

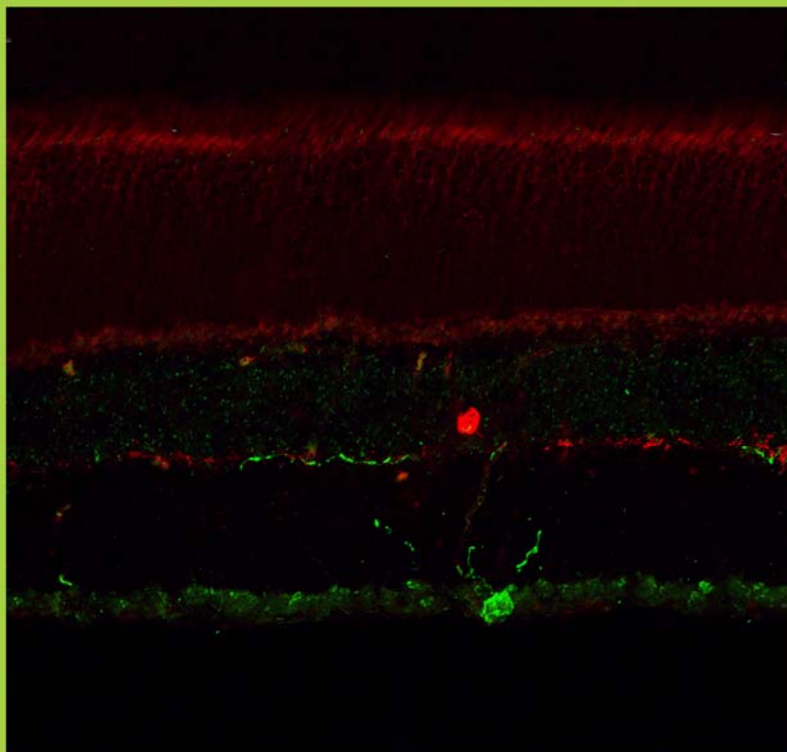


Universidad  
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

## TESIS DOCTORAL

# ESTUDIO CONDUCTUAL Y ESTRUCTURAL DEL SISTEMA VISUAL DE RATÓN RD10. EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA PROINSULINA



NÚRIA FORNS ESCUDÉ

2008



Universidad  
de Alcalá

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO CONDUCTUAL Y ESTRUCTURAL  
DEL SISTEMA VISUAL DE RATÓN RD10.  
EVALUACIÓN DEL EFECTO  
NEUROPROTECTOR DE LA PROINSULINA**

**NÚRIA FORNS ESCUDÉ**

**Madrid 2008**



D. **Pedro de la Villa Polo**, Director del Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA

que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título "*Estudio conductual y estructural del sistema visual de ratón rd10. Evaluación del efecto neuroprotector de la proinsulina*", que presenta Dña. **Núria Forns Escudé** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo la dirección del Profesor D. Pedro de la Villa Polo en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá y que cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 12 de diciembre del año 2007.



D. **Pedro de la Villa Polo**, Catedrático de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA

que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título "*Estudio conductual y estructural del sistema visual de ratón rd10. Evaluación del efecto neuroprotector de la proinsulina*", que presenta Dña. **Núria Forns Escudé** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá y que cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 12 de diciembre del año 2007.

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Pedro de la Villa, mi Director de Tesis. Tu inteligencia, tu sentido del humor y tu hospitalidad nunca dejarán de sorprenderme. Te agradezco tu confianza, tu optimismo y tu ilusión por la ciencia y por la vida, que me has transmitido tan generosamente. También agradezco tu perseverancia en mis momentos de deriva, y tu apuesta de futuro conmigo. Gracias por abrirme tantas puertas y por conseguir que estando tan lejos de mi hogar me sienta como en casa.*

Al **pare** i a la **mare**, fans incondicionals a distància. El vostre suport em dóna ales, sabeu? A la **Marta**, la meva txermaneta, font dels meus somriures, i al **Matt**, el meu cunyat i amic.

*A mi padre y a mi madre, fans incondicionales a distancia. ¿Sabéis? Vuestro apoyo me da alas. A Marta, mi hermanita, fuente de mis sonrisas, y a Matt, mi cuñado y amigo.*

A l'Àvia **Teresa** i a l'Àvia **Pepi**, per la sabiesa de la seva mirada i les llargues converses. A la **Tieta**, per okupa i per rondinaire, i per aquesta manera tant divertida que té d'estimar (i per els carquinyolis que sempre animen l'ambient laboral!). I en general a tota la meva **Família**, la que hi és i la que ja no hi és, perquè és la joia més bonica que tinc.

