune ( $\approx$ 1:8000) pero mayor al suero

preimmune (Figura 20). Finalmente se incubó una alícuota de anticuerpo purificado con 100  $\mu$ M del péptido diseñado como epítipo y se realizó el ensayo de FLISA (Figura 20, anticuerpo bloqueado). Por medio de este tratamiento se observó que el anticuerpo pretatado con péptido se vio bloqueado específicamente con el péptido antigénico disminuyendo su título (1:2000). Mediante este ensayo determinamos que el anticuerpo reconoce el péptido antigénico para el cual fue diseñado.

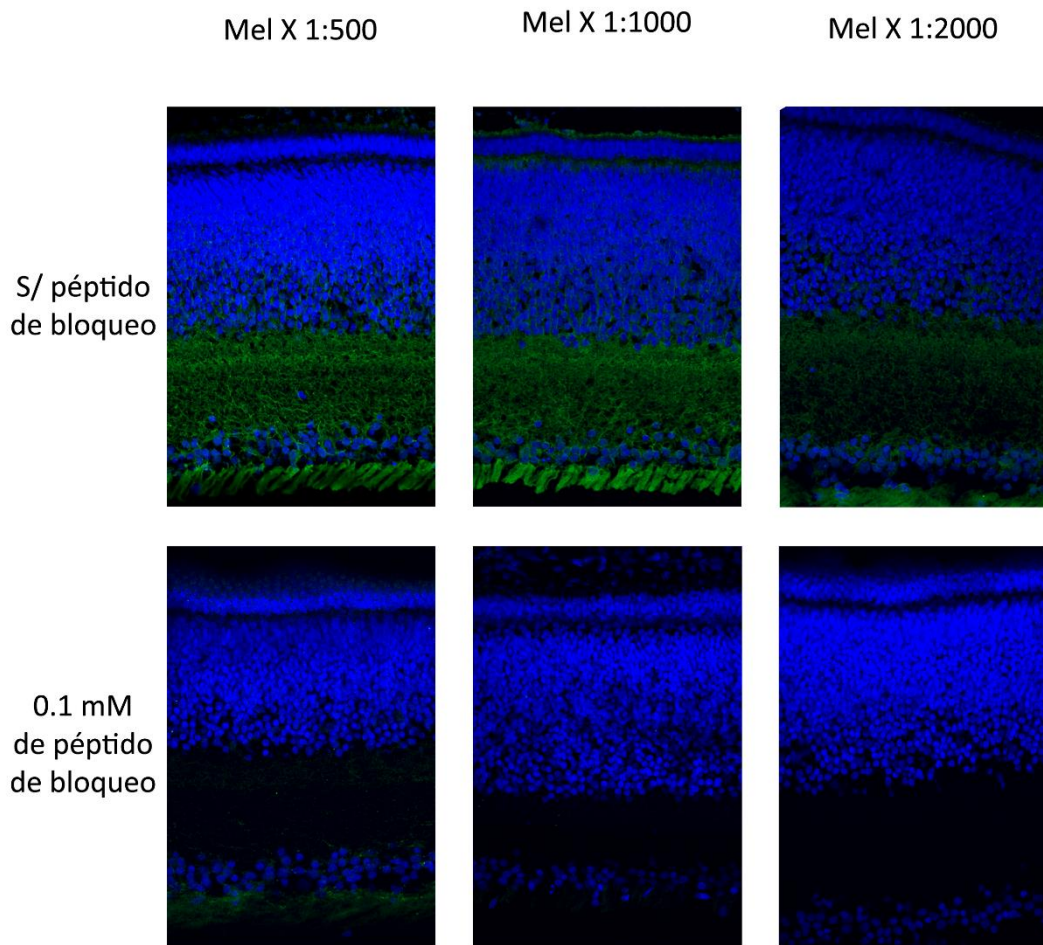
Por otra parte se realizó la validación del anticuerpo por medio de la técnica de western blot para determinar la concentración adecuada y su especificidad (Figura 21).



**Figura 21: Validación del anticuerpo anti melanopsina X por western blot.** Western blot utilizando anticuerpo anti melanopsina X. se utilizaron diferentes concentraciones del anticuerpo que van desde 1 en 100 hasta 1 en 2000. Al mismo tiempo se pre trató el anticuerpo con el péptido antigénico (“bloqueado”).

Por medio de la técnica de western blot se determinó que el anticuerpo inmunopurificado tiene una alta especificidad, encontrando solo una banda marcada con un peso aproximado a 52 KDa (en relación al marcador de peso molecular) que es cercano al peso molecular *in silico* de la versión corta de melanopsina de 48 KDa. A su vez utilizando altas concentraciones de anticuerpo (1 en 100) se pudo distinguir una tenue banda cercana a los 60 KDa que muy cercano al peso molecular de la versión larga de melanopsina X. Asimismo, por medio del bloqueo con el péptido antigénico se disminuyó la unión del anticuerpo siendo casi indetectable a una dilución de 1 en 500.

Debido a que la técnica de western blot detecta proteínas desnaturalizadas por calor y SDS, se realizó la validación del anticuerpo en condiciones nativas como lo son en el tejido y en cultivos de células ganglionares.

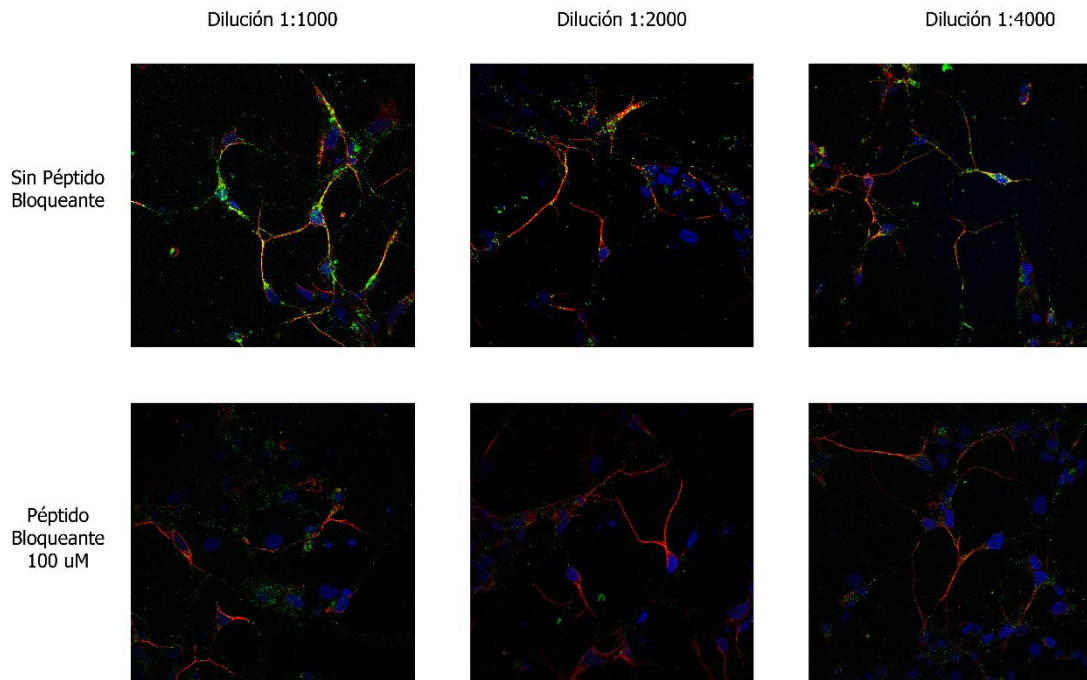


**Figura 22:** Validación del anticuerpo anti melanopsina X por inmunohistoquímica. Paneles superiores, inmunohistoquímica de retina de pollo de 7 días con el anticuerpo anti melanopsina X (marcación en verde) con diferentes diluciones de anticuerpo (1:500; 1:1000; 1:2000). Paneles inferiores, inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti melanopsina X previamente bloqueado con el péptido antigénico.

Mediante inmunohistoquímica en retinas de pollos postnatales se determinó que el anticuerpo purificado tiene un título aceptable hasta 1 en 2000. Se detectó marcación a lo largo de la retina con una fuerte marcación en células ganglionares lo cual es concordante con resultados previamente reportados (Tomonari *y col.* 2005, Bellingham *y col.* 2006, Davies *y col.* 2011, Verra *y col.* 2011). Por su parte cuando el anticuerpo fue pretratado con el péptido antigénico o de bloqueo se vio drásticamente disminuida la

marcación del mismo, obteniendo un resultado similar al obtenido por western blot (Figura 22).

A su vez se realizó el mismo ensayo utilizando cultivos de células ganglionares.



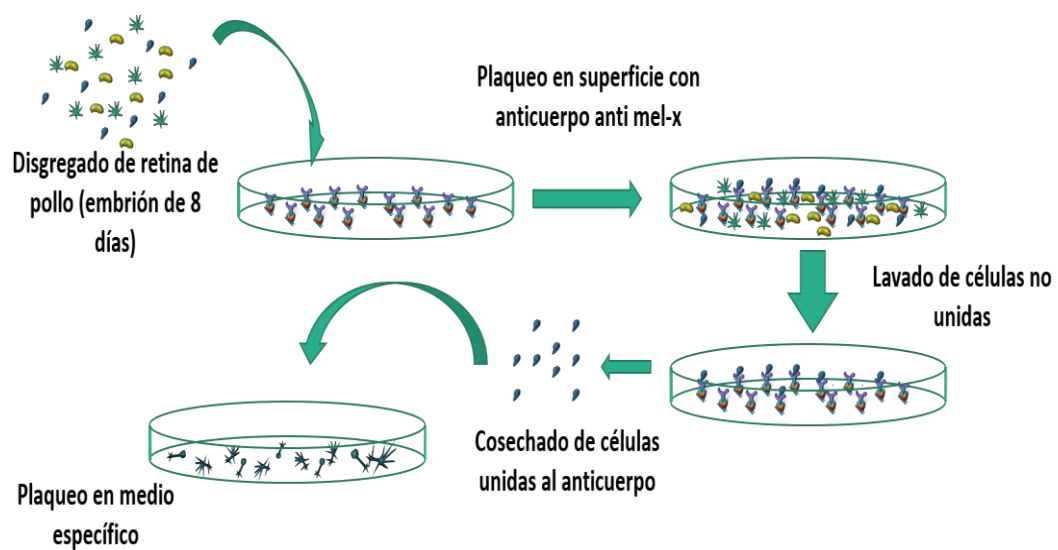
**Figura 23:** Validación de anticuerpo anti melanopsina X por inmunocitoquímica. Paneles superiores, inmunocitoquímica de cultivos de células ganglionares en cultivo. Se puede observar la marcación de melanopsina (verde), tubulina denotando la estructura celular (rojo) y núcleos (azul). Paneles inferiores, inmunocitoquímica para melanopsina X utilizando el anticuerpo bloqueado con el péptido antigénico.

Realizando inmunocitoquímica en cultivos de células ganglionares de retina se obtuvo un resultado similar al obtenido por medio de inmunohistoquímica. La marcación con el anticuerpo se vio drásticamente disminuida mediante el bloqueo con el péptido inmunogénico. Por lo tanto el anticuerpo es específico para el péptido perteneciente a melanopsina X y presenta una localización en la membrana celular lo cual es útil para la purificación posterior de células que expresan la proteína melanopsina X mediante inmunopaneos.



## Caracterización de los cultivos de células ganglionares enriquecidos en melanopsina X

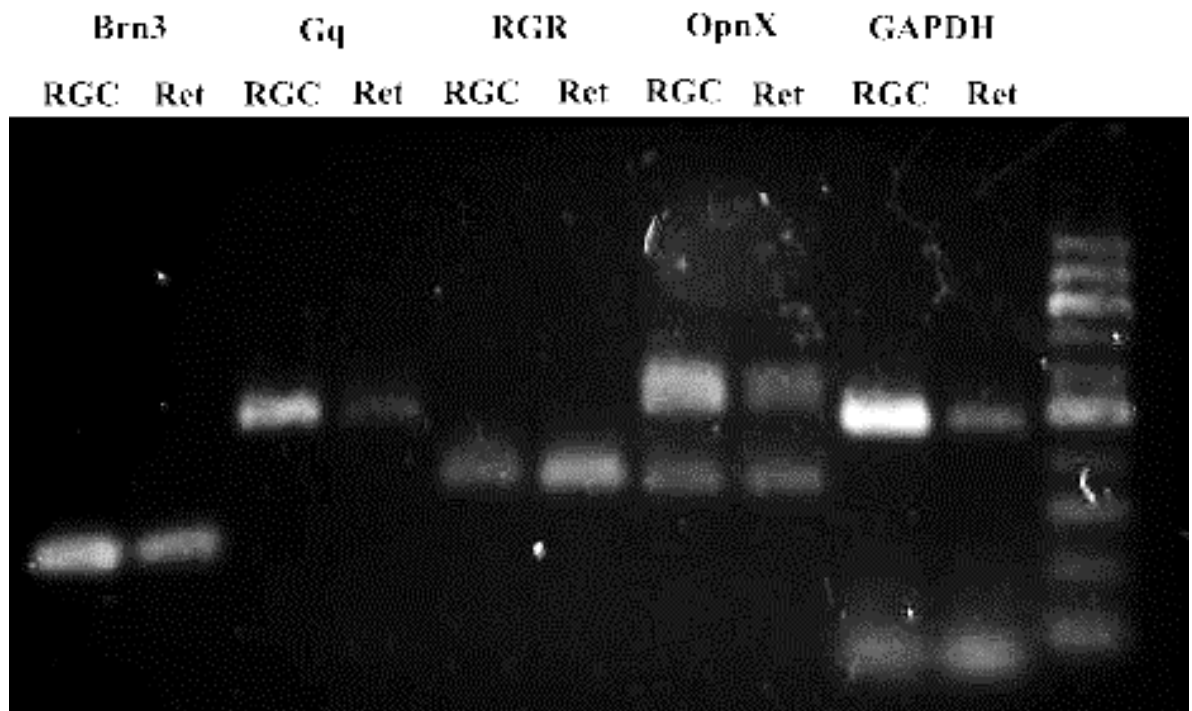
Utilizando el anticuerpo anti melanopsina previamente validado y basándonos en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Contin y *col.* 2006) y de la literatura (Hartwick y *col.* 2007, Winzeler y *col.* 2013) se procedió a inmunopurificar las células ganglionares por medio del siguiente protocolo (Figura 24):



**Figura 24:** Protocolo de inmunopurificación de células ganglionares que expresan melanopsina X. Resumen del protocolo de inmunopurificación por paneo o “immunopanning”. El mismo se encuentra desarrollado en la sección de materiales y métodos, Cultivo enriquecidos en células ganglionares que expresan melanopsina X (OPN4X).

Las células obtenidas por medio de este procedimiento fueron caracterizadas mediante marcadores específicos para determinar el tipo celular. Por medio de RT-PCR se determinó la presencia de los transcritos de diferentes marcadores de linaje celular (Figura 25).

Los cultivos expresan el factor de transcripción Brn3, el cual es un factor de transcripción importante para el desarrollo y maduración de las células ganglionares (Liu y *col.* 2000, Badea y *col.* 2009) y es ampliamente utilizado como un marcador de células ganglionares (Nadal-Nicolas y *col.* 2009).

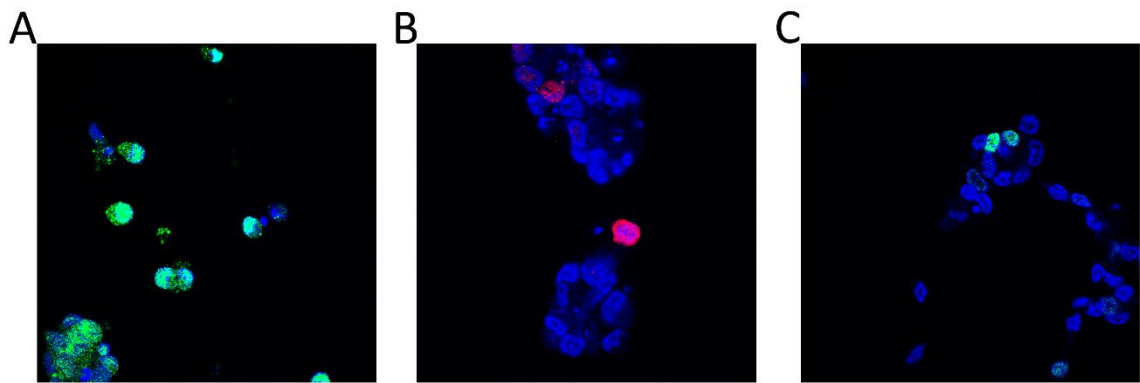


**Figura 25: Caracterización de cultivos por RT-PCR.** Expresión de diversos transcritos de marcadores celulares. Gel de agarosa al 2%, se determinó la expresión del factor de transcripción Brn3, la proteína G q (Gq), el receptor acoplado a proteína G de la retina (RGR), Melanopsina X (Opn4X) y GAPDH. RGC= cultivo de células ganglionares; Ret= retina.