*A mis abuelas Teresa y Pepi, por la sabiduría de su mirada y las largas conversaciones. A la Tieta, por okupa y quejica, y por esta manera tan divertida que tienes de amar (¡y por los carquiñolis, que siempre animan el ambiente laboral!). Y en general a toda mi Familia, la que está y la que ya no está, porque es mi bien máspreciado.*

*A mis compañeros del laboratorio, que día a día han alimentado mi ilusión por el trabajo en equipo.*

*A Rima, ¡mi puntito! Hemos compartido alegrías, frustraciones, éxitos y memorables viajes. Gracias por tu amistad, tu confianza, tus consejos y tu ayuda. Tu mente abierta es un soplo de aire fresco para mí, y tu exigencia en el trabajo un ejemplo a seguir.*

*A Fran, por tus enseñanzas y tu paciencia. Por tus historias innecesariamente detalladas y por las risas.*

*A Javi, por tu ayuda ilimitada y por el afán contagioso de aprender y encontrar soluciones. Estoy segura que tu paciencia y tu comprensión están por encima del percentil 95 de la población.*

*A Laura, por tu buen humor inagotable, tus excentricidades musicales, tu ayuda, y tu perfección en el trabajo (¡que rabia das!)*

*A Norma, por pasar este periplo conmigo, y por las sesiones de palomitas. A Mirna, por mimarme y compartir tantas historias.*

*A Román, por estas observaciones tan originales.*

*A los investigadores que me han acogido para hacer parte de mi tesis en sus laboratorios, **Dra. Mara Dierssen, Dr. Enrique de la Rosa, Dr. José Manuel Alonso, y Dr. Manuel Vidal**, y a los compañeros que me guiaron en el aprendizaje, **Dr. Ignasi Sahún, la Dra. Silvia Corrochano, el Dr. Yao Chen, y el Dr. Marcelino Avilés**.*

*A la **Dra. Margarita Barón**, por el apoyo recibido a lo largo de estos años.*

*A **Cruz**, por tu ayuda y hospitalidad en todo momento. A **Inés**, por afinidad.*

Als meus **Amics** de casa, em fa feliç saber que el temps i la distància no poden amb nosaltres.

*A mis **Amigos de Madrid**, que me han acogido como una más.  
To my **Friends** around the globe, who I carry in my heart.*

*A los **Jóvenes Investigadores** de la Facultad de Medicina, por animar las largas jornadas de trabajo.*

*Al **Bàsquet**, que, per estrany que sembli, m'ha guiat fins aquí.  
Al **Baloncesto**, que, por raro que parezca, me ha guiado hasta aquí.*

*Y a todas las personas que han ayudado, de una manera o de otra, a la realización de esta Tesis Doctoral.*

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la Beca FPU AP2003-2221 recibida del **Ministerio de Educación y Ciencia**, y a los Proyectos de Investigación ref. n° SAF2001-1038 y SAF2004-5870 concedidos al Dr. Pedro de la Villa.

## RESUMEN

El presente trabajo investiga desde un punto de vista estructural y a través de estudios conductuales aquellos aspectos menos explorados del sistema visual de ratones que sufren una degeneración retiniana. Asimismo, el trabajo pretende profundizar en el estudio del posible efecto neuroprotector de la proinsulina, molécula con demostrado efecto modulador de distintos procesos celulares en el sistema nervioso de los mamíferos.

Desde que hace más de un siglo se propusiese la teoría dual de la visión, ha sido ampliamente aceptado que en la retina de los vertebrados existen dos sistemas de fotorrecepción: bastones para la visión escotópica y conos para la visión fotópica. Ambos sistemas forman parte de la vía visual de la retina, y proyectan a zonas subcorticales y corticales del cerebro desempeñando así funciones de percepción visual. Recientemente, se ha descrito un tercer tipo de célula fotosensible en la retina que proyecta fundamentalmente al núcleo supraquiasmático del hipotálamo y que no parece participar en funciones de percepción visual. Se trata de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). Las ipRGC constituyen un grupo reducido de células ganglionares encargadas de regular las funciones no visuales, como son la actividad circadiana o el diámetro de la pupila.

La presente Tesis Doctoral se plantea el estudio funcional de las dos vías de la retina, la visual y la no visual, de forma comparativa entre ratones que sufren una degeneración y controles sanos. Asimismo, debido a la novedad de estas células, se plantea la descripción morfológica de las ipRGC en retinas con diferentes niveles de degeneración. Por último, y basado en estudios previos del Laboratorio de Neurofisiología Visual de la UAH, se estudiará el posible efecto neuroprotector de la proinsulina en la retina de ratón distrófico.

El estudio morfológico de las ipRGC se ha llevado a cabo mediante tinciones inmunohistoquímicas que ilustran la estructura de dichas células y su comunicación con otras células retinianas. Para el estudio de la función visual y no visual se han realizado

experimentos de comportamiento animal, documentando la repercusión que tiene la degeneración retiniana en aspectos conductuales de los animales. Concretamente, para el estudio de la vía visual se ha analizado el reflejo optoquinético mediante el *test* optomotor, y para el estudio de la vía no visual se ha analizado la actividad circadiana de los animales mediante la rueda de actividad.

La presente Tesis Doctoral demuestra que la degeneración de fotorreceptores, conos y bastones, en los modelos múridos de retinosis pigmentaria se acompaña de un proceso de remodelación de la retina interna que afecta a la vía no visual, y se manifiesta como cambios en los procesos dendríticos de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles. Asimismo, esta degeneración va acompañada de una pérdida funcional de la vía responsable del reflejo optoquinético, siendo el curso temporal de la pérdida de fotorreceptores en los modelos animales de degeneración retiniana paralelo a la disminución de la respuesta del animal al *test* optomotor. En este sentido, la proinsulina parece ejercer un efecto neuroprotector sobre los fotorreceptores en degeneración, dado que los animales con sobre-expresión de proinsulina mantienen sus respuestas al *test* optomotor para edades en que los animales distróficos no proinsulínicos ya muestran una respuesta abolida.

Por el contrario, la degeneración de los fotorreceptores en los modelos múridos de retinosis pigmentaria no afecta a la función intrínseca de las ipRGC de sincronizar la actividad circadiana con las condiciones lumínicas ambientales. Sí queda afectado, sin embargo, el ritmo endógeno de los ratones distróficos, el cual está gobernado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, y cuyo periodo es significativamente más corto en animales control. En este sentido, la proinsulina parece que vuelve a ejercer un papel neuromodulador en la retina, ya que los animales distróficos con sobre-expresión de proinsulina no experimentan variaciones en su actividad circadiana endógena.

Estimamos que la presente Tesis Doctoral documenta el protagonismo de las ipRGC en la conducta visual de los mamíferos y confirma el efecto neuroprotector de la proinsulina en la retina de ratón.



## SUMMARY

The present work intends to look for some uninvestigated aspects of retinal degeneration in mice by means of morphological and behavioral studies. Also, this dissertation aims to look further into the possible neuroprotective effect of proinsulin, a molecule with a well known modulating effect in the mammalian nervous system.

Since the dual theory of vision was proposed more than one century ago, it has been widely accepted that there are two photoreceptors in the vertebrate retina: rods and cones. Both systems are part of the visual pathway of the retina; this visual pathway projects to sub-cortical and cortical regions of the brain and carries out visual perception. Recently, a third type of retinal photoreceptor cell has been described, which projects mainly to the hypothalamus and does not seem to participate in visual perception. These cells have been named "*intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*" (ipRGC), and they comprise a very reduced group of retinal ganglion cells that regulate the non-visual functions of the retina, like for instance circadian activity and pupil diameter.

The work aims to study both, visual and non-visual, paths of the retina in mouse models of retinal degeneration. Also, and since it is such a new cell type, the Thesis intends to describe the morphological changes suffered by the ipRGC in different retinal degenerative stages. Lastly, the Thesis studies the possible neuroprotective effect of proinsulin in the retina of dystrophic mice.

The morphological study of ipRGC was done by means of immunohistochemistry staining which illustrates the structure of such cells, as well as their communication

with other cells in the retina. On the other hand, the functional study of the paths of the retina was carried out by the use of animal behavioral tests in order to elucidate the ultimate repercussions that degenerative retinal diseases might have on animal conduct. Specifically, the optokinetic reflex was analyzed by means of the *optomotor test*, to study the visual path of the retina, and the circadian activity was examined by means of the *activity wheel*, to evaluate the non-visual path of the retina.

The results show that photoreceptor degeneration in dystrophic mice is followed by changes in the structure of the inner retina, which affect its non-visual pathway. These changes involve alterations in the dendritic processes of the ipRGC. Furthermore, retinal degeneration goes hand in hand with a functional loss of the visual pathway that regulates the optokinetic reflex, and the temporal course of photoreceptor loss parallels the diminishing performance of dystrophic mice in the optomotor test. On the other hand, the optokinetic reflex studies show that dystrophic mice which express proinsulin are responsive to the optomotor test for a longer time compared to dystrophic mice that do not express proinsulin. In addition, photoreceptor degeneration in dystrophic mice does not seem to affect the intrinsic function of ipRGC related to the synchronization of the circadian activity with light conditions. However, the free running periods in dystrophic mice are significantly longer than the free running periods in control mice. Proinsulin, again, seems to have a neuroprotective effect in the retina, since proinsulin expressing dystrophic mice have a free running period similar to those in control mice.

We conclude that this Thesis elucidates on the importance of the ipRGC in the visual conduct of mammals and confirms the neuroprotective effect of proinsulin in the mouse retina.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>SUMMARY</b> .....	iii
<b>ÍNDICE</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>LA VÍA VISUAL</b> .....	9
<i>El ojo</i> .....	9
<i>La retina</i> .....	10
<i>Células de la retina</i> .....	12
<b>LA VÍA NO VISUAL</b> .....	24
<b>VÍAS AFERENTES DEL NERVIO ÓPTICO</b> .....	30
<i>Las proyecciones visuales</i> .....	32
<i>Reflejo optoquinético y otros movimientos oculares</i> .....	33
<i>Las proyecciones no visuales</i> .....	35
<i>El ritmo circadiano</i> .....	36
<b>DEGENERACIONES RETINIANAS</b> .....	40
<i>Degeneraciones hereditarias de la retina</i> .....	40
<i>Distrofia de conos</i> .....	41
<i>Retinosis Pigmentaria</i> .....	42
<i>Modelos experimentales de retinosis pigmentaria</i> .....	45