Por otra parte estos cultivos celulares expresan el transcritos de la proteína Gq, la cual se ha visto involucrada en la respuesta de fotorreceptores rabadómicos y células ganglionares fotosensibles (Terakita y *col.* 2008), lo cual daría indicio de la presencia de la maquinaria de fototransducción. A su vez se detectó la presencia de transcritos de melanopsina X (Opn4X), tanto la isoforma larga como la corta (Bellingham y *col.* 2006) y finalmente se detectó la presencia de la opsina RGR, lo cual es concordante con los resultados obtenidos por western blot e inmunohistoquímica de retinas de 8 días de desarrollo para esta proteína (Figura 16 y 19).

Para determinar que otros linajes celulares estaban presentes en los cultivos se realizaron estudios de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra diferentes marcadores celulares.

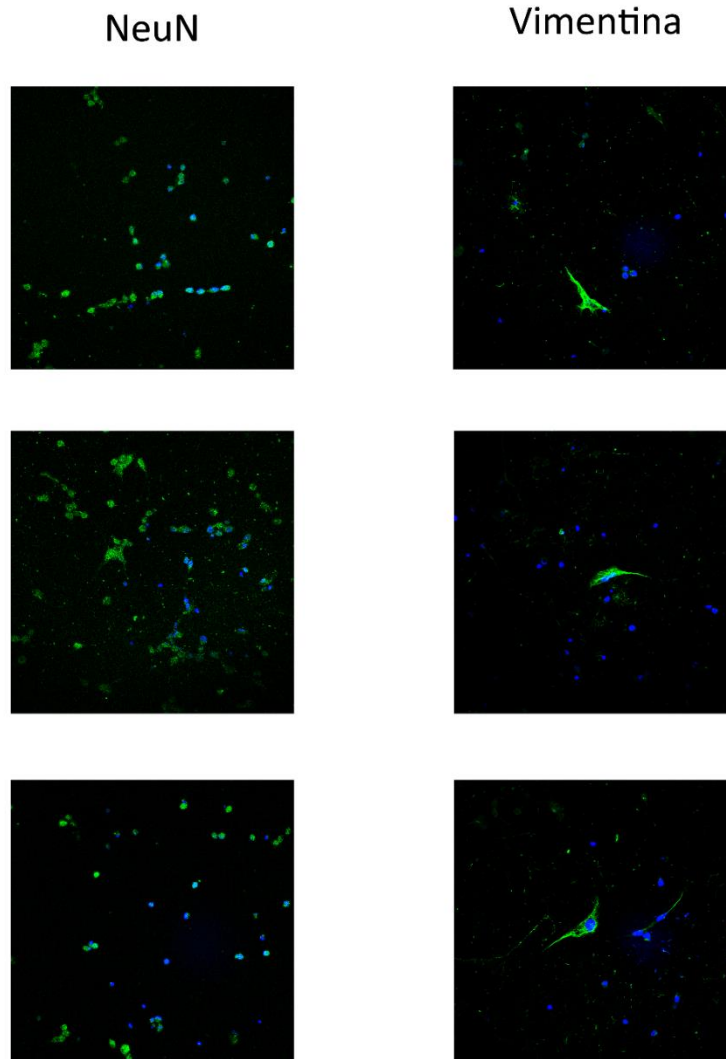




**Figura 26: Expresión de marcadores de linaje celular en los cultivos celulares.** A. inmunomarcación con el anticuerpo anti NeuN (verde) y núcleos (azul). B inmunomarcación con anticuerpo anti GABA (rojo). C. inmunomarcación con anticuerpo anti PROX-1 (verde). Magnificación 600X.

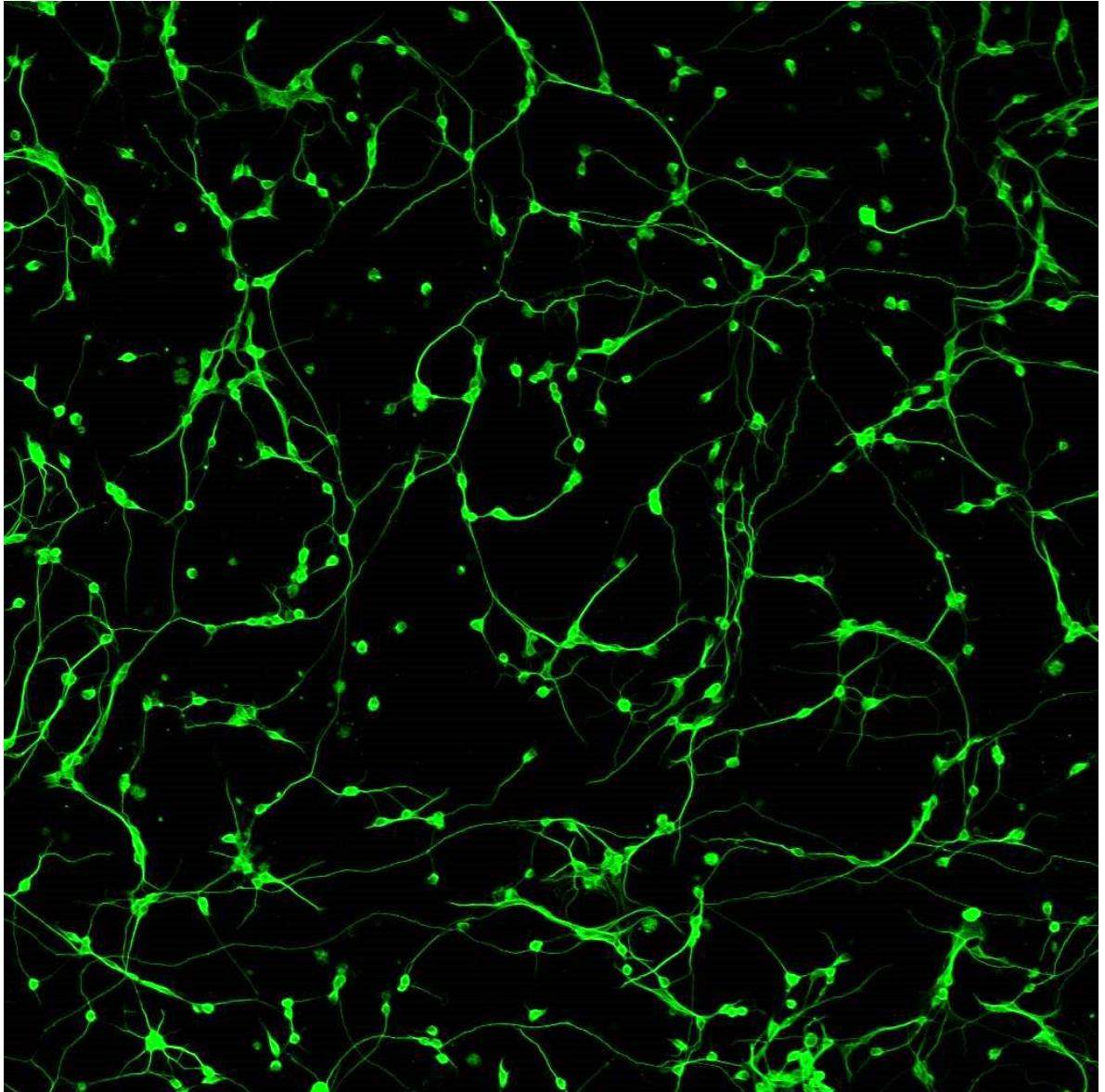
Por medio de inmunocitoquímica se determinó que los cultivos purificados expresan mayoritariamente el factor de transcripción NeuN, el cual ha sido utilizado ampliamente como marcador de células ganglionares (Johansson y *col.* 2010). Por otra parte se detectó una muy baja expresión (inferior al 1% de la población celular) de otros marcadores de la retina interna como son GABA, el cual marca células GABAérgicas tales como las células amácrinas y horizontales de la retina (Koontz y *col.* 1993) , y el factor de transcripción PROX-1, un marcador característico de células horizontales(Dyer y *col.* 2003) (Figura 26).

Se cuantifico el porcentaje de células que expresaban el marcador NeuN y se obtuvo que el  $85,54 \pm 5,97$  % de las células en el cultivo expresaban el marcador a su vez las células presentan morfología típica de células neuronales (núcleos pequeños, neuritas). Por otra parte el  $3,37 \pm 0,77$  % de las células cultivadas expresaban el filamento intermedio vimentina, el cual es una característica de las células gliales. Las células que expresan vimentina poseían morfología de células gliales con núcleos prominentes y citoplasma considerablemente superior al de las demás células (Figura 27).



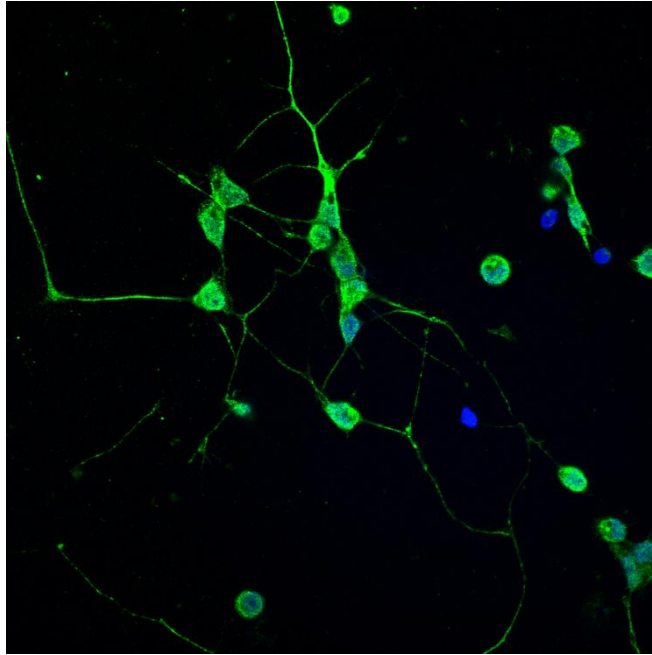
**Figura 27: Expresión de marcadores de células ganglionares y células gliales de Müller.** Columna izquierda. Expresión de la proteína NeuN (verde) en los cultivos purificados. Columna derecha. Expresión del filamento intermedio vimentina (verde) en cultivos purificados. El  $85,54 \pm 5,97$  % de las células contadas en el cultivo expresaron NeuN mientras que el  $3,37 \pm 0,77$  % expresaron vimentina.  $n=3$  (experimentos independientes). Aumento de 400X.

Sumado a la expresión de los marcadores celulares se analizó la morfología de las células pertenecientes a los cultivos (Figura 28).



**Figura 28: Morfología de los cultivos.** Morfología típica de las células presentes en los cultivos primarios de retina de embriones de 8 días, inmunomarcación para el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina. Aumento 400X.

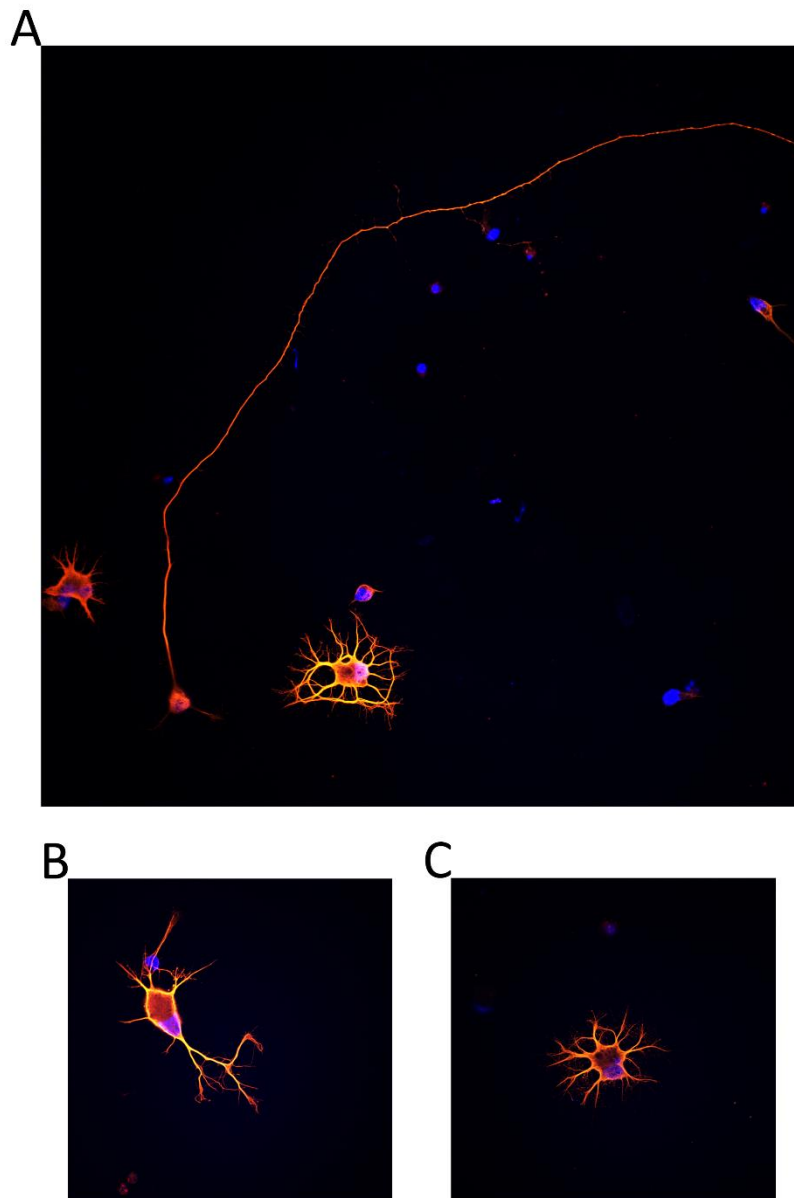
Por medio de la Inmunotinción del citoesqueleto de las células se determinó que la mayoría de las células presentaban una morfología típica de células neuronales con largos axones y dendritas.



**Figura 29:** Expresión de Neurofilamento 200 KDa (NF-200) en cultivos primarios de células retinales inmunopurificadas. Inmunocitoquímica para NF-200 (verde) y núcleos (azul). Aumento 600X.

Debido a que  $\alpha$ -tubulina no es una proteína específica se utilizó un anticuerpo específico contra el neurofilamento de 200 KDa (NF-200). Gran parte de las células dentro del cultivo expresaron NF-200 (Figura 29).

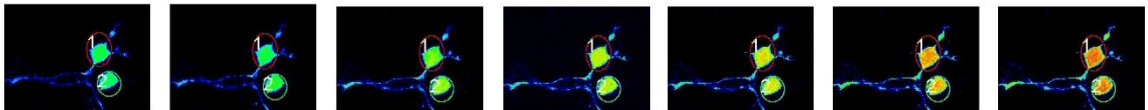
Como era de esperar y respaldando los resultado obtenido por RT-PCR (Figura 25) los cultivos primarios obtenidos expresan la opsina melanopsina x (Figura 30).



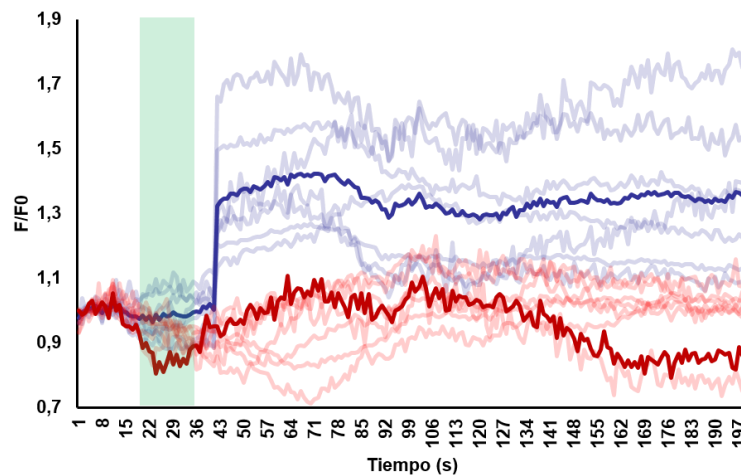
**Figura 30: Expresión de melanopsina X (Opn4X) en los cultivos primarios.** Inmunocitoquímica de doble marcación que demuestra la expresión del Melanopsina (rojo) en las células en cultivo. A su vez se observa la morfología de las células (verde): **A.** se pueden observar células con prolongados axones; **B.** células con Axones cortos; **C.** células con un axón definido y una amplia arborización dendrítica. Aumento en A=400X; aumento en B y C= 1000X

Finalmente se determinó la funcionalidad de los cultivos evaluando su respuesta ante estímulos lumínicos. Esto se llevó a cabo mediante la medición del incremento del calcio intracelular por medio de una sonda fluorescente que varía su intensidad en función de la concentración de este ion intracelular. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para determinar la respuesta fótica de las células ganglionares (Sekaran y *col.* 2003, Hartwick y *col.* 2007, Contin y *col.* 2010, Jones y *col.* 2013) y ayudo a determinar que las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles que expresan melanopsina utiliza una cascada de fototransducción dependiente de fosfoinositidos y fosfolipasa (Contin y *col.* 2006, Graham y *col.* 2008, Contin y *col.* 2010).