NEUROPROTECCIÓN .....	47
<i>Proinsulina</i> .....	49
COMPORTAMIENTO VISUAL .....	54
<i>Test optomotor</i> .....	55
<i>Rueda de actividad circadiana</i> .....	57
<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	65
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	67
<i>Mantenimiento y sacrificio de los animales</i> .....	74
MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO .....	75
<i>Preparación de los cortes histológicos</i> .....	75
<i>Anticuerpos utilizados</i> .....	76
<i>Microscopía</i> .....	78
TEST OPTOMOTOR.....	78
ACTIVIDAD CIRCADIANA.....	82
<b>RESULTADOS</b> .....	89
INMUNOHISTOQUÍMICA .....	91
<i>Estudio inmunohistoquímico de las ipRGC</i> .....	91
<i>ipRGC en retinas de ratones distróficos rd1 y rd10</i> .....	91
<i>ipRGC en retinas de ratón hProIns</i> .....	93
<i>Células amacrinas dopaminérgicas (DA)</i> .....	95
<i>Relación de las ipRGC con las DA</i> .....	97
TEST OPTOMOTOR.....	101

<i>Estudio conductual de la vía visual</i> .....	101
<i>Diseño experimental y aplicación del test optomotor</i> .....	101
<i>Test optomotor en ratones C57</i> .....	102
<i>Test optomotor en ratones Rd1</i> .....	104
<i>Test optomotor en ratones Rd10</i> .....	105
<i>Comparación de resultados entre C57, Rd1 y Rd10</i> .....	106
<i>Test optomotor en ratones hProIns</i> .....	108
<b>ACTIVIDAD CIRCADIANA</b> .....	111
<i>Estudio conductual de la vía no visual</i> .....	111
<i>La actividad circadiana</i> .....	111
<i>Evaluación del ritmo endógeno de actividad circadiana en</i> .....	112
<i>ratones rd.</i>	
<i>Evaluación del efecto del cambio de fase sobre la actividad</i> .....	117
<i>circadiana de ratones rd.</i>	
<i>Estudio de la sensibilidad a la luminosidad</i> .....	118
<b>DISCUSIÓN</b> .....	123
<i>Células Ganglionares Intrínsecamente Fotosensibles</i> .....	127
<i>Test Optomotor</i> .....	133
<i>Actividad Circadiana</i> .....	136
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	<i>TÍTULO</i>	página
Figura 1	<i>Receptores rhabdoméricos y receptores ciliados.....</i>	5
Figura 2	<i>Esquema del globo ocular .....</i>	9
Figura 3	<i>Tipos celulares de la retina .....</i>	11
Figura 4	<i>Curvas de Sensibilidad Espectral de conos y bastones .....</i>	14
Figura 5	<i>Mecanismo molecular de la fototransducción en el bastón .....</i>	15
Figura 6	<i>Vías on y off de transmisión sináptica de la información visual ....</i>	21
Figura 7	<i>Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC).....</i>	25
Figura 8	<i>Posible mecanismo molecular de la fototransducción .....</i> <i>en las ipRGC.</i>	28
Figura 9	<i>Proyecciones centrales de las células ganglionares de la .....</i> <i>retina de ratón.</i>	31
Figura 10	<i>Áreas pretectales en cerebro de ratón .....</i>	33
Figura 11	<i>Núcleo supraquiasmático en cerebro de ratón .....</i>	37
Figura 12	<i>Imágenes del fondo de ojo de pacientes con retinosis pigmentaria</i>	44
Figura 13	<i>Degeneración retiniana en ratones rd.....</i>	46
Figura 14	<i>Esquemas de la estructura molecular de Proinsulina .....</i>	49
Figura 15	<i>Estructura de los receptores de los factores tróficos .....</i> <i>de la familia de la insulina.</i>	52
Figura 16	<i>Animales de experimentación.....</i>	67
Figura 17	<i>Identificación de los ratones rd10 por análisis del genotipo.....</i>	71
Figura 18	<i>Identificación de los ratones hProIns por análisis del genotipo .....</i>	72
Figura 19	<i>Árbol genealógico de los ratones transgénicos hProIns .....</i>	73

Figura 20	<i>Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico</i> .....	77
Figura 21	<i>Esquema del material utilizado para la realización del Test Optomotor.</i> .....	79
Figura 22	<i>Ejemplo de los resultados obtenidos en el test optomotor</i> .....	81
Figura 23	<i>Equipamiento empleado para la evaluación de la actividad circadiana.</i> .....	82
Figura 24	<i>Representación gráfica de la actividad motora de un animal control C57.</i> .....	84
Figura 25	<i>Representación gráfica de la actividad circadiana.</i> .....	85
Figura 26	<i>Actividad circadiana en luz constante</i> .....	87
Figura 27	<i>Patrón de inmunorreactividad contra melanopsina en la retina de ratones controles sanos y distróficos.</i> .....	93
Figura 28	<i>Patrón de inmunorreactividad contra melanopsina en la retina de ratones distróficos y ratones con sobre-expresión de proinsulina</i> .....	95
Figura 29	<i>Patrón de inmunorreactividad contra tirosina hidroxilasa en la retina de ratón.</i> .....	96
Figura 30	<i>Patrón de doble inmunorreactividad contra melanopsina y tirosina hidroxilasa en la retina de ratón.</i> .....	99
Figura 31	<i>Alteración estructural en las ipRGC de ratones rd.</i> .....	100
Figura 32	<i>Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en controles sanos.</i> .....	103
Figura 33	<i>Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en animales distróficos rd1.</i> .....	104
Figura 34	<i>Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en animales distróficos rd10.</i> .....	105
Figura 35	<i>Comparación de la función visual en animales controles, rd1 y rd10.</i> .....	107
Figura 36	<i>Función visual en animales transgénicos hProIns</i> .....	109

Figura 37	<i>Comparación de la función visual entre animales transgénicos hProIns y controles, rd1 y rd10.</i>	110
Figura 38	<i>Actividad circadiana en animales distróficos rd1 y rd10.</i>	113
Figura 39	<i>Actividad circadiana en animales distróficos rd10 de diferentes edades.</i>	114
Figura 40	<i>Actividad circadiana en animales transgénicos hProIns.</i>	116
Figura 41	<i>Actividad circadiana en animales controles sanos y distróficos sometidos a cambios de fase.</i>	118
Figura 42	<i>Contribución de fotorreceptores clásicos (bastones y conos) a la sincronización de la actividad circadiana con la luminosidad ambiental.</i>	120
Figura 43	<i>Sincronización de la actividad circadiana con la luminosidad ambiental.</i>	121



## ABREVIATURAS

<b>CG</b>	Capa de células ganglionares
<b>CNE</b>	Capa nuclear externa
<b>CNI</b>	Capa nuclear interna
<b>CPE</b>	Capa plexiforme externa
<b>CPI</b>	Capa plexiforme interna
<b>CS</b>	Colículo superior
<b>DA</b>	Células amacrinas dopaminérgicas
<b>DAG</b>	Diaglicerol
<b>GMPc</b>	Guanosin mono fosfato cíclico
<b>hProIns</b>	Ratón con expresión del gen humano de la proinsulina
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>ipRGC</b>	Célula ganglionar intrínsecamente fotosensible (del inglés <i>intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cell</i> )
<b>NOT</b>	Núcleo del tracto óptico
<b>OPN</b>	Núcleo pretectal de la oliva
<b>PDE</b>	Fosfodiesterasa
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>rd</b>	degeneración de bastones ( <i>rod degeneration</i> )
<b>Rho</b>	Rodopsina
<b>RP</b>	Retinosis pigmentaria
<b>SCN</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>SE</b>	Capa de los segmentos externos
<b>C57</b>	Ratón control sano de fondo genético C57BL/6j
<b>Rd1, Rd10</b>	Ratones con degeneración retiniana
<b>24 D/D</b>	Condiciones lumínicas de 24 horas oscuridad
<b>12:12 L/D</b>	Condiciones lumínicas de 12 horas luz y 12 horas oscuridad
<b>L<sub>f</sub></b>	Condiciones lumínicas fotópicas
<b>L<sub>m</sub></b>	Condiciones lumínicas mesópicas
<b>L<sub>e</sub></b>	Condiciones lumínicas escotópicas
<b>D</b>	Condiciones de oscuridad absoluta
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa

# **INTRODUCCIÓN**



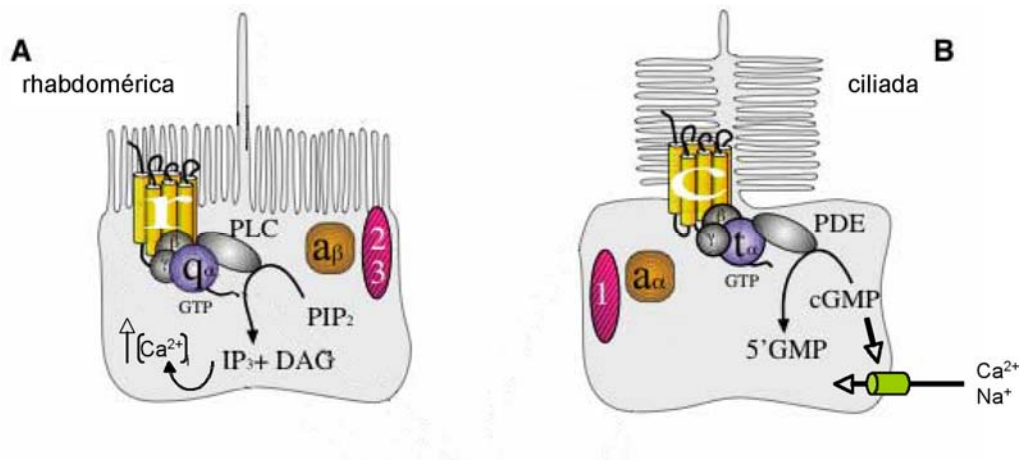
Es difícil encontrar un ser vivo que pueda sobrevivir sin la existencia del sol. Dependemos de la luz del sol, tanto por su calor como por su iluminación, tanto para captar nuestro entorno, como para organizar nuestra actividad. Prácticamente todos los ciclos biológicos a los que los seres vivos estamos sometidos se mueven en función de la luz solar.