A



B



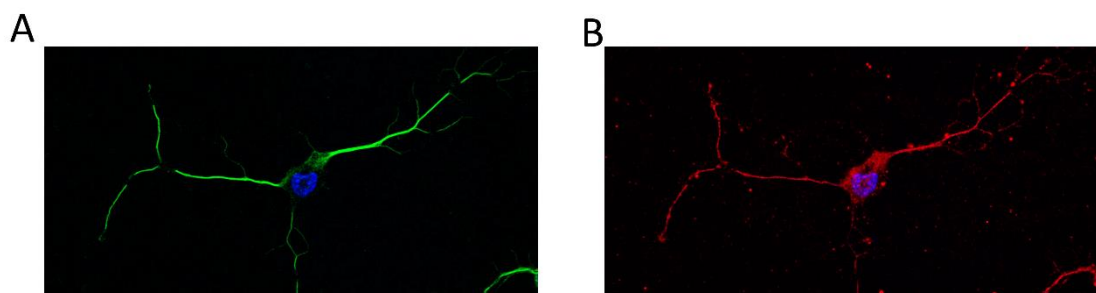
**Figura 31: Fotosensibilidad de las células purificadas en cultivos primarios.** A. imagen pseudocoloreada de células fotosensible demostrando el aumento de calcio intracelular debido a un estímulo lumínico a través de la sonda Fluo4-AM. B. cuantificación del cambio de fluorescencia debido al incremento de calcio intracelular. La línea azul intenso representa el promedio de las líneas azul claro que corresponden a las células ganglionares que respondieron al estímulo lumínico (recuadro verde). La línea rojo intenso corresponde a la repuesta promedio de las células que no respondieron a la luz en el mismo cultivo. Para obtener la respuesta del aumento de calcio ( $F/F_0$ ) se cuantificó la relación entre fluorescencia (F) y la fluorescencia basal ( $F_0$ ; fluorescencia de los 10 primeros segundos).

Las células purificadas por este método presentaron respuesta a la luz incrementando el calcio intracelular. A diferencia de los fotorreceptores clásicos los cuales disminuyen su concentración de calcio intracelular induciendo el cierre de canales gatillados por GMPc, las células ganglionares fotosensibles producen un aumento en los niveles de calcio intracelular (Contin y col. 2006, Hartwick y col. 2007, Graham y col. 2008) lo cual nos indica que las células purificadas son células ganglionares fotosensibles. La respuesta de estas células es larga y sostenida en el tiempo como fue previamente reportado por Contin y col. (Contin y col. 2006, Contin y col. 2010).

Con los resultados anteriores podemos asegurar que los cultivos obtenidos son cultivos altamente enriquecidos en células ganglionares. Por esta razón de ahora en más los llamaremos cultivos de células ganglionares.

## Expresión del receptor acoplado a Proteína G de la Retina (RGR) en células en cultivo.

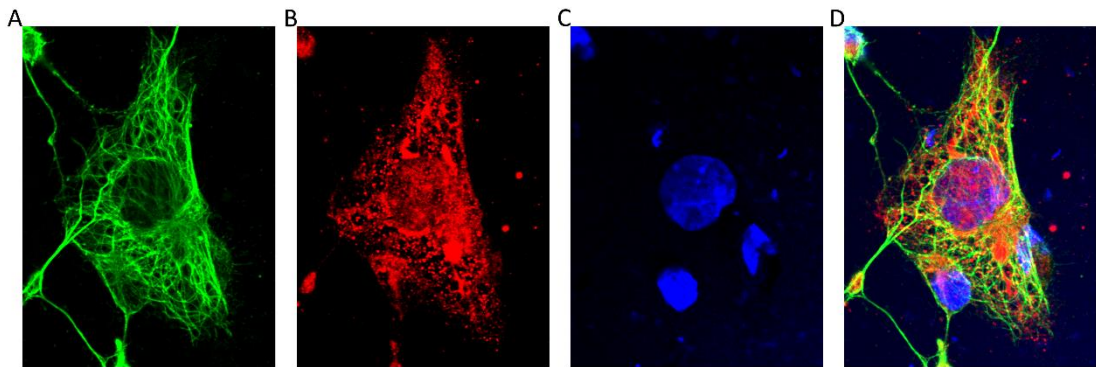
Por medio de RT-PCR se detectó la expresión de RGR en los cultivos de células ganglionares (Figura 25) sumado a los resultados de western blot e inmunohistoquímica obtenidos en retinas embrionarias (Figura 16 y Figura 19) se investigó la expresión de RGR en los cultivos por inmunocitoquímica (Figura 32).



**Figura 32:** Expresión de RGR en células ganglionares inmunopurificadas. **A.** Neurona en cultivo marcada para  $\alpha$  tubulina (verde) y núcleo (azul), se puede observar la morfología celular a través del citoesqueleto. **B.** La misma neurona marcada para RGR (rojo). Aumento 1000X



Se encontró que las células ganglionares en cultivo expresan RGR, a su vez la expresión de RGR se encontró ampliamente distribuida a lo largo del citoplasma de las neuronas a diferencia de tubulina la cual se concentra en los axones y dendritas de las neuronas (Figura 32).



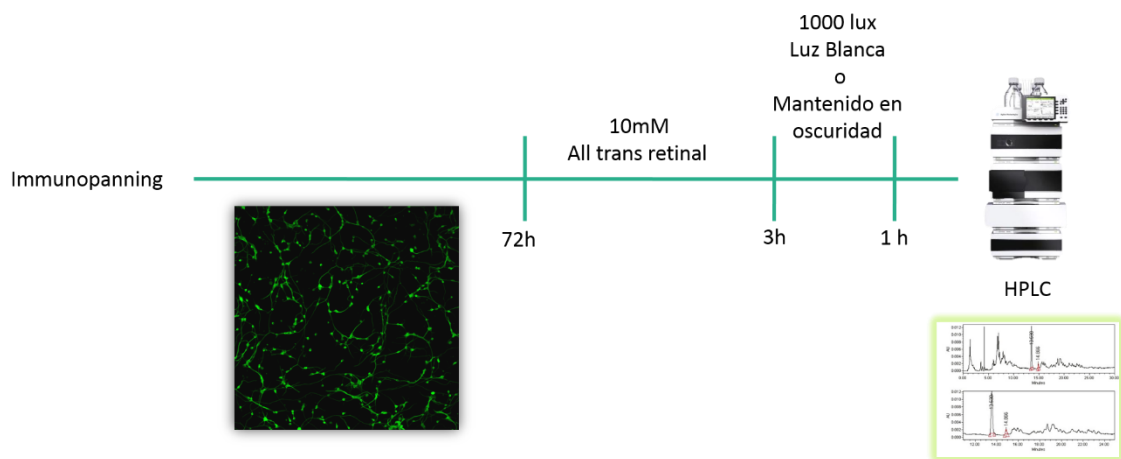
**Figura 33:** Expresión del RGR en células gliales de Müller. A. célula glial marcada con  $\alpha$  tubulina (verde). B. marcación para RGR (rojo). C. tinción del material genético (Hoechst, azul). D. superposición de los canales. Aumento 1000X.

Como previamente se describió, los cultivos poseen una mínima contaminación con células gliales de Müller (Figura 27). Cuando se realizó la inmunocitoquímica en los cultivos se detectó expresión de RGR en las células de Müller como previamente se había reportado (Pandey y col. 1994). Debido a la morfología de las células gliales es más claro discernir la expresión de RGR intracelular posiblemente en su sistema de endomembranas. Fong y col. postuló que en epitelio pigmentario, RGR estaría expresado en el retículo endoplasmático liso, lo cual le permitiría interactuar con las enzimas del ciclo visual. Este es el primer reporte que claramente muestra la expresión de RGR en neuronas en cultivo (Figura 32) y demuestra la expresión de RGR en endomembranas de células gliales de Müller en cultivo (Figura 33).



## Cambios en la composición de Retinoides mediados por la luz.

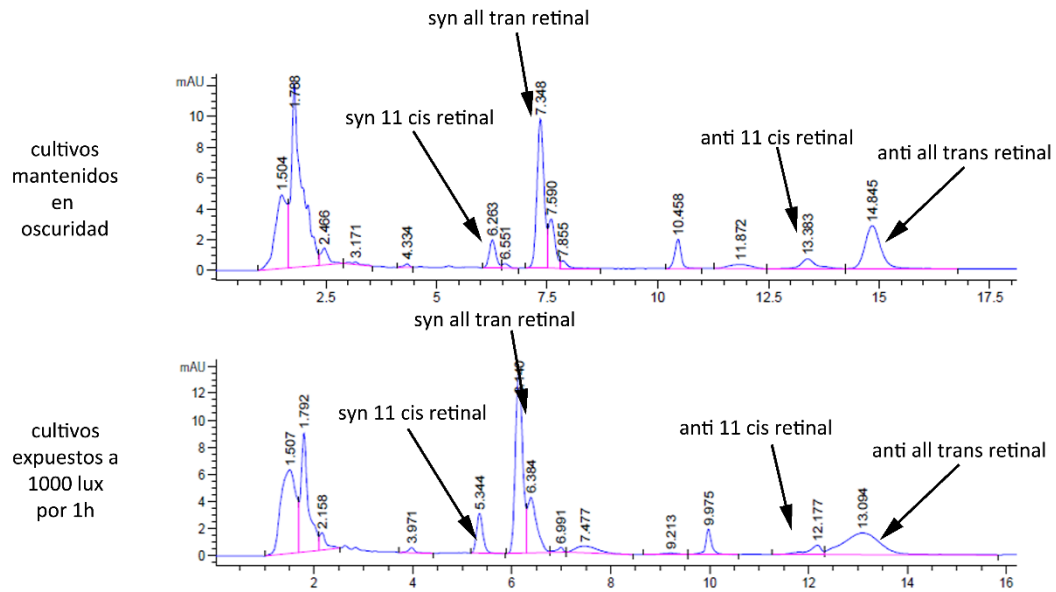
Como se observó previamente la exposición a la luz disminuía la cantidad de 11 cis retinal en la capa de fotorreceptores mientras que en la capa de células ganglionares no se observó un cambio significativo en el contenido de los mismos (Figura 15). En base a estos resultados nos dispusimos a realizar los siguientes experimentos en un sistema más simple como lo es el cultivo primario de células ganglionares, según se detalla en la figura 34.



**Figura 34:** Diseño experimental del experimento de fotoisomerización de retinoides en cultivos de células ganglionares. Brevemente, los cultivos fueron crecidos por 72 hs, transcurrido este tiempo se le adicionó al medio all trans retinal a una concentración final 1,5  $\mu\text{M}$  por 3 hs. Los cultivos fueron lavados y se le agregó medio fresco sin retinal y se expusieron a luz blanca fría de 1000 lux por una hora. Finalmente los cultivos fueron lavados, cosechados y los retinoides extraídos para la determinación por HPLC.

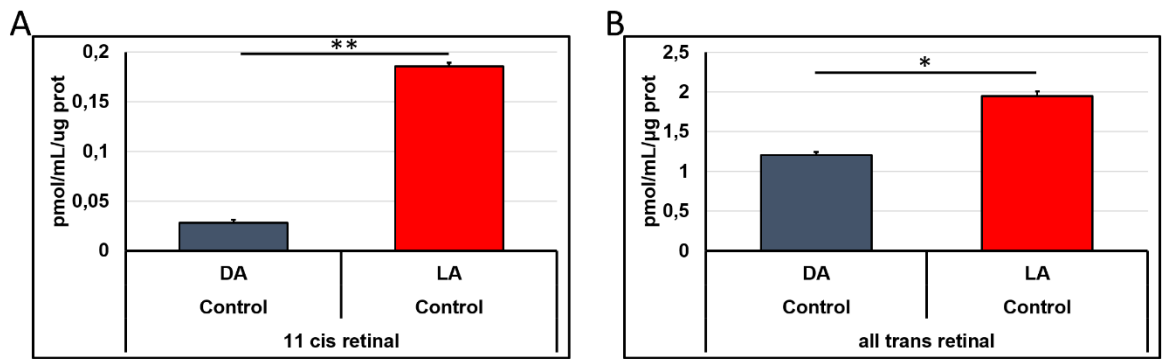
Las cantidades de retinoides endógenos presentes en los cultivos de células ganglionares fue muy bajo, posiblemente debido a que el proceso de purificación y cultivo ex vivo disminuyen los contenidos de retinoides presentes en la células. Es sabido además que la integridad de la retina es necesaria para el funcionamiento de las células ganglionares fotosensibles. Por otro lado, se ha postulado que el epitelio pigmentario y las células gliales de Müller sustentarán de retinal a las CGRif para la síntesis de *novo* de melanopsina (Zhao y *col.* 2016). Por este motivo, se agregó all trans retinal exógeno al

medio y se observó la isomerización del mismo por cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC.



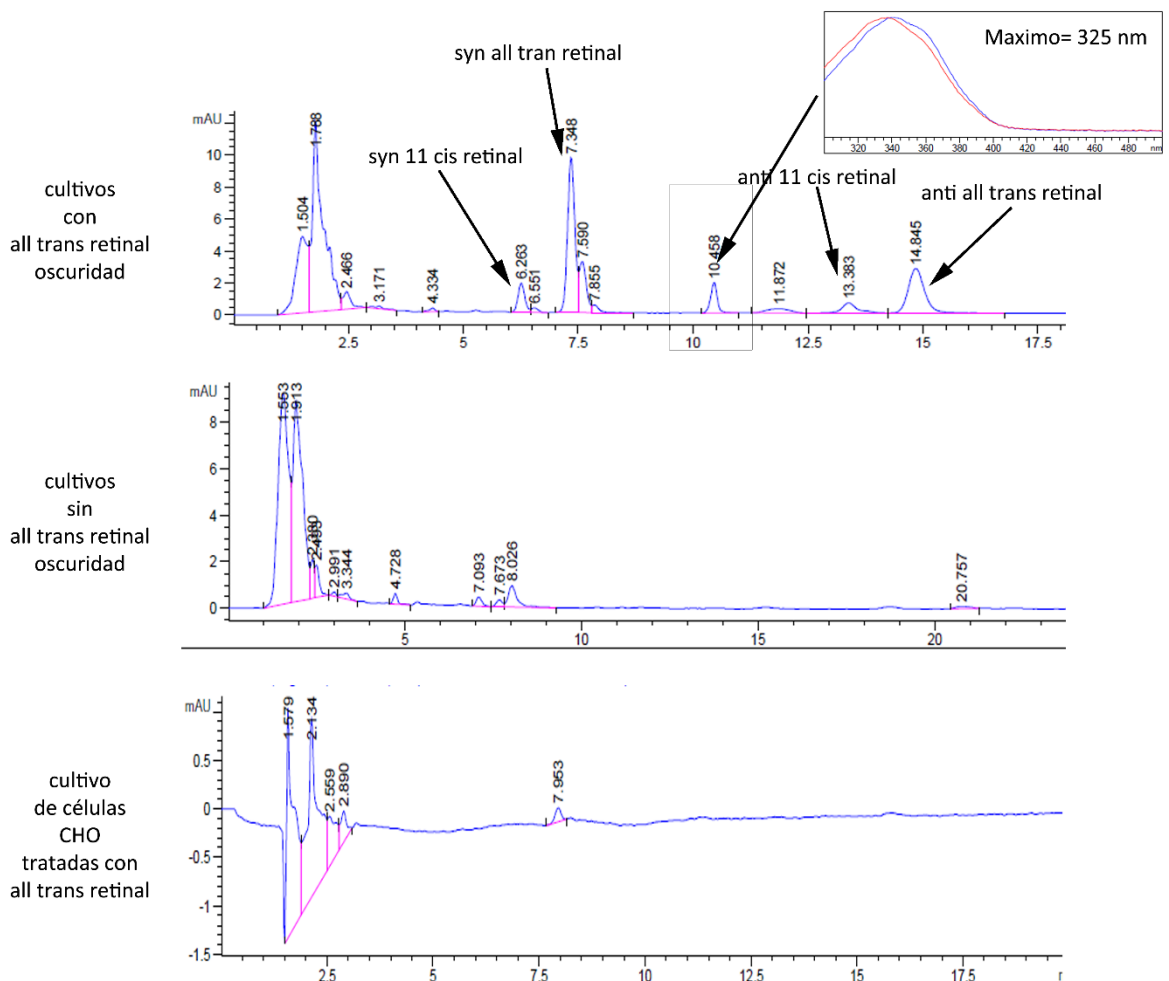
**Figura 35: Cromatograma de un extracto de células ganglionares.** Los retinales extraídos (all trans retinal y 11 cis retinal) con hexano fueron corridos en un equipo de HPLC-UV utilizando una fase móvil de hexano:dioxano 99,5:0,5 a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. Los picos fueron detectados a 360 nm. En el **panel superior** se observa un cromatograma de un cultivo mantenido en oscuridad. En el **panel inferior**, cromatograma representativo de un cultivo expuesto a 1000 lux de luz blanca fría por 1 h. En los cromatogramas se observan los típicos picos correspondientes a las retiniloximas derivadas de los retinaldehído (11 cis retinal y all trans retinal). Los picos fueron comparados con sus respectivos estándares comerciales. La validación del método se desarrolla en el anexo “Puesta a Punto y validación del método de cromatografía líquida para separar isómeros de retinoides”

En los cultivos expuestos a luz se observó un incremento significativo en el contenido de 11 cis retinal luego del agregado de retinal exógeno en comparación a cultivos mantenidos en oscuridad (Figura 36). Esto deja en evidencia un mecanismo de fotoisomerización reversa mediado por la luz que tendría lugar en estos cultivos primarios de células ganglionares.