A lo largo de la evolución han aparecido varias estrategias para poder captar esta luz, creándose así en los distintos seres vivos diferentes sistemas de detección lumínica, que van de lo más rudimentario, como las “stemmata” de las larvas de algunos insectos, a los sistemas más avanzados, como los ojos de las aves o de los primates. Todos estos sistemas visuales tienen en común, con más o menos sofisticación, la presencia de células especializadas que son sensibles a la luz, es decir, **células fotosensibles**. En este sentido, se han descrito dos vías evolutivas principales de células fotosensibles que permiten a los seres vivos percibir la iluminación del mundo que les rodea: la célula rhabdomérica y la célula ciliada.

Las células rhabdoméricas se encuentran por ejemplo en los ojos compuestos de los artrópodos. Las células ciliadas se pueden encontrar, por ejemplo, en los ojos de los vertebrados. Según estudios recientes (Arendt *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 2005; Platchetzki *et al.*, 2005), ambos sistemas de fotosensibilización parecen haber evolucionado paralelamente desde que su antepasado común se dividió hace aproximadamente 600 millones de años. Las diferencias principales que existen entre

ambos tipos de células fotosensibles son la estructura de sus membranas fotorreceptoras y la maquinaria bioquímica responsable de la fototransducción (transducción de una energía lumínica en energía eléctrica). Como el proceso de detección de la energía luminosa ocurre en la membrana celular, ambos tipos celulares tienen estrategias para ampliar su superficie de membrana y hacer así la fotorrecepción más efectiva. Las células ciliadas, por ejemplo, aumentan su superficie de membrana gracias a la extensión de una estructura interior, el cilio, alrededor del cual se forman numerosos pliegues transversales al eje principal, que le dan la apariencia de un conjunto de discos dispuestos uno encima del otro. En cambio, las células rhabdoméricas dirigen sus pliegues de membrana directamente desde el cuerpo celular hacia el exterior, lo que semeja el efecto de un "corte de pelo militar".

En relación a los procesos bioquímicos responsables de la fototransducción, en las células ciliadas dicho proceso se basa en la activación de la fosfodiesterasa (PDE), que regulará el nivel de GMP cíclico (GMPC) intracitoplásmico y determinará un cambio de potencial de membrana (hiperpolarización) actuando sobre canales iónicos de membrana sensibles a GMPC. Por el contrario, el proceso de fototransducción en las células rhabdoméricas se basa en la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la cascada del inositol trifosfato (IP3); el IP3 induce un aumento de los niveles de calcio citoplasmático y una despolarización celular. En la **figura 1** se muestra un esquema de una célula rhabdomérica y una célula ciliada donde se puede ver la estructura y los procesos bioquímicos diferenciales de ambos tipos celulares.



**Figura 1: Receptores rhabdoméricos y receptores ciliados.**

Representación esquemática de las cascadas de activación molecular de una células fotorreceptora rhabdomérica (A) y otra ciliada (B). La activación por la luz de las moléculas fotosensibles (r) en la célula rhabdomérica activa la cascada de la fosfolipasa C (PLC). La activación por la luz de las moléculas fotosensibles (c) en la célula ciliada responde a estímulos lumínicos activando la cascada de la fosfodiesterasa (PDE). Modificado de Arendt, 2003.

El sistema visual de los vertebrados se origina en el ojo, como órgano encargado de captar la luz del entorno. Concretamente, la retina es la estructura que contiene células fotorreceptoras ciliadas responsables de la fototransducción. Las señales eléctricas generadas en estas células, tras ser procesadas por otras células retinianas, son enviadas hacia centros nerviosos superiores para su ulterior interpretación (visión). El ojo cuenta además con otras estructuras, que tienen la función de hacer llegar la luz a la retina lo más nítida y claramente posible para conseguir un buen ángulo y enfoque del entorno.

Se puede considerar por tanto que los fotorreceptores ciliados (fotorreceptores clásicos: **conos y bastones**) son el primer elemento de la *vía visual*.

En los últimos años, sin embargo, se han descrito un *sistema no visual* en la retina. Se trata de una vía que regula los ritmos cíclicos corporales endógenos (ritmos circadianos) y que permiten sincronizarlos con los niveles de luminosidad ambiental; esta función por tanto no es propiamente visual. La *vía no visual* de la retina de los vertebrados se inicia en un tipo específico de células retinianas, las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (Berson, 2003). Curiosamente, el origen de estas células ganglionares es rhabdomérico (Isoldi *et al.*, 2005).

El sistema visual constituye uno de los principales sistemas sensoriales de los vertebrados superiores y en especial del hombre. El humano vive un mundo en el que la mayoría de sus actividades se basan fundamentalmente en la capacidad de percepción visual. Sin embargo, los fotorreceptores retinianos constituyen un elemento celular expuesto a continuos daños y procesos patológicos de origen diverso. En este sentido, la degeneración de conos y bastones origina un número nada despreciable de discapacidades visuales y, eventualmente, cegueras en el mundo desarrollado. A lo largo de los últimos años se han descrito múltiples causas que originan el proceso degenerativo en fotorreceptores, entre las que destacan las mutaciones genéticas. Éstas alteran las moléculas responsables de la cascada de fototransducción y originan alteraciones celulares que conducen a la muerte de los fotorreceptores por apoptosis (distrofia retiniana). Sin embargo, en estos casos de degeneración retiniana, la pérdida

de conos y bastones (fotorreceptores clásicos de origen ciliar) no parece estar asociada a la alteración estructural o funcional de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (fotorreceptores de origen rhabdomérico).

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el funcionamiento de la vía visual y de la vía no visual de animales de experimentación que sufren un proceso degenerativo de conos y bastones, utilizando los **ratones rd**. Nuestro interés principal ha sido demostrar hasta que punto la alteración de la vía visual (por degeneración de fotorreceptores clásicos) afecta a la vía no visual (células ganglionares fotosensibles) y en qué medida las observaciones efectuadas pueden ser extrapoladas al ser humano. Si bien, el estudio planteado se puede abordar desde distintas aproximaciones experimentales, el trabajo ha buscado explorar aquellos aspectos que a nuestro juicio están menos documentados en el momento actual, como es la evaluación conductual del funcionamiento de las vías visuales y no visuales. Los experimentos de comportamiento animal, al realizarse en animales vivos y conscientes, ilustran con precisión la repercusión final que tiene el funcionamiento de dichas vías en ciertos aspectos conductuales.

En todo momento, además del trabajo desarrollado en ratones con degeneración de fotorreceptores, hemos realizado nuestra labor experimental en animales controles sanos, analizándose comparativamente los resultados obtenidos en unos y otros. De forma paralela, y con el fin de intentar documentar si las alteraciones funcionales detectadas van acompañadas de modificaciones estructurales en la retina, se ha



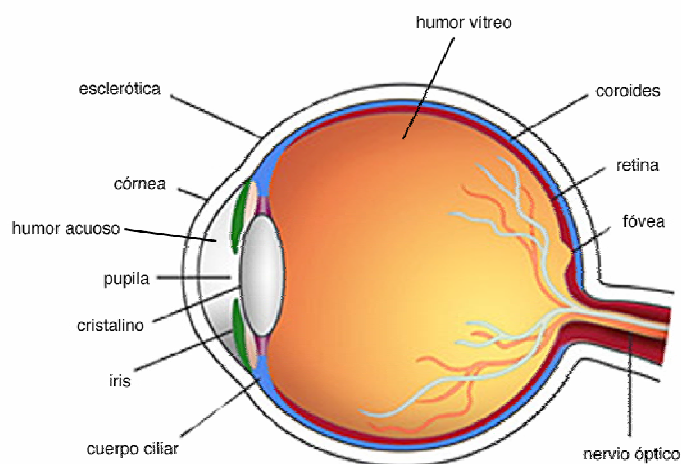
realizado un estudio estructural de las células retinianas implicadas en la vía no visual, tanto en animales sanos como distróficos.

Por último, siguiendo la línea de trabajo del laboratorio de Neurofisiología Visual de la Universidad de Alcalá, centrada en el estudio de mecanismos de neuroprotección retiniana mediados por **proinsulina** (Barhoum, 2006; Istillarte, 2007), en una última fase de cada serie experimental hemos intentado estudiar el posible papel neuroprotector que pudiera jugar la proinsulina sobre las funciones visuales evaluadas. Para ello, hemos utilizado un tercer modelo animal de experimentación, los **ratones hProIns**.

## LA VÍA VISUAL

### *El ojo*

Desde un punto de vista anatómico, el ojo de los vertebrados se compone de las siguientes partes: la esclerótica, tejido fibroso y flexible que se corresponde con la parte blanca del ojo; la coroides, red densa de vasos sanguíneos localizada interiormente a la esclerótica; la cornea y el cristalino, lentes oculares cuya función es el enfoque de la imagen visual en la retina; el iris, el cual actúa como un filtro, limitando la entrada de la luz al ojo; la pupila, que es el orificio que deja el iris en su porción central y que permite la entrada de rayos lumínicos; el cuerpo ciliar, estructura vascular cuya función es secretar humor acuoso para mantener la presión ocular; el humor vítreo, sustancia gelatinosa situada detrás del cristalino; y la retina, tejido nervioso situado en la pared posterior del ojo cuya función es la traducción de señales lumínicas en señales eléctricas y su procesamiento posterior, con el fin de conducir las al resto del sistema visual a través el nervio óptico. La **figura 2** muestra esquemáticamente las partes del globo ocular.