**Figura 36: Cuantificación del contenido de retinales en los cultivos de células ganglionares.** A. contenido de 11 cis retinal (pmol/mL/μg de proteínas) en condiciones de oscuridad (DA control) y expuesto a 1000 lux de luz blanca fría (LA control). B. contenido de all trans retinal en cultivos de células ganglionares. Estadística prueba T de Student, \* significancia menor al 0.05 ( $p < 0.05$ ); \*\* significancia menor al 0.01 ( $p < 0.01$ );  $n = 3$  (experimentos independientes).

A diferencia de lo esperado se observó un aumento del contenido de all trans retinal respecto al control en oscuridad lo cual nos indica la presencia de un mecanismo diferente a lo observado en una fotoisomerasa clásica.



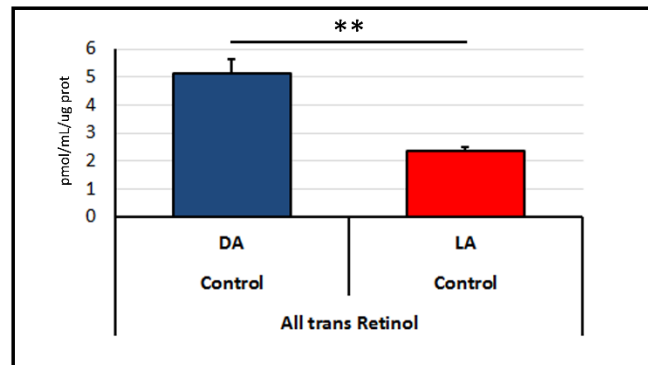
**Figura 37:** Incorporación de all trans retinal y producción de all trans retinal. Panel superior, cromatograma representativo del extracto de células ganglionares en oscuridad con all trans retinal agregado, a los 10,458 min se observa un pico con un máximo de absorción a los 325 nm. Panel central, cromatograma de un cultivo de células ganglionares sin el agregado de all trans retinal exógeno. Panel inferior, cromatograma de un extracto de un cultivo de células CHO con el agregado de all trans retinal.

Cuando se compara el contenido de retinoides presentes en los cultivos suplementados con all trans retinal respecto a aquellos a los cuales no se agregó se encuentra la presencia de un pico con un máximo a 325 nm. Los máximos de absorción de cada retinoide bien conocido y el más cercano a ese máximo corresponde al all trans retinol (Garwin y *col.* 2000), el producto de reducción del all trans retinal. La identidad del pico fue corroborada por comparación con el estándar de all trans retinol.

La mayor parte del all trans retinal agregado al medio es reducido a all trans retinol dentro de la célula. Esta producción de retinol es independiente de la luz, ya que se

produce incluso en células mantenidas en oscuridad. Además es específica de las células de la retina, ya que no se detectó producción de retinol en la línea celular CHO (Figura 37, panel inferior). Estos efectos se pueden deber a un mecanismo de depuración del all trans retinal, el cual es altamente toxico en la células (Chen y *col.* 2012).

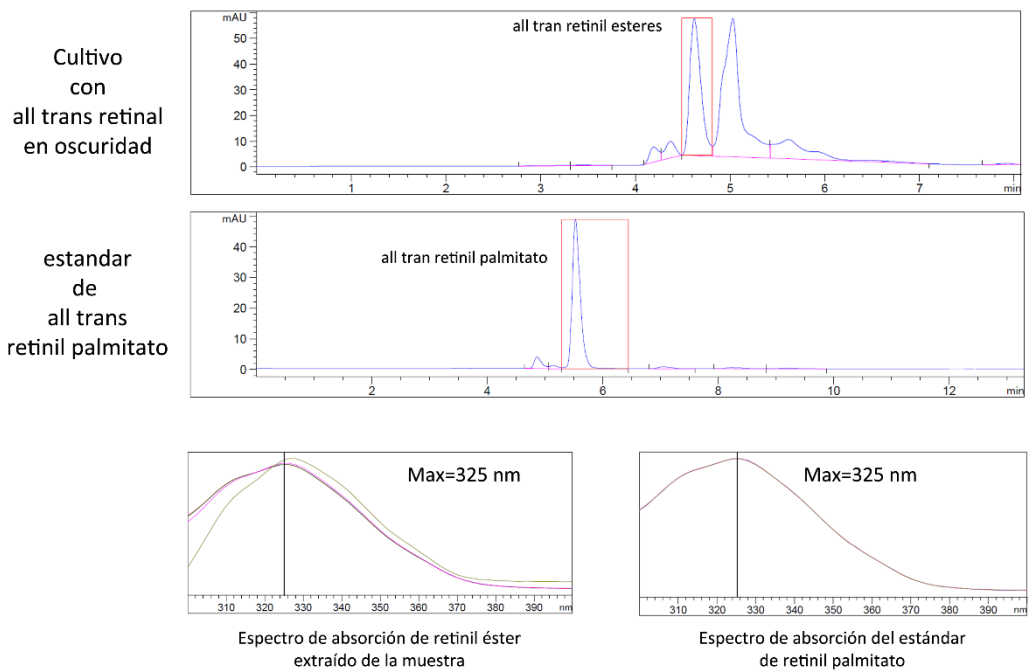
En base a este resultado estudiamos como la luz afecta el contenido del all trans retinol producido a partir del all trans retinal exógeno.



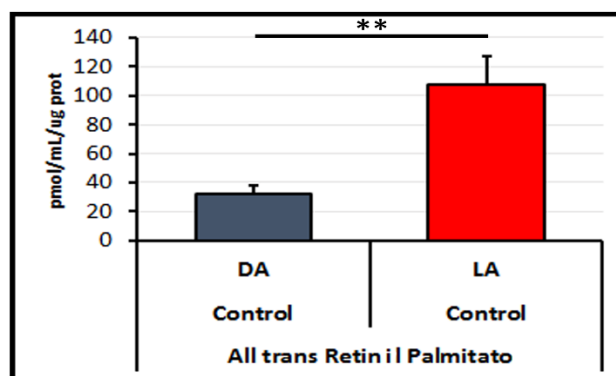
**Figura 38: Cuantificación del contenido de all trans retinol en cultivos de células ganglionares.** Contenido de all trans retinol en células ganglionares en mantenidas en oscuridad (DA control) o expuestas a 1000 lux por 1 h (LA control). \*\*  $p < 0,01$  (prueba T;  $n=3$  (experimentos independientes)).

En los cultivos expuestos a la luz se observó una disminución significativa en el contenido de all trans retinol formado a partir del all trans retinal agregado al medio. La disminución del retinol es concomitante con el incremento de retinaldehídos observados previamente (Figura 36) Estos resultados nos dan indicio de un metabolismo de estos retinoides modificado por luz.

Un retinoide importante dentro del ciclo visual son los ésteres de retinol o retinil ésteres, los cuales funcionan como sustrato para la isomerización de 11 cis retinal en el epitelio pigmentario, también cumplen función de transporte y almacenamiento dentro de la célula debido a su alta hidrofobicidad (O'Byrne y *col.* 2013). A su vez RGR cumple un papel importante en la síntesis y degradación de los retinil ésteres dentro del epitelio pigmentario como lo demostró Radu (Radu y *col.* 2008) modificando el contenido de los mismos por medio de la luz. Por esta razón se cuantificó el contenido de all trans retinil palmitato presente en los cultivos celulares y su variación en presencia de luz.



**Figura 39:** Cromatograma de un extracto de células ganglionares. Los retinil ésteres extraídos con hexano fueron corridos en un equipo de HPLC-UV utilizando una fase móvil de hexano:dioxano 99,8:0,02 a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. Los picos fueron detectados a 325 nm. En el panel superior se observa un cromatograma de un cultivo mantenido en condiciones de oscuridad. Panel inferior, cromatografía de un estándar de retinil palmito, se aprecia que los tiempos de retención no son similares debido a un efecto matriz de la muestra. A pesar de esto el espectro de absorción de la muestra y el estándar son cercanos a 325 nm.



**Figura 40:** Cuantificación del contenido de all trans retinil palmitato en cultivos de células ganglionares. Contenido de all trans retinil palmitato en células ganglionares mantenidas en oscuridad (DA control) o expuestas a 1000 lux por 1 h (LA control). \*\* p < 0,01 (prueba T; n=3 experimentos independientes).

La exposición de las células a luz de 1000 lux por una hora incrementó dramáticamente los niveles de all trans retinil palmitato, lo cual nos indica que la luz estaría activando la síntesis o inhibiendo la degradación de este retinoides.

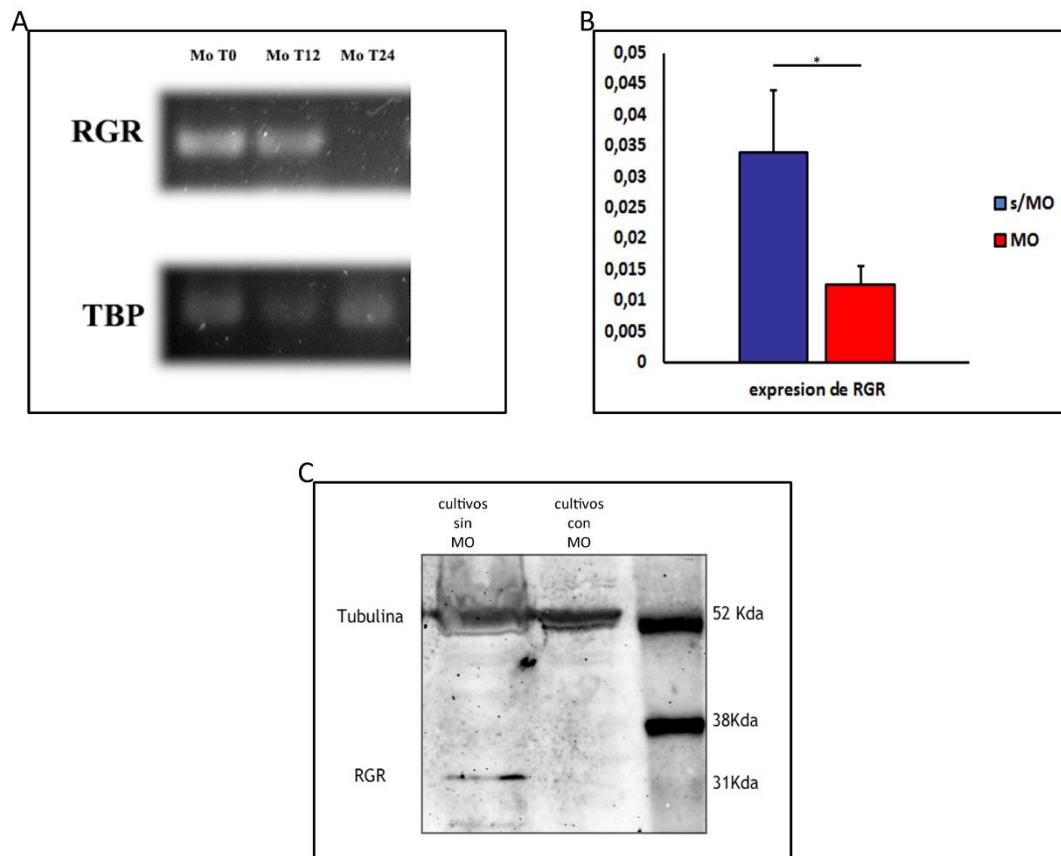
En las células del epitelio pigmentario retinal, RGR cumple un papel importante a la hora de regular el tráfico de ésteres de retinol entre los diferentes compartimentos membranosos de la célula (Radu y *col.* 2008). Se postuló que RGR actuaría como un regulador del metabolismo de ésteres de retinol dependiente de la luz. En nuestros estudios pudimos observar que existen cambios significativos en las concentraciones de retinoides en función de la luz.

Para determinar si RGR está implicado en los cambios observados en la concentración de retinoides se procedió a silenciar la expresión de RGR en los cultivos de células ganglionares.

## Silenciamiento de RGR mediante oligonucleótidos morfolinos

Para silenciar la expresión del gen de RGR se diseñó y se sintetizó un oligonucleótido morfolino (Gene Tools, LLC). La tecnología de oligo morfolino se basa en los oligonucleótidos anti sentido, los cuales bloquean la traducción del ARNm por un impedimento estérico. A diferencia del clásico sistema de silenciamiento mediado por los nucleótidos anti sentido, los oligonucleótidos se encuentran sustituidos en cada base por un anillo morfolino y la unión entre las bases se lleva a cabo por una unión no iónica fosforodiamidato. Estas modificaciones hacen que sea menos susceptible al ataque de ribonucleasas (Blum y *col.* 2015).

Para silenciar las células las mismas fueron transfectadas con lipofectamina 2000 (invitrogen<sup>®</sup>) 24 horas previas a realizar el experimento y se midió la expresión de RGR en el cultivo por RT-PCR, qPCR y western blot.



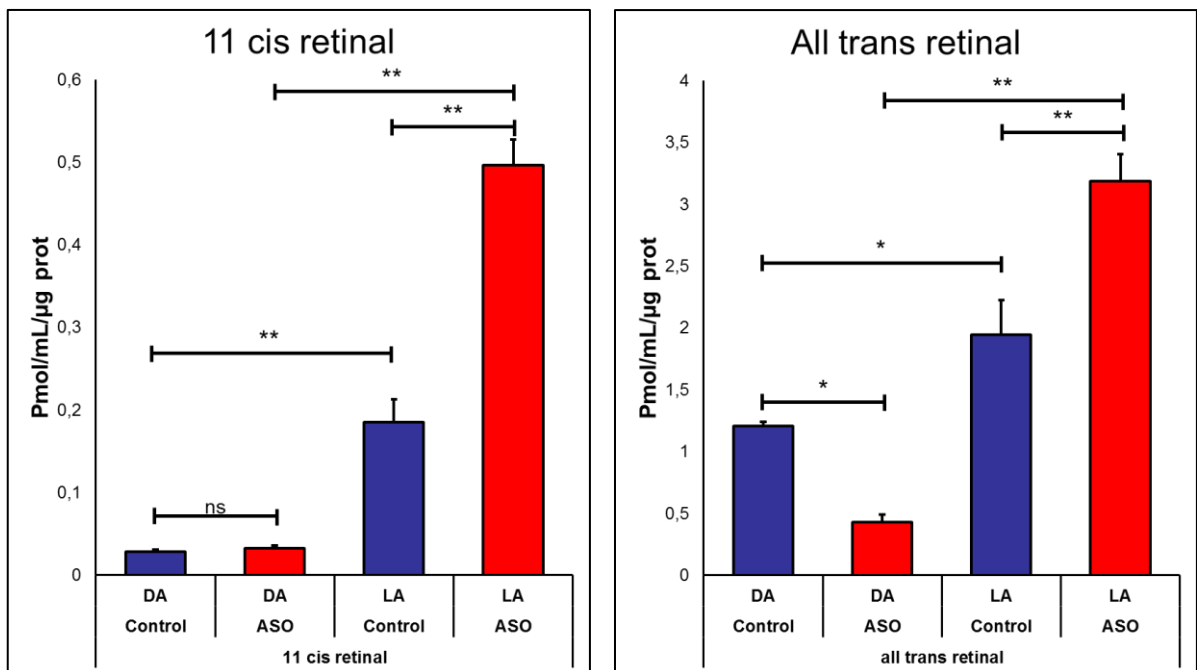
**Figura 41: Silenciamiento de RGR en cultivos de células ganglionares.** **A.** Expresión del mensajero de RGR por RT-PCR evaluado a tiempo 0 (MoT0), 12 h (MoT12) y 24 h (MoT24) y utilizando TATA-binding protein (TBP) como gen normalizador. **B.** Cuantificación de la expresión de RGR por qPCR tiempo-real. **C.** Western blot demostrando el silenciamiento de la proteína RGR. \*  $p < 0.05$  prueba de T;  $n = 3$  experimentos independientes.

Por medio de RT-PCR se determinó que el tiempo óptimo para obtener el máximo silenciamiento de RGR fue 24 h de incubación con el oligonucleótido (Figura 41 A), a mayor tiempo de exposición incrementa la muerte celular. Un resultado similar se obtuvo por medio de PCR cuantitativa a tiempo real y por Western Blot (Figura 41 B-C). Habiendo determinado las condiciones óptimas para realizar el silenciamiento de RGR se procedió a realizar los experimentos de isomerización en los cultivos de células ganglionares.



## El Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) actúa como un regulador del metabolismo de retinoides en cultivos de células ganglionares

Utilizando el diseño experimental previamente descrito (Figura 34) se determinó el contenido de los retinoides en los cultivos silenciados para RGR y se comparó con los cultivos controles sin silenciar.

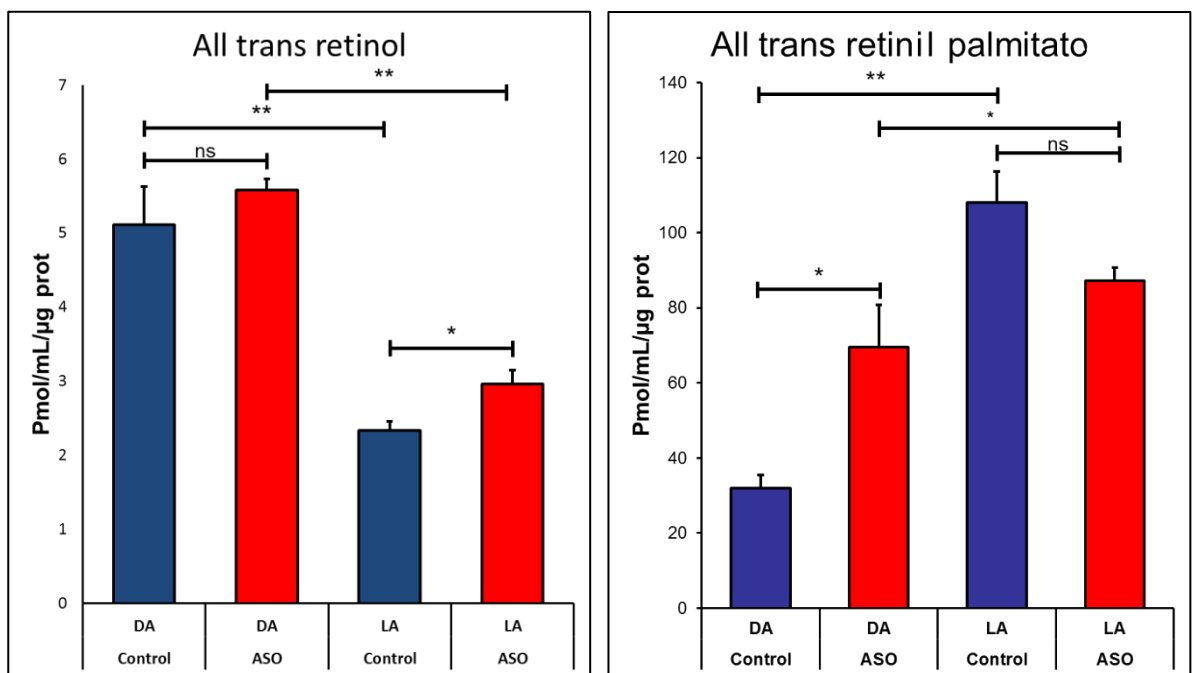


**Figura 42: Efecto del silenciamiento de RGR sobre el contenido de retinales.** Cuantificación del contenido de 11 cis retinal y all trans retinal en cultivos de células ganglionares silenciados (ASO) y sin tratar (Control). A su vez los mismos fueron expuestos a luz de 1000 lux por 1h (LA) o mantenido en oscuridad (DA). Se realizó el análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías con interacción positiva entre los factores ( $p < 0,05$ ). Se utilizó un análisis post hoc SNK \* $P < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y ns= no significativo  $n=3$  experimentos independientes.

No se observaron cambios significativos en el contenido 11 cis retinal en los cultivos mantenidos en oscuridad. Al contrario de lo esperado cuando se silenció RGR el contenido de 11 cis retinal incrementó considerablemente respecto a los cultivos sin tratar. Si RGR actuara como una fotoisomerasa reversa con capacidad de generar 11 cis retinal (Hara y *col.* 1968), la cantidad de 11 retinal en los cultivos silenciados debería

verse severamente afectada. Esto confirma junto a otros reportes que RGR no funciona como una fotoisomerasa reversa (Van Hooser *y col.* 2002, Maeda *y col.* 2003, Radu *y col.* 2008).

A diferencia de lo observado con 11 cis retinal, la cantidad de all trans retinal fue afectada por la disminución de RGR tanto en luz como en oscuridad. En los cultivos mantenidos en oscuridad se observó una disminución de la cantidad de all trans retinal en comparación de los cultivos no transfectados mientras que las células expuestas a la luz incrementaron su concentración en los cultivos transfectados. Esto nos indica que RGR actuaría de una manera dual, posiblemente regulando la actividad de enzimas que producen all trans retinol y/o all trans retinil palmitato como previamente fue reportado por Radu y Maeda en el EPR.



**Figura 44: Efecto del silenciamiento de RGR sobre el contenido de all trans retinol y all trans retinil palmitato.** Cuantificación del contenido de all trans retinol (panel izquierdo) y all trans retinil palmitato (panel derecho) en cultivos de células ganglionares silenciados (ASO) y sin tratar (Control). A su vez los mismos fueron expuestos a luz de 1000 lux por 1h (LA) o mantenidos en oscuridad (DA). Se realizó el análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías con interacción positiva entre los factores ( $p < 0,05$ ). Se utilizó un análisis post hoc SNK \* $P < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y ns= no significativo  $n = 3$  experimentos independientes.

La disminución de la cantidad de RGR no afectó la cantidad de all trans retinol en oscuridad mientras que se observó acumulación de all trans retinol en los cultivos silenciados expuestos a luz. Por otro lado, la disminución de RGR afectó severamente el contenido de all trans retinil palmitato en el cultivo en oscuridad con un marcado incremento, y una disminución que no llegó a ser significativa en la condición de luz. Este resultado es similar al obtenido en células del epitelio retinal y en retinas de ratones RGR -/- (Chen y col. 2001a, Radu y col. 2008). El efecto más dramático se observa en el contenido de ésteres de retinal incrementándose a más del doble el contenido de retinil palmitato (de  $32,00 \pm 6$  a  $69,55 \pm 20$ ). Tanto como para los retinales como para retinol y sus ésteres se observó un efecto significativo del tratamiento con luz ( $p < 0,05$ ) mientras que para todos los casos se observó una interacción positiva entre los factores tratamiento con luz y tratamiento con oligo morfolino ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados nos dan indicios de que el Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) actuaría como un regulador de la actividad enzimática del metabolismo de retinoides dentro de la retina interna.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

### REGENERACIÓN DEL CROMÓFORO DE LA RETINA INTERNA

La retina cumple diferentes funciones, la más estudiada es su función de detectar la luz del ambiente para formar imágenes, distinguir colores, detectar movimiento (Guido y *col.* 2010, Diaz y *col.* 2015). Esta función es llevada a cabo por los fotorreceptores bastones y conos exclusivamente. La retina cumple otras funciones inconscientes y reflejas que no implican la formación de imágenes como lo son el reflejo pupilar, la regulación del reloj biológico maestro, fotofobia etc. (Diaz y *col.* 2015). Los fotorreceptores contribuyen a estas funciones activamente, pero cuando se carece de fotorreceptores estas funciones se mantienen como lo notó Keeler con sus ratones ciegos (Keeler 1927). Esto indica que dentro de la retina interna que comprende las células ganglionares, amácrinas, horizontales y bipolares, existen células fotorreceptoras capaces de detectar luz para cumplir estas funciones.

Las células fotorreceptoras de la retina interna mejor estudiadas son las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGRif). Estas células descritas por Berson y colaboradores (Berson y *col.* 2002) son capaces de detectar luz por si solas, proyectan al reloj biológico central y a otras áreas relacionadas a las funciones no formadoras de imágenes (Hattar y *col.* 2002). Estas células ganglionares son fotosensibles gracias a que expresan, melanopsina (Opn4) (Provencio y *col.* 2000, Panda y *col.* 2003). Opn4 pertenece a una familia de proteínas llamada Opsinas, las cuales son fotosensibles gracias a su capacidad de unir un derivado de vitamina A, 11 cis retinal.

Existe una gran variedad de Opsinas en el reino animal, entre ellas cabe destacar aquellas que se encuentran en los fotorreceptores visuales conos y bastones las cuales le proporcionan fotosensibilidad para formar imágenes. Por otra parte existen un gran grupo de Opsinas que cumplen funciones de detección de luz para las funciones no formadoras de imágenes (melanopsina y neuropsina) y finalmente un grupo de Opsinas con funciones aún desconocidas.

Como antes se mencionó las Opsinas unen 11 cis retinal lo cual las hace fotosensibles. Este compuesto derivado de vitamina A es necesario para el funcionamiento de las Opsinas y por lo tanto para la visión. El 11 cis retinal unido a su correspondiente opsina cuando es excitado por un fotón cambia su conformación cis a trans causando una distorsión en el bolsillo de la proteína y un correspondiente cambio conformacional que desemboca en la activación de una cascada de señalización (fototransducción). Para que este proceso sea funcional se debe generar constantemente 11 cis retinal a partir de all trans retinal. Las células fotorreceptoras de los vertebrados utilizan un sistema enzimático para isomerizar el all trans retinal en 11 cis retinal. Este sistema enzimático se ubica en el epitelio pigmentario retinal (EPR) (Kiser y *col.* 2014). Por otra parte las células fotorreceptoras de los invertebrados se valen de otro mecanismo para regenerar su 11 cis retinal. Las características de las Opsinas de invertebrados le dan una mayor estabilidad al estado meta-opsina lo cual permite que este reciba un fotón de baja energía e isomerizarlo a 11 cis retinal nuevamente sin la necesidad de la utilización de enzimas. Esta propiedad de las Opsinas se conoce como biestabilidad (Tsukamoto y *col.* 2010).

Desde el descubrimiento de melanopsina se ha planteado la incógnita acerca de cómo se regenera su cromóforo retinal. Debido a que la retina interna se encuentra separada del EPR (Doyle y *col.* 2006) y la homología de la Melanopsina con Opsinas de los invertebrados se postuló que utilizaría un mecanismo de biestabilidad (Mure y *col.* 2009). Sin embargo hasta el día de hoy no es claro el tipo de mecanismo utilizado para regenerar el cromóforo de melanopsina en la retina interna.

En este trabajo de tesis doctoral se aportó evidencia que soporta la hipótesis de que la Melanopsina funciona como una opsina biestable. Por medio de HPLC-UV se determinó la cantidad de cromóforo presente en un extracto de células ganglionares y se contrastó con un extracto de fotorreceptores. En los fotorreceptores expuestos a luz se observó una disminución de 11 cis retinal respecto a los fotorreceptores mantenidos en oscuridad (Figura 15, panel izquierdo). Esta disminución de 11 cis retinal se debería posiblemente a la isomerización a all trans retinal, debido a que los fotorreceptores carecen de la capacidad de regenerar 11 cis retinal; razón por la cual, su concentración se ve disminuida.

Por lo contrario, cuando se cuantificó la cantidad de 11 cis retinal presente en la capa de células ganglionares se observó algo diferente de lo observado en la capa de fotorreceptores. La cantidad de 11 cis retinal presente en retinas tratadas con luz no fue estadísticamente diferente a las retinas mantenidas en oscuridad (Figura 15, panel derecho). Este resultado nos planteó dos hipótesis: 1) evidencia de la biestabilidad de melanopsina o 2) la presencia de una fotoisomerasa reversa.

Las fotoisomerasa reversa pertenecen un grupo especial de Opsinas que poseen la capacidad de isomerizar all trans retinal a 11 cis retinal (Hara y col. 1968, Pepe y col. 1992). En la retina de vertebrados podemos encontrar dos potenciales fotoisomerasas: el receptor acoplado a proteína G de la Retina o RGR (Jiang y col. 1993) y Peropsina (Sun y col. 1997). RGR es la fotoisomerasa mejor estudiada, la cual posee la capacidad de generar 11 cis retinal a partir de all trans retinal (Hao y col. 1996). No obstante, el efecto observado en la capa de células ganglionares (Figura 15) no es debido a RGR, ya que cuando se silencia la expresión de RGR en los cultivos de células ganglionares que expresan RGR no se vio disminuido la cantidad de 11 cis retinal formado a partir de la estimulación con luz (Figura 42 panel izquierdo). Demostrando que RGR no es el causante del aumento de 11 cis retinal pero si afecta su producción de una manera indirecta.

Este resultado confirma lo previamente reportado: melanopsina es un fotopigmento biestable. Desde los primeros reportes de melanopsina se especulaba que la misma funcionaría como una opsina biestable. Primero por su homología con Opsinas de los invertebrados (Provencio y col. 1998). Por otra parte esta opsina es funcional cuando se expresa en sistemas heterólogos los cuales son totalmente carentes de las enzimas del ciclo visual (Melyan y col. 2005, Panda y col. 2005, Qiu y col. 2005). Además de esta evidencia podemos sumar que la falta de las enzimas más importantes del ciclo visual canónico (LRAT y RPE65) no alteran la actividad de las CGRif (Doyle y col. 2006, Tu y col. 2006). Finalmente por medio de estudios *in vitro* utilizando la proteína recombinante se demostró que melanopsina funcionaria como una opsina biestable pero de manera diferente a las Opsinas clásicas de los invertebrados ya que sus picos de absorción se encuentran muy próximos (Matsuyama y col. 2012). Los resultados presentados en esta tesis son los primeros en demostrar por medio de bioquímica *in vivo* que la Melanopsina

es un pigmento biestable capaz de producir 11 cis retinal a partir de all trans retinal (Figura 15).

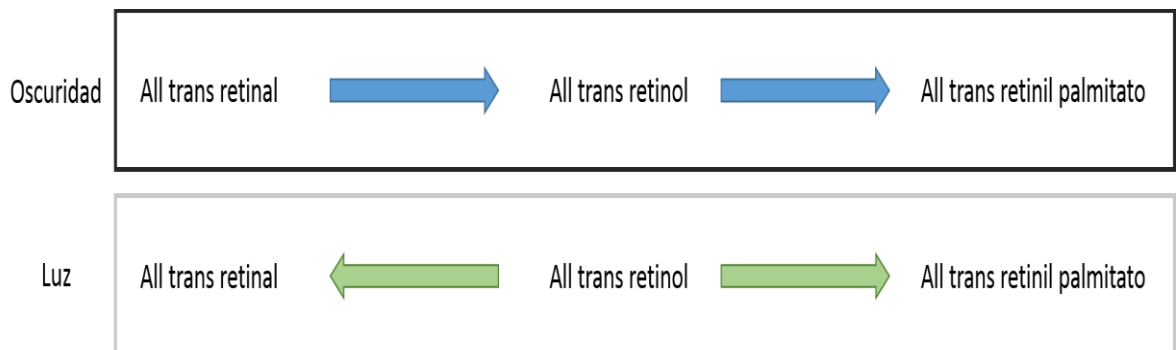
## METABOLISMO DE RETINOIDES EN LA RETINA INTERNA DE POLLO

Al presente poco se conoce acerca de cómo se metabolizan los retinoides en la retina interna. Debido a su separación física del EPR se cree que las Opsinas presentes utilizan un mecanismo de biestabilidad para generar 11 cis retinal. A pesar de esta fuerte evidencia para respaldar esta hipótesis existen resultados que apoyan la existencia de un mecanismo que proporciona retinal a la retina interna. Por ejemplo, la máxima respuesta de las CGRifs solo se alcanza luego de 5 min de incubación en oscuridad lo cual no ajusta completamente con un modelo de opsina biestable (Tu y col. 2005). Sumado al resultado anterior, se propuso que el EPR podría suplementar a las CGRif a través de las células gliales de Müller, proporcionando retinales nuevos para la síntesis de más opsina (Zhao y col. 2016).

Para estudiar el metabolismo de los retinoides en la retina interna se desarrolló un modelo simple de estudio, se cultivaron células ganglionares enriquecidas en el pigmento melanopsina X (Opn4X). Estos cultivos contienen principalmente células ganglionares (Figura 27), expresan melanopsina X y son fotosensibles (figura 31). Estos cultivos son un sistema modelo para el estudio del metabolismo de retinoides en la retina interna ya que carecen de epitelio pigmentario y la cantidad de las células gliales de Müller es mínimo ( $\approx 3\%$ ). Estos cultivos fueron suplementados con all trans retinal y se analizó el metabolismo del mismo luego de un estímulo lumínico de 1000 lux por 1h. Previamente al estímulo las células fueron incubadas con el retinal durante 3 h, durante este tiempo gran parte del retinal fue reducido a all trans retinol y posteriormente esterificado a all trans retinil ésteres (Figura 38 y 40). Un resultado similar fue reportado en neuronas cultivadas de hipocampo, en las cuales se forman ambos productos a partir de all trans retinal (Wang y col. 2011a). Hasta el momento no se ha reportado la expresión de ningún tipo de reductasa o deshidrogenasa en células ganglionares. Posiblemente la reducción de all trans retinal a retinol sea un mecanismo de detoxificación ya que los retinaldehídos son compuestos altamente reactivos y



moderadamente tóxicos para las células. Cuando los cultivos se expusieron a 1000 lux durante 1h, se encontraron cambios en la cantidad de los distintos retinoides. Se observó un incremento de los retinales (11 cis y all trans retinal) y all trans retinil ésteres (Figura 36 y 38) y una significativa disminución de all trans retinol. Esto nos indica la presencia de un mecanismo regulado por la luz, el cual modificaría la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de retinoides (Esquema 1). Un candidato para esta función es el Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR).



**Esquema 1: Metabolismo de retinoides y el efecto de la luz sobre el mismo.** En condiciones de oscuridad el all trans retinal agregado al medio es metabolizado en all trans retinol y posteriormente esterificado a all trans retinil éster. Cuando los cultivos son estimulados con luz, el all trans retinol formado en oscuridad es esterificado en parte y oxidado a retinaldehído. Este resultado denota un claro efecto de la luz.

## EL RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G DE LA RETINA ACTÚA COMO UN REGULADOR DEL METABOLISMO DE RETINOIDES

El Receptor acoplado a proteína G de la Retina fue descrito como una fotoisomerasa por su capacidad de generar 11 cis retinal a partir de all trans retinal (Hao y *col.* 1996) y por su homología con otra fotoisomerasa como el retinocromo de calamar (Pandey y *col.* 1994). A pesar de estas características nunca se logró demostrar su funcionalidad como fotoisomerasa, ya que esta no supliría a la retina de 11 cis retinal cuando se carece del ciclo visual canónico (Van Hooser y *col.* 2002, Maeda y *col.* 2003). Sin embargo RGR demostró poseer una función importante en la retina, ya que los ratones carentes de RGR desarrollan ceguera con acumulación de retinil ésteres (Chen y *col.* 2001a) y se han encontrado mutaciones asociadas a RGR capaces de causar ceguera en humanos

(Morimura y *col.* 1999). RGR posee la capacidad de interactuar con enzimas relacionadas con el ciclo visual (Chen y *col.* 2001b, Maeda y *col.* 2003). En el epitelio pigmentario RGR actuaría como un regulador del tráfico de retinil ésteres regulando la actividad de las enzimas que sintetizan e hidrolizan los mismos (LRAT y REH), de este modo promoviendo el movimiento de ésteres entre los sitios de almacenaje (retinosomas o gotas grasas del EPR) y el retículo endoplasmático liso, donde se lleva a cabo la isomerización del 11 *cis* retinal (Radu y *col.* 2008).

En este trabajo de Tesis Doctoral se demostró que RGR se expresa en la retina de pollos de 7 días de edad, específicamente en las células gliales de Müller (Figura 18). Resultados similares se observaron en retinas de bovinos y humanos (Pandey y *col.* 1994, Shen y *col.* 1994) pero no en retinas de ratones donde solo se expresa en EPR (Tao y *col.* 1998). A su vez se encontró que RGR se expresa en la capa de células ganglionares en un estadio de desarrollo de 8 días de gestación (Figura 19). Este es el primer reporte sobre la expresión de RGR en neuronas en estadio embrionario. Este resultado se confirmó en neuronas en cultivo obtenidas a partir de retinas del mismo estadio embrionario (Figura 32).

Se evaluó la función de RGR en los cultivos de células ganglionares a través del silenciamiento del gen. Utilizando oligonucleótidos morfolino se disminuyó la expresión de RGR en los cultivos.

Se analizó el metabolismo de retinoides en estos cultivos silenciados y se lo contrastó con cultivos no tratados. En condiciones de oscuridad, la disminución de la expresión de RGR resultó en la acumulación significativa de all *trans* retinil ésteres (Figura 44), dicho desplazamiento del metabolismo hacia la síntesis de ésteres repercute en una disminución de la cantidad de all *trans* retinal (Figura 43). Este resultado es similar a lo observado en células del epitelio pigmentario, donde la ausencia de RGR conlleva a una acumulación de RGR en oscuridad (Radu y *col.* 2008). En este trabajo se propone un mecanismo de acción de RGR en el cual actuaría como un inhibidor de las enzimas LRAT y REH. Podemos especular que cuando RGR recibe un fotón e isomeriza el all *trans* retinal unido a una conformación *cis*. Esta fotoisomerización provocaría un cambio conformacional de RGR y dejando de actuar como un inhibidor.

Finalmente, cuando los cultivos silenciados se expusieron a luz se observó un incremento en la cantidad de retinaldehídos y retinol. Posiblemente RGR tenga una función dual, por una parte inhiba la función de las enzimas que hidrolizan ésteres de retinol en oscuridad y por otra parte incremente la síntesis de ésteres en luz. Este es el primer trabajo que estudia la función de RGR en la retina interna de animales, si bien existe un acotado conocimiento acerca de RGR, la mayoría utiliza el epitelio pigmentario como modelo de estudio. Muchas de las enzimas citadas pertenecen al ciclo visual canónico, poco se conoce sobre el ciclo visual en la retina interna. Actualmente se conocen dos enzimas capaces de generar 11 cis retinal, una de ellas, denominada DES1, es capaz de generar 11 cis retinol a partir de all trans retinol; la otra enzima denominada MFAT posee la capacidad de esterificar 11 cis retinol con gran eficiencia. Estas enzimas se encuentran expresadas en las células de Müller y serían importantes para el ciclo visual de los conos (Kaylor y col. 2013, Kaylor y col. 2014). Además de las células gliales, estas enzimas se expresarían en las células ganglionares lo cual soportaría la idea de un ciclo visual alternativo para las Opsinas no visuales (Sexton y col. 2012). Posiblemente RGR podría estar interaccionando con estas enzimas durante el desarrollo, en la etapa en que RGR se encuentra expresado en las células ganglionares.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo demostramos que la retina interna de pollos utilizaría un mecanismo biestable de regeneración del cromóforo retinal, similar al utilizado por la retina de los invertebrados. Sin embargo esto no quiere decir que sea el único mecanismo persistente en la retina interna de los vertebrados. Los mismos invertebrados requieren de un sistema alternativo para suplir sus requerimientos de retinales a pesar de utilizar Opsinas biestables (Wang y *col.* 2010, Wang y *col.* 2012).

Por otra parte se encontró que las células ganglionares de la retina expresan el Receptor acoplado a proteína G de la Retina (RGR) durante un estadio de desarrollo embrionario temprano (E8) y en cultivos pertenecientes al mismo estadio embrionario. Posiblemente estas células expresan esta capacidad temprana para regular las cantidades de retinil ésteres, los cuales son esenciales para el almacenamiento de retinoides (Diaz y *col.* 2016); compuestos importantes para la fotosensibilidad y como por ejemplo la producción de factores de crecimiento como el ácido retinoico.

Finalmente se demostró por primera vez que RGR posee una función dentro de la retina interna. La misma no es de una fotoisomerasa reversa como el retinocromo, como se postuló en un principio sino como la de un activador/inhibidor foto activable del metabolismo de retinoides (Diaz y *col.* 2016). Posiblemente estas funciones sean llevadas a cabo interactuando con enzimas específicas expresadas en las células ganglionares.

Futuros estudios se abocaran a tales actividades enzimáticas en la capa de células ganglionares y su interacción con RGR



# ANEXOS

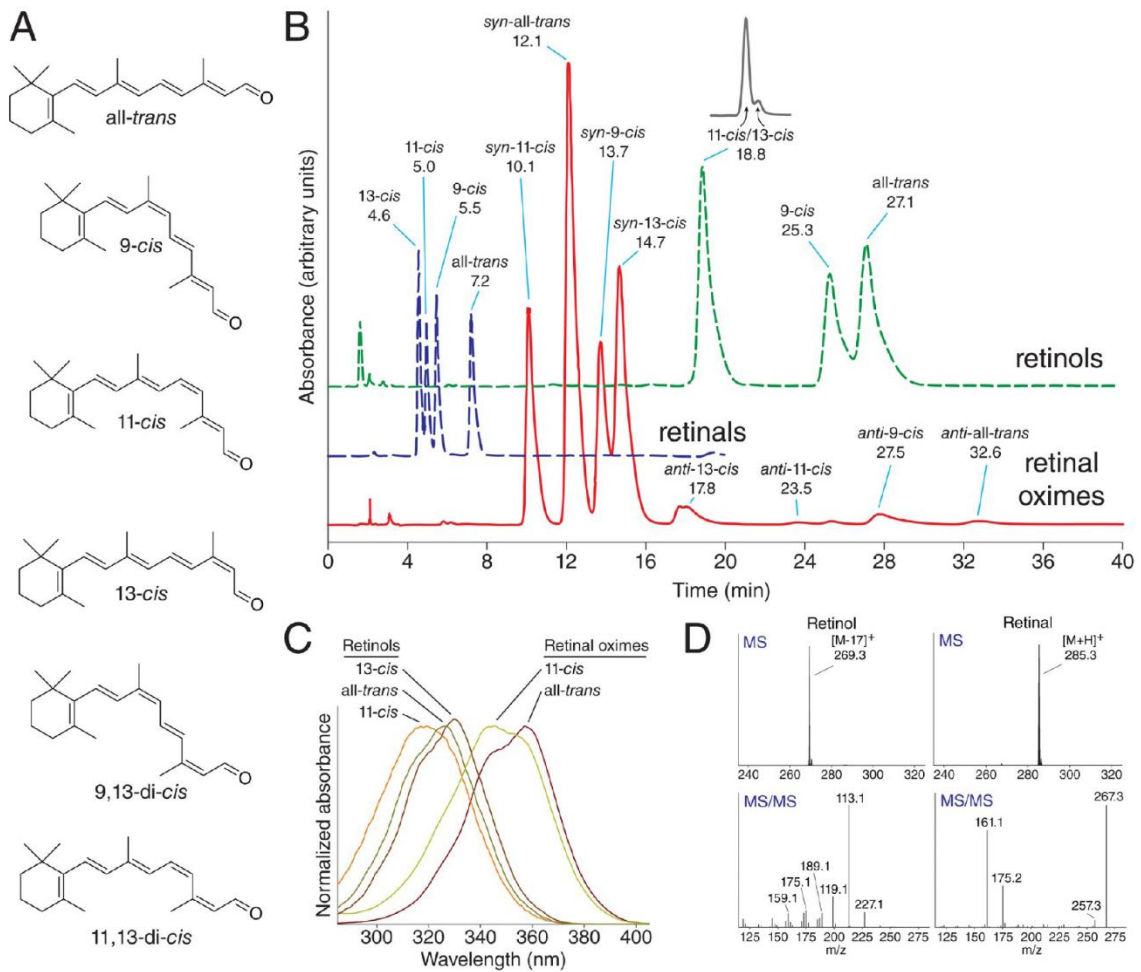
## ANEXOS

### Puesta a Punto y validación del método de cromatografía líquida para separar isómeros de retinoides

Hoy en día la técnica de elección para la determinación de retinoides es la cromatografía líquida de alta *performance* o rendimiento seguida de espectroscopia UV-visible (HPLC-UV) (Furr 2004). Los retinoides absorben muy bien la luz debido a su sistema de polienos conjugados, con una absorción en regiones del espectro visible o ultravioleta donde pocos otros componentes biológicos absorben (325-380 nm) y con altos coeficientes de extinción. Debido a su estructura rica en dobles enlaces estos compuestos son muy sensibles al oxígeno en el ambiente. Además sus enlaces conjugados les permiten absorber luz provocando una isomerización que da una gran variedad de productos donde prepondera el isómero más estable all *trans* retinal. Por lo tanto estos compuestos siempre se deben trabajar en oscuridad o bajo luz roja tenue, bajo atmósfera de nitrógeno gaseoso o Argón y evitar la alta temperatura lo cual provoca una isomerización térmica.

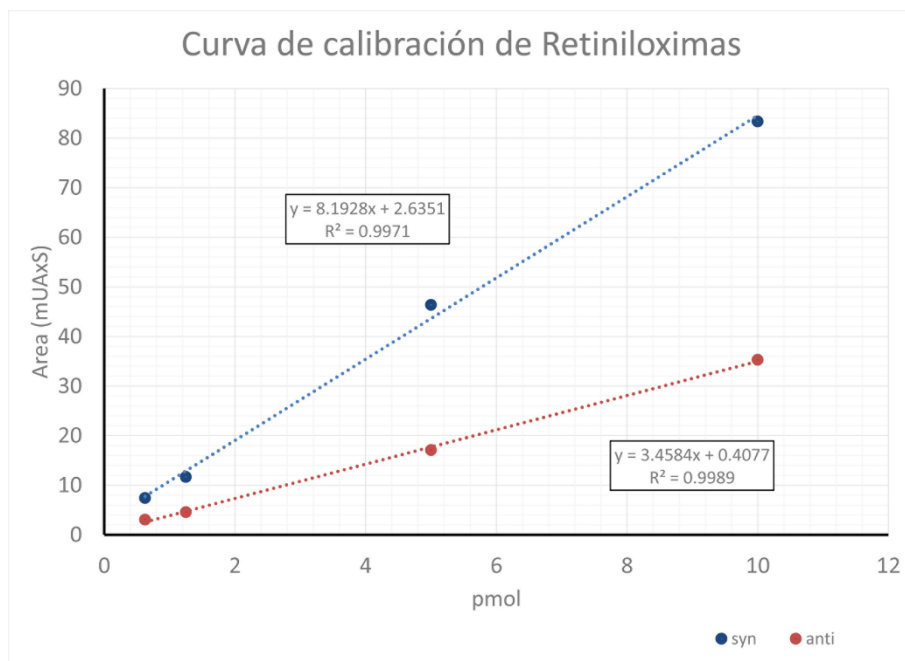
Con la experiencia adquirida en la colaboración con el Dr. Andrew Tsin y con ayuda del Dr. Tomás Tempesti del INFIQC se decidió poner a punto un equipo de HPLC-UV-vis para la determinación de retinoides.

El primer protocolo utilizado fue adaptado de Radu (Radu y *col.* 2008) el cual utiliza como fase móvil diferentes combinaciones de hexano/dioxano en una columna de silica de fase normal o directa. Utilizando testigos originales se realizaron curvas de calibración para cuantificar el contenido de retinoides. A diferencia del método utilizado en el laboratorio del Dr. Tsin, el método utilizado por Radu para la extracción de retinales utiliza Hidroxilamina. Este compuesto rompe la unión de Schiff formada entre la proteína y el retinal. La reacción química producida da como resultado la formación de dos especies estereoquímicas diferentes, un producto *syn* y un producto *anti*. Cuantificar el contenido de retinaldehído se debe cuantificar los productos *syn* y *anti* y la sumatoria de ambos corresponde al contenido neto de retinaldehído.

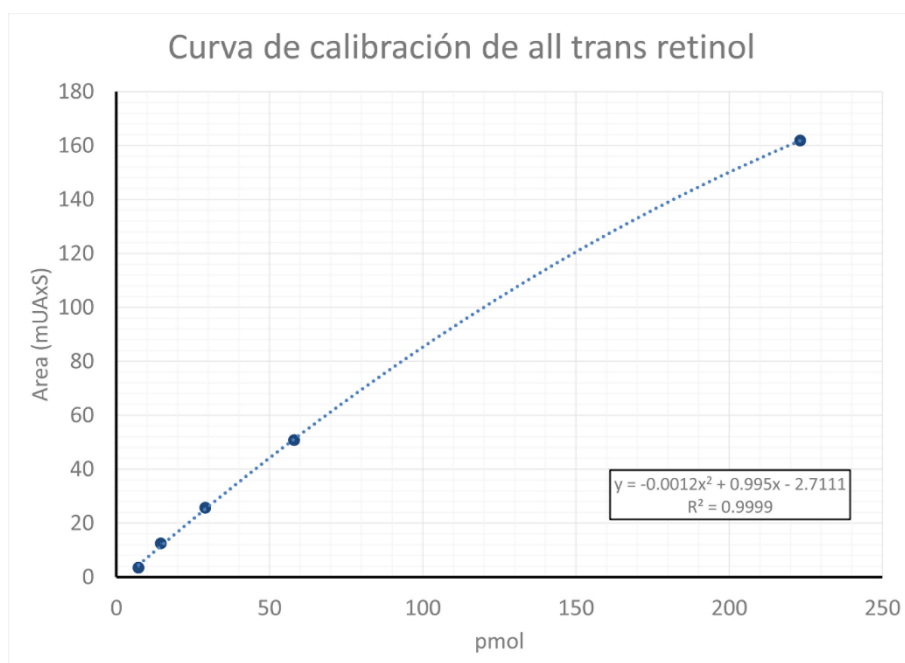


**Figura 45: Separación y detección de retinoides por HPLC.** (A) principales isómeros de retinoides comúnmente encontrados en muestras experimentales y que pueden ser distinguidos por métodos analíticos. (B) perfiles de elusión de isómeros de retinol, retinal y retinil oximas separados por una columna de HPLC de fase normal con un flujo de isocrático de 10% acetato de etilo/hexano. Los principales métodos analíticos de identificación y cuantificación incluyen espectrometría UV-vis y espectrometría de masa. (C) Espectro de absorbancia UV/vis de un grupo de retinoides demuestran diferencia características en su máximo de absorbancia y sobre todo la forma del espectro se utiliza para clasificar la química y geometría de los retinoides. (D) Espectrometría de masa característica de los retinoides.

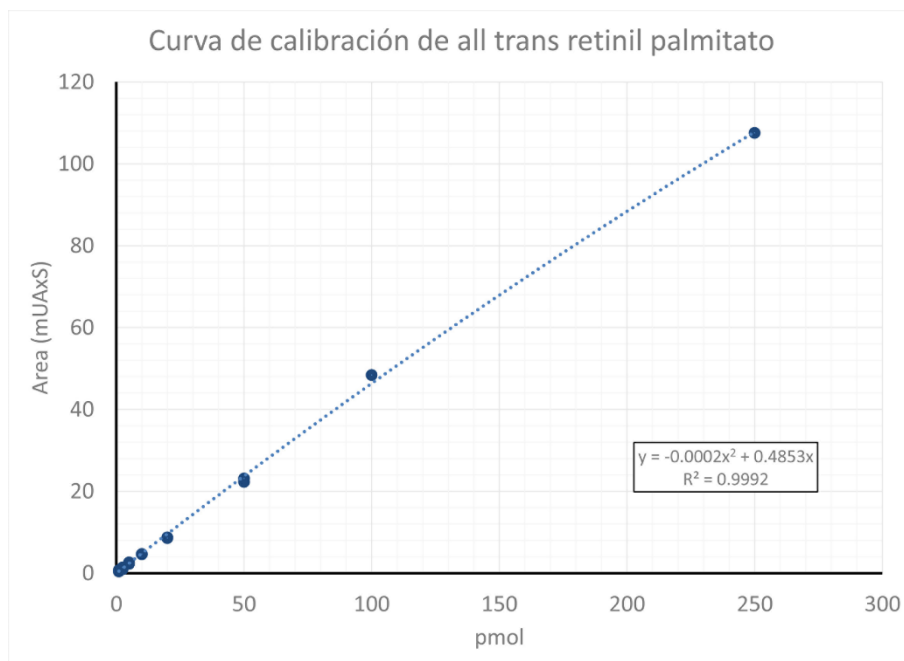




**Figura 46:** curva de calibración de estereoisomeros de retinal



**Figura 47:** curva de calibración de all trans retinol



**Figura 48:** curva de calibración de all trans retinil palmitato

			media	SD	SE
11 cis retinal	Control	DA	0.028	0.005	0.003
	ASO	DA	0.033	0.006	0.004
	Control	LA	0.186	0.047	0.027
	ASO	LA	0.496	0.054	0.031
all trans retinal	Control	DA	1.207	0.063	0.037
	ASO	DA	0.432	0.101	0.058
	Control	LA	1.948	0.483	0.279
	ASO	LA	3.190	0.370	0.214

**Tabla 1:** cuantificación del contenido retinales en cultivos. SD= desviación estándar, SE= error estándar, DA= oscuridad, LA= luz, ASO= Oligonucleótido Anti Sentido, n= 3 experimentos independientes.

			media	SD	SE
All trans retinol	Control	DA	5.12	0.89	0.51
	ASO	DA	5.59	0.25	0.15
	Control	LA	2.34	0.22	0.13
	ASO	LA	2.96	0.32	0.19

**Tabla 2: cuantificación del contenido all trans retinol en cultivos.** SD= desviación estándar, SE= error estándar, DA= oscuridad, LA= luz, ASO= Oligonucleótido Anti Sentido. , n= 3 experimentos independientes.

			Media	SD	SE
all trans retinil palmitato	Control	DA	31.97	6.02	3.48
	ASO	DA	69.55	19.55	11.29
	Control	LA	108.02	14.47	8.35
	ASO	LA	87.25	6.12	3.54

**Tabla 3: cuantificación del contenido all trans retinil palmitato en cultivos.** SD= desviación estándar, SE= error estándar, DA= oscuridad, LA= luz, ASO= Oligonucleótido Anti Sentido, n= 3 experimentos independientes.

# Estadística ANOVA

## 11 CIS RETINAL

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Retinales	12	0,98	0,97	19,48

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,43	3	0,14	110,45	<0,0001
Luz-Osc	0,29	1	0,29	220,87	<0,0001
Tratam	0,07	1	0,07	56,80	0,0001
Luz-Osc*Tratam	0,07	1	0,07	53,67	0,0001
Error	0,01	8	1,3E-03		
Total	0,44	11			

### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0013 gl: 8

Luz-Osc Medias n E.E.

DA 0,03 6 0,01 A

LA 0,34 6 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0013 gl: 8

Tratam Medias n E.E.

CTRL 0,11 6 0,01 A

ASO 0,26 6 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0013 gl: 8

Luz-Osc Tratam Medias n E.E.

DA CTRL 0,03 3 0,02 A

DA ASO 0,03 3 0,02 A

LA CTRL 0,19 3 0,02 B

LA ASO 0,50 3 0,02 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## ALL TRANS RETINAL

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
retinal	12	0,94	0,92	18,31

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,39	3	4,13	42,90	<0,0001
trat	0,16	1	0,16	1,70	0,2280
Luz-Osc	9,18	1	9,18	95,33	<0,0001
trat*Luz-Osc	3,05	1	3,05	31,67	0,0005
Error	0,77	8	0,10		
Total	13,16	11			

#### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0963 gl: 8

trat Medias n E.E.

CTRL 1,58 6 0,13 A

ASO 1,81 6 0,13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0963 gl: 8

Luz-Osc Medias n E.E.

DA 0,82 6 0,13 A

LA 2,57 6 0,13 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Test:SNK Alfa=0,05

Error: 0,0963 gl: 8

trat Luz-Osc Medias n E.E.

ASO DA 0,43 3 0,18 A

CTRL DA 1,21 3 0,18 B

CTRL LA 1,95 3 0,18 C

ASO LA 3,19 3 0,18 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## ALL TRANS RETINOL

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
retinal	12	0,92	0,89	12,57

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,82	3	7,61	30,08	0,0001
Luz-Osc	21,90	1	21,90	86,60	<0,0001
trat	0,90	1	0,90	3,58	0,0952
Luz-Osc*trat	0,02	1	0,02	0,07	0,7943
Error	2,02	8	0,25		
Total	24,85	11			

**Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 0,2529 gl: 8

Luz-Osc Medias n E.E.

LA 2,65 6 0,21 A

DA 5,35 6 0,21 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 0,2529 gl: 8

trat Medias n E.E.

CTRL 3,73 6 0,21 A

ASO 4,27 6 0,21 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 0,2529 gl: 8

Luz-Osc trat Medias n E.E.

LA CTRL 2,34 3 0,29 A

LA ASO 2,96 3 0,29 A

DA CTRL 5,12 3 0,29 B

DA ASO 5,59 3 0,29 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***ALL TRANS RETINIL PALMITATO****Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
retinal	12	0,88	0,83	17,39

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo.	9356,59	3	3118,86	18,74	0,0006
Luz-Osc	6591,33	1	6591,33	39,61	0,0002
trat	212,02	1	212,02	1,27	0,2917
Luz-Osc*trat	2553,25	1	2553,25	15,34	0,0044
Error	1331,27	8	166,41		
Total	10687,86	11			

**Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 166,4083 gl: 8

Luz-Osc Medias n E.E.

DA 50,76 6 5,27 A

LA 97,63 6 5,27 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 166,4083 gl: 8

trat Medias n E.E.

CTRL 69,99 6 5,27 A

ASO 78,40 6 5,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:SNK Alfa=0,05**

Error: 166,4083 gl: 8

Luz-Osc trat Medias n E.E.

DA CTRL 31,97 3 7,45 A

DA ASO 69,55 3 7,45 B

LA ASO 87,25 3 7,45 B C

LA CTRL 108,02 3 7,45 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## REFERENCIAS

- Badea, T. C., H. Cahill, J. Ecker, S. Hattar and J. Nathans (2009). "Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells." *Neuron* **61**(6): 852-864.
- Bailey, M. J. and V. M. Cassone (2004). "Opsin photoisomerases in the chick retina and pineal gland: characterization, localization, and circadian regulation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(3): 769-775.
- Barthel, L. K. and P. A. Raymond (1990). "Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry." *J Histochem Cytochem* **38**(9): 1383-1388.
- Bellingham, J., S. S. Chaurasia, Z. Melyan, C. Liu, M. A. Cameron, E. E. Tarttelin, P. M. Iuvone, M. W. Hankins, G. Tosini and R. J. Lucas (2006). "Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates." *PLoS Biol* **4**(8): e254.
- Bellingham, J., D. Whitmore, A. R. Philp, D. J. Wells and R. G. Foster (2002). "Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position." *Brain Res Mol Brain Res* **107**(2): 128-136.
- Berson, D. M., F. A. Dunn and M. Takao (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." *Science* **295**(5557): 1070-1073.
- Blum, M., E. M. De Robertis, J. B. Wallingford and C. Niehrs (2015). "Morpholinos: Antisense and Sensibility." *Dev Cell* **35**(2): 145-149.
- Bowmaker, J. K., A. Thorpe and R. H. Douglas (1991). "Ultraviolet-sensitive cones in the goldfish." *Vision Res* **31**(3): 349-352.
- Bownds, D. (1967). "Site of attachment of retinal in rhodopsin." *Nature* **216**(5121): 1178-1181.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne and A. Reichenbach (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." *Prog Retin Eye Res* **25**(4): 397-424.
- Brocco, M. A. and P. Panzetta (2002). "Neurotrophic factors and depolarization do not enhance viability and process regrowth on a purified set of chick embryo retinal ganglion cells." *Neurosci Lett* **328**(3): 221-224.
- Contin, M. A., D. M. Verra and M. E. Guido (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, G. Salvador, M. Ilincheta, N. M. Giusto and M. E. Guido (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, G. Jiang, W. P. Hayes, R. Haque, A. Natesan, M. Zatz, G. Tosini, C. Liu, H. W. Korf, P. M. Iuvone and I. Provencio (2005). "Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types." *J Neurochem* **92**(1): 158-170.
- Chen, P., W. Hao, L. Rife, X. P. Wang, D. Shen, J. Chen, T. Ogden, G. B. Van Boemel, L. Wu, M. Yang and H. K. Fong (2001a). "A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr." *Nat Genet* **28**(3): 256-260.
- Chen, P., T. D. Lee and H. K. Fong (2001b). "Interaction of 11-cis-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal g protein-coupled receptor opsin." *J Biol Chem* **276**(24): 21098-21104.
- Chen, Y., K. Okano, T. Maeda, V. Chauhan, M. Golczak, A. Maeda and K. Palczewski (2012). "Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration." *J Biol Chem* **287**(7): 5059-5069.
- Cheng, K. M., R. N. Shoffner, K. N. Gelatt, G. G. Gum, J. S. Otis and J. J. Bitgood (1980). "An autosomal recessive blind mutant in the chicken." *Poult Sci* **59**(10): 2179-2181.



- Dacey, D. M., H. W. Liao, B. B. Peterson, F. R. Robinson, V. C. Smith, J. Pokorny, K. W. Yau and P. D. Gamlin (2005). "Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN." *Nature* **433**(7027): 749-754.
- Das, S. R., N. Bhardwaj, H. Kjeldbye and P. Gouras (1992). "Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol." *Biochem J* **285 ( Pt 3)**: 907-913.
- Davies, W. I., B. H. Tay, L. Zheng, J. A. Danks, S. Brenner, R. G. Foster, S. P. Collin, M. W. Hankins, B. Venkatesh and D. M. Hunt (2012). "Evolution and functional characterisation of melanopsins in a deep-sea chimaera (elephant shark, *Callorhinchus milii*)." *PLoS One* **7**(12): e51276.
- Davies, W. I., L. Zheng, S. Hughes, T. K. Tamai, M. Turton, S. Halford, R. G. Foster, D. Whitmore and M. W. Hankins (2011). "Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina." *Cell Mol Life Sci* **68**(24): 4115-4132.
- Diaz, N. M., L. P. Morera and M. E. Guido (2015). "Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates." *Photochem Photobiol*.
- Diaz, N. M., L. P. Morera, T. Tempesti and M. E. Guido (2016). "The Visual Cycle in the Inner Retina of Chicken and the Involvement of Retinal G-Protein-Coupled Receptor (RGR)." *Mol Neurobiol*.
- Doh, S. T., H. Hao, S. C. Loh, T. Patel, H. Y. Tawil, D. K. Chen, A. Pashkova, A. Shen, H. Wang and L. Cai (2010). "Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques." *BMC Dev Biol* **10**: 8.
- Dowling, J. E. (1960). "Chemistry of visual adaptation in the rat." *Nature* **188**: 114-118.
- Dowling, J. E. (1990). "Functional and pharmacological organization of the retina: dopamine, interplexiform cells, and neuromodulation." *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **67**: 1-18.
- Doyle, S. E., A. M. Castrucci, M. McCall, I. Provencio and M. Menaker (2006). "Nonvisual light responses in the Rpe65 knockout mouse: rod loss restores sensitivity to the melanopsin system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10432-10437.
- Drivenes, O., A. M. Soviknes, L. O. Ebbesson, A. Fjose, H. C. Seo and J. V. Helvik (2003). "Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain." *J Comp Neurol* **456**(1): 84-93.
- Dyer, M. A., F. J. Livesey, C. L. Cepko and G. Oliver (2003). "Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina." *Nat Genet* **34**(1): 53-58.
- Ebihara, S. and K. Tsuji (1980). "Entrainment of the circadian activity rhythm to the light cycle: effective light intensity for a Zeitgeber in the retinal degenerate C3H mouse and the normal C57BL mouse." *Physiol Behav* **24**(3): 523-527.
- Emanuel, A. J. and M. T. Do (2015). "Melanopsin tristability for sustained and broadband phototransduction." *Neuron* **85**(5): 1043-1055.
- Foster, R. G., I. Provencio, D. Hudson, S. Fiske, W. De Grip and M. Menaker (1991). "Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd)." *J Comp Physiol A* **169**(1): 39-50.
- Furr, H. C. (2004). "Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved." *J Nutr* **134**(1): 281S-285S.
- Garwin, G. G. and J. C. Saari (2000). "High-performance liquid chromatography analysis of visual cycle retinoids." *Methods Enzymol* **316**: 313-324.
- Graham, D. M., K. Y. Wong, P. Shapiro, C. Frederick, K. Pattabiraman and D. M. Berson (2008). "Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomeric phototransduction cascade." *J Neurophysiol* **99**(5): 2522-2532.
- Guido, M. E., D. F. Bussolino, Z. G. de Arriba, S. Deza, S. J. Pasquare, N. M. Giusto and B. L. Caputto (1999). "A simple method to obtain retinal cell preparations highly enriched in specific cell types. Suitability for lipid metabolism studies." *Brain Res Brain Res Protoc* **4**(2): 147-155.

- Guido, M. E., E. Garbarino-Pico, M. A. Contin, D. J. Valdez, P. S. Nieto, D. M. Verra, V. A. Acosta-Rodriguez, N. de Zavalía and R. E. Rosenstein (2010). "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system." *Prog Neurobiol* **92**(4): 484-504.
- Halder, G., P. Callaerts and W. J. Gehring (1995). "Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*." *Science* **267**(5205): 1788-1792.
- Hamel, C. P., E. Tsilou, E. Harris, B. A. Pfeffer, J. J. Hooks, B. Detrick and T. M. Redmond (1993). "A developmentally regulated microsomal protein specific for the pigment epithelium of the vertebrate retina." *J Neurosci Res* **34**(4): 414-425.
- Han, J., A. Dinculescu, X. Dai, W. Du, W. C. Smith and J. Pang (2013). "Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations." *Mol Vis* **19**: 2579-2589.
- Hao, W. and H. K. Fong (1996). "Blue and ultraviolet light-absorbing opsin from the retinal pigment epithelium." *Biochemistry* **35**(20): 6251-6256.
- Hao, W. and H. K. Fong (1999). "The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium." *J Biol Chem* **274**(10): 6085-6090.
- Hara, T. and R. Hara (1968). "Regeneration of squid retinochrome." *Nature* **219**(5153): 450-454.
- Hartwick, A. T., J. R. Bramley, J. Yu, K. T. Stevens, C. N. Allen, W. H. Baldrige, P. J. Sollars and G. E. Pickard (2007). "Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells." *J Neurosci* **27**(49): 13468-13480.
- Hattar, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson and K. W. Yau (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity." *Science* **295**(5557): 1065-1070.
- Hattar, S., R. J. Lucas, N. Mrosovsky, S. Thompson, R. H. Douglas, M. W. Hankins, J. Lem, M. Biel, F. Hofmann, R. G. Foster and K. W. Yau (2003). "Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice." *Nature* **424**(6944): 76-81.
- Huang, J., C. H. Liu, S. A. Hughes, M. Postma, C. J. Schwiening and R. C. Hardie (2010). "Activation of TRP channels by protons and phosphoinositide depletion in *Drosophila* photoreceptors." *Curr Biol* **20**(3): 189-197.
- Hunt, D. M., L. S. Carvalho, J. A. Cowing and W. L. Davies (2009). "Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1531): 2941-2955.
- Hur, E. M. and K. T. Kim (2002). "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity." *Cell Signal* **14**(5): 397-405.
- Jiang, M., S. Pandey and H. K. Fong (1993). "An opsin homologue in the retina and pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(13): 3669-3678.
- Johansson, U. E., S. Eftekhari and K. Warfvinge (2010). "A battery of cell- and structure-specific markers for the adult porcine retina." *J Histochem Cytochem* **58**(4): 377-389.
- Jones, K. A., M. Hatori, L. S. Mure, J. R. Bramley, R. Artymyshyn, S. P. Hong, M. Marzabadi, H. Zhong, J. Sprouse, Q. Zhu, A. T. Hartwick, P. J. Sollars, G. E. Pickard and S. Panda (2013). "Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction." *Nat Chem Biol* **9**(10): 630-635.
- Kaylor, J. J., J. D. Cook, J. Makshanoff, N. Bischoff, J. Yong and G. H. Travis (2014). "Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Muller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(20): 7302-7307.
- Kaylor, J. J., Q. Yuan, J. Cook, S. Sarfare, J. Makshanoff, A. Miu, A. Kim, P. Kim, S. Habib, C. N. Roybal, T. Xu, S. Nusinowitz and G. H. Travis (2013). "Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Muller glial cells of the retina." *Nat Chem Biol* **9**(1): 30-36.
- Keeler, C. E. (1924). "The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **10**(7): 329-333.
- Keeler, C. E. (1927). "IRIS MOVEMENTS IN BLIND MICE." *American Journal of Physiology -- Legacy Content* **81**(1): 107-112.

- Kiser, P. D., M. Golczak and K. Palczewski (2014). "Chemistry of the retinoid (visual) cycle." Chem Rev **114**(1): 194-232.
- Koch, K., J. McLean, R. Segev, M. A. Freed, M. J. Berry, 2nd, V. Balasubramanian and P. Sterling (2006). "How much the eye tells the brain." Curr Biol **16**(14): 1428-1434.
- Kojima, D., A. Terakita, T. Ishikawa, Y. Tsukahara, A. Maeda and Y. Shichida (1997). "A novel Go-mediated phototransduction cascade in scallop visual cells." J Biol Chem **272**(37): 22979-22982.
- Koontz, M. A., L. E. Hendrickson, S. T. Brace and A. E. Hendrickson (1993). "Immunocytochemical localization of GABA and glycine in amacrine and displaced amacrine cells of macaque monkey retina." Vision Res **33**(18): 2617-2628.
- Koyanagi, M., K. Kubokawa, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita (2005). "Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells." Curr Biol **15**(11): 1065-1069.
- Koyanagi, M., K. Takano, H. Tsukamoto, K. Ohtsu, F. Tokunaga and A. Terakita (2008a). "Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15576-15580.
- Koyanagi, M. and A. Terakita (2008b). "Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin." Photochem Photobiol **84**(4): 1024-1030.
- Koyanagi, M., A. Terakita, K. Kubokawa and Y. Shichida (2002). "Amphioxus homologs of Go-coupled rhodopsin and peropsin having 11-cis- and all-trans-retinals as their chromophores." FEBS Lett **531**(3): 525-528.
- Liu, W., S. L. Khare, X. Liang, M. A. Peters, X. Liu, C. L. Cepko and M. Xiang (2000). "All Brn3 genes can promote retinal ganglion cell differentiation in the chick." Development **127**(15): 3237-3247.
- Lucas, R. J., M. S. Freedman, M. Munoz, J. M. Garcia-Fernandez and R. G. Foster (1999). "Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors." Science **284**(5413): 505-507.
- Lucas, R. J., S. Hattar, M. Takao, D. M. Berson, R. G. Foster and K. W. Yau (2003). "Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice." Science **299**(5604): 245-247.
- Maeda, T., J. P. Van Hooser, C. A. Driessen, S. Filipek, J. J. Janssen and K. Palczewski (2003). "Evaluation of the role of the retinal G protein-coupled receptor (RGR) in the vertebrate retina in vivo." J Neurochem **85**(4): 944-956.
- Mata, N. L., R. A. Radu, R. C. Clemmons and G. H. Travis (2002). "Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight." Neuron **36**(1): 69-80.
- Matsuyama, T., T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida (2012). "Photochemical properties of mammalian melanopsin." Biochemistry **51**(27): 5454-5462.
- Mawad, K. and R. N. Van Gelder (2008). "Absence of long-wavelength photic potentiation of murine intrinsically photosensitive retinal ganglion cell firing in vitro." J Biol Rhythms **23**(5): 387-391.
- Melyan, Z., E. E. Tarttelin, J. Bellingham, R. J. Lucas and M. W. Hankins (2005). "Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive." Nature **433**(7027): 741-745.
- 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.
- Moore, R. Y. (1996). "Neural control of the pineal gland." Behav Brain Res **73**(1-2): 125-130.
- Morimura, H., F. Saindelle-Ribeaud, E. L. Berson and T. P. Dryja (1999). "Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa." Nat Genet **23**(4): 393-394.
- Mure, L. S., P. L. Cornut, C. Rieux, E. Drouyer, P. Denis, C. Gronfier and H. M. Cooper (2009). "Melanopsin bistability: a fly's eye technology in the human retina." PLoS One **4**(6): e5991.
- Mure, L. S., C. Rieux, S. Hattar and H. M. Cooper (2007). "Melanopsin-dependent nonvisual responses: evidence for photopigment bistability in vivo." J Biol Rhythms **22**(5): 411-424.

- Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, P. Sobrado-Calvo, L. Nieto-Lopez, I. Canovas-Martinez, M. Salinas-Navarro, M. Vidal-Sanz and M. Agudo (2009). "Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(8): 3860-3868.
- Newman, L. A., M. T. Walker, R. L. Brown, T. W. Cronin and P. R. Robinson (2003). "Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment." Biochemistry **42**(44): 12734-12738.
- O'Byrne, S. M. and W. S. Blamer (2013). "Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology." J Lipid Res **54**(7): 1731-1743.
- Orban, T., G. Palczewska and K. Palczewski (2011). "Retinyl ester storage particles (retinosomes) from the retinal pigmented epithelium resemble lipid droplets in other tissues." J Biol Chem **286**(19): 17248-17258.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-745.
- Panda, S., S. K. Nayak, B. Campo, J. R. Walker, J. B. Hogenesch and T. Jegla (2005). "Illumination of the melanopsin signaling pathway." Science **307**(5709): 600-604.
- Panda, S., I. Provencio, D. C. Tu, S. S. Pires, M. D. Rollag, A. M. Castrucci, M. T. Pletcher, T. K. Sato, T. Wiltshire, M. Andahazy, S. A. Kay, R. N. Van Gelder and J. B. Hogenesch (2003). "Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice." Science **301**(5632): 525-527.
- Panda, S., T. K. Sato, A. M. Castrucci, M. D. Rollag, W. J. DeGrip, J. B. Hogenesch, I. Provencio and S. A. Kay (2002). "Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting." Science **298**(5601): 2213-2216.
- Pandey, S., J. C. Blanks, C. Spee, M. Jiang and H. K. Fong (1994). "Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments." Exp Eye Res **58**(5): 605-613.
- Pepe, I. M. and C. Cugnoli (1992). "Retinal photoisomerase: role in invertebrate visual cells." J Photochem Photobiol B **13**(1): 5-17.
- Porter, M. L., J. R. Blasic, M. J. Bok, E. G. Cameron, T. Pringle, T. W. Cronin and P. R. Robinson (2012). "Shedding new light on opsin evolution." Proc Biol Sci **279**(1726): 3-14.
- Provencio, I., G. Jiang, W. J. De Grip, W. P. Hayes and M. D. Rollag (1998). "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 340-345.
- Provencio, I., I. R. Rodriguez, G. Jiang, W. P. Hayes, E. F. Moreira and M. D. Rollag (2000). "A novel human opsin in the inner retina." J Neurosci **20**(2): 600-605.
- Qiu, X., T. Kumbalasiri, S. M. Carlson, K. Y. Wong, V. Krishna, I. Provencio and D. M. Berson (2005). "Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin." Nature **433**(7027): 745-749.
- Radu, R. A., J. Hu, J. Peng, D. Bok, N. L. Mata and G. H. Travis (2008). "Retinal pigment epithelium-retinal G protein receptor-opsin mediates light-dependent translocation of all-trans-retinyl esters for synthesis of visual chromophore in retinal pigment epithelial cells." J Biol Chem **283**(28): 19730-19738.
- Redmond, T. M., S. Yu, E. Lee, D. Bok, D. Hamasaki, N. Chen, P. Goletz, J. X. Ma, R. K. Crouch and K. Pfeifer (1998). "Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle." Nat Genet **20**(4): 344-351.
- Rodriguez, K. A. and A. T. Tsin (1989). "Retinyl esters in the vertebrate neuroretina." Am J Physiol **256**(1 Pt 2): R255-258.
- Rollag, M. D. and G. D. Niswender (1976). "Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens." Endocrinology **98**(2): 482-489.
- Sakmar, T. P., R. R. Franke and H. G. Khorana (1989). "Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(21): 8309-8313.
- Sandbakken, M., L. Ebbesson, S. Stefansson and J. V. Helvik (2012). "Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." J Comp Neurol **520**(16): 3727-3744.

- Schmidt, T. M., N. M. Alam, S. Chen, P. Kofuji, W. Li, G. T. Prusky and S. Hattar (2014). "A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection." Neuron **82**(4): 781-788.
- Schwab, I. R., R. R. Dubielzig and C. Schobert (2012). Evolution's witness : how eyes evolved. New York, Oxford University Press.
- Sekaran, S., R. G. Foster, R. J. Lucas and M. W. Hankins (2003). "Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons." Curr Biol **13**(15): 1290-1298.
- Sexton, T., E. Buhr and R. N. Van Gelder (2012). "Melanopsin and mechanisms of non-visual ocular photoreception." J Biol Chem **287**(3): 1649-1656.
- Shen, D., M. Jiang, W. Hao, L. Tao, M. Salazar and H. K. Fong (1994). "A human opsin-related gene that encodes a retinaldehyde-binding protein." Biochemistry **33**(44): 13117-13125.
- Steinfeld, J., I. Steinfeld, N. Coronato, M. L. Hampel, P. G. Layer, M. Araki and A. Vogel-Hopker (2013). "RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling." Development **140**(24): 4959-4969.
- Stenkamp, R. E., S. Filipek, C. A. Driessen, D. C. Teller and K. Palczewski (2002). "Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors." Biochim Biophys Acta **1565**(2): 168-182.
- Sun, H., D. J. Gilbert, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. Nathans (1997). "Peropsin, a novel visual pigment-like protein located in the apical microvilli of the retinal pigment epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9893-9898.
- Sun, L., E. Kawano-Yamashita, T. Nagata, H. Tsukamoto, Y. Furutani, M. Koyanagi and A. Terakita (2014). "Distribution of mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions." PLoS One **9**(9): e108209.
- Tao, L., D. Shen, S. Pandey, W. Hao, K. A. Rich and H. K. Fong (1998). "Structure and developmental expression of the mouse RGR opsin gene." Mol Vis **4**: 25.
- Teller, D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski and R. E. Stenkamp (2001). "Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)." Biochemistry **40**(26): 7761-7772.
- Terakita, A. (2005). "The opsins." Genome Biol **6**(3): 213.
- Terakita, A., M. Koyanagi, H. Tsukamoto, T. Yamashita, T. Miyata and Y. Shichida (2004). "Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 284-289.
- Terakita, A., H. Tsukamoto, M. Koyanagi, M. Sugahara, T. Yamashita and Y. Shichida (2008). "Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin." J Neurochem **105**(3): 883-890.
- Terakita, A., T. Yamashita and Y. Shichida (2000). "Highly conserved glutamic acid in the extracellular IV-V loop in rhodopsins acts as the counterion in retinochrome, a member of the rhodopsin family." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14263-14267.
- Tomonari, S., A. Takagi, S. Akamatsu, S. Noji and H. Ohuchi (2005). "A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina." Dev Dyn **234**(3): 783-790.
- Torii, M., D. Kojima, T. Okano, A. Nakamura, A. Terakita, Y. Shichida, A. Wada and Y. Fukada (2007). "Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity." FEBS Lett **581**(27): 5327-5331.
- Tsukamoto, H. and A. Terakita (2010). "Diversity and functional properties of bistable pigments." Photochem Photobiol Sci **9**(11): 1435-1443.
- Tu, D. C., L. A. Owens, L. Anderson, M. Golczak, S. E. Doyle, M. McCall, M. Menaker, K. Palczewski and R. N. Van Gelder (2006). "Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10426-10431.

- Tu, D. C., D. Zhang, J. Demas, E. B. Slutsky, I. Provencio, T. E. Holy and R. N. Van Gelder (2005). "Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells." Neuron **48**(6): 987-999.
- Valdez, D. J., P. S. Nieto, E. Garbarino-Pico, L. B. Avalle, H. Diaz-Fajreldines, C. Schurrer, K. M. Cheng and M. E. Guido (2009). "A nonmammalian vertebrate model of blindness reveals functional photoreceptors in the inner retina." FASEB J **23**(4): 1186-1195.
- Van Hooser, J. P., Y. Liang, T. Maeda, V. Kuksa, G. F. Jang, Y. G. He, F. Rieke, H. K. Fong, P. B. Detwiler and K. Palczewski (2002). "Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis." J Biol Chem **277**(21): 19173-19182.
- Verra, D. M., M. A. Contin, D. Hicks and M. E. Guido (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. (1968a). "The molecular basis of visual excitation." Nature **219**(5156): 800-807.
- Wald, G. (1968b). "Molecular basis of visual excitation." Science **162**(3850): 230-239.
- Walker, M. T., R. L. Brown, T. W. Cronin and P. R. Robinson (2008). "Photochemistry of retinal chromophore in mouse melanopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 8861-8865.
- Wang, C., M. A. Kane and J. L. Napoli (2011a). "Multiple retinol and retinal dehydrogenases catalyze all-trans-retinoic acid biosynthesis in astrocytes." J Biol Chem **286**(8): 6542-6553.
- Wang, J. K., J. H. McDowell and P. A. Hargrave (1980). "Site of attachment of 11-cis-retinal in bovine rhodopsin." Biochemistry **19**(22): 5111-5117.
- Wang, J. S. and V. J. Kefalov (2011b). "The cone-specific visual cycle." Prog Retin Eye Res **30**(2): 115-128.
- Wang, X., T. Wang, Y. Jiao, J. von Lintig and C. Montell (2010). "Requirement for an enzymatic visual cycle in *Drosophila*." Curr Biol **20**(2): 93-102.
- Wang, X., T. Wang, J. D. Ni, J. von Lintig and C. Montell (2012). "The *Drosophila* visual cycle and de novo chromophore synthesis depends on rdhB." J Neurosci **32**(10): 3485-3491.
- Winzeler, A. and J. T. Wang (2013). "Purification and culture of retinal ganglion cells." Cold Spring Harb Protoc **2013**(7): 614-617.
- Wolf, G. (2001). "The discovery of the visual function of vitamin A." J Nutr **131**(6): 1647-1650.
- Yates, R. A. and P. Keen (1976). "The distribution of free amino acids in subdivision of rat and frog retinae obtained by a new technique." Brain Res **107**(1): 117-126.
- Yau, K. W. and R. C. Hardie (2009). "Phototransduction motifs and variations." Cell **139**(2): 246-264.
- Zhao, X., W. Pack, N. W. Khan and K. Y. Wong (2016). "Prolonged Inner Retinal Photoreception Depends on the Visual Retinoid Cycle." J Neurosci **36**(15): 4209-4217.