**Figura 2: Esquema del globo ocular.**

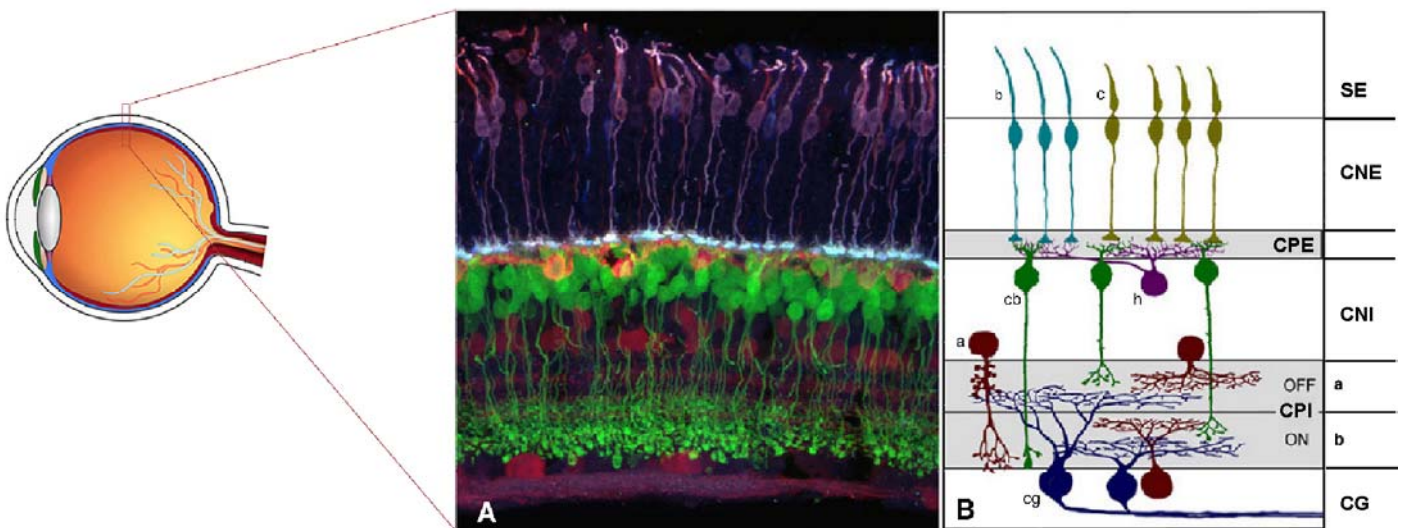
Se muestra de forma esquemática un corte sagital de un ojo humano y se indican sus estructuras macroscópicas. Modificado de [www.healthyeyes.org.uk](http://www.healthyeyes.org.uk)

## ***La retina***

De todas las partes del ojo, la presente Tesis Doctoral se centrará en mecanismos fisiológicos que tienen su origen en la retina, motivo por el cual profundizaremos en la descripción de los mecanismos funcionales que tienen lugar en esta porción del sistema nervioso central. Estructuralmente, la retina está altamente organizada en capas nucleares y plexiformes, organización que se mantiene en todos los vertebrados. Asimismo, todos los vertebrados presentan los mismos tipos de neuronas en la retina y mecanismos de conexión sináptica muy similares (Cajal, 1904).

La retina está formada principalmente por seis tipos de células distintas. Las células son los fotorreceptores, *bastones* y *conos*, las células horizontales, las células bipolares, las células amacrinas, las células interplexiformes, y las células ganglionares. Las capas de la retina donde se ubican dichas células son: la capa de los segmentos externos de conos y bastones, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, y la capa de las células ganglionares. La **figura 3** resume los tipos celulares y capas retinianas. Se han llegado a describir más de diez capas en la retina (Cajal 1904), pero dada la tendencia funcional de los últimos tiempos, actualmente se suelen citar las seis capas retinianas anteriormente mencionadas. De acuerdo al esquema mostrado en la figura 3, los distintos tipos celulares estarían integrados de forma característica en dichas capas: capa de los segmentos externos, formada por los segmentos externos de los conos y los bastones; la capa nuclear externa está formada por los cuerpos celulares de los conos y los bastones; la capa plexiforme

externa está formada por las sinapsis que establecen los fotorreceptores con sus células postsinápticas: células horizontales, y células bipolares; la capa nuclear interna está formada por los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares, y amacrinas; la capa plexiforme interna está formada por las sinapsis entre las células amacrinas, bipolares, y ganglionares, subdividida a su vez en dos subláminas principales, sublámina *on* (o sublámina *a*, más externa) y sublámina *off* (o sublámina *b*, más interna); y finalmente la capa de células ganglionares, formada por los cuerpos celulares de las células ganglionares.



**Figura 3: Tipos celulares de la retina.**

**A.** Fotografía de un corte sagital de retina de ratón marcado inmunocitoquímicamente con anticuerpos específicos para conos (malva) y células bipolares (verde). **B.** Esquema de retina donde se muestran los principales elementos celulares: bastones (b), conos (c), células horizontales (h), las células bipolares (cb), células amacrinas (a), y células ganglionares (cg). En la columna de la derecha se muestran las distintas capas retinianas: capa de los segmentos externos (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI) (con sus dos subláminas **a** y **b**) y capa de las células ganglionares (CG). Modificado de [webvision.med.utah.edu](http://webvision.med.utah.edu).

Algunos autores definen una última capa, la capa de fibras del nervio óptico, integrada por los axones de las células ganglionares y separada de dicha capa. Otro estrato celular, que desempeña una función importante en la retina, aunque a veces no se considere una parte de ésta, es el epitelio pigmentario. El epitelio pigmentario es una "monocapa" de células pigmentarias situada externamente a los segmentos externos de los fotorreceptores y que participa, entre otras funciones, en la renovación activa del pigmento visual de los fotorreceptores.

### ***Células de la retina***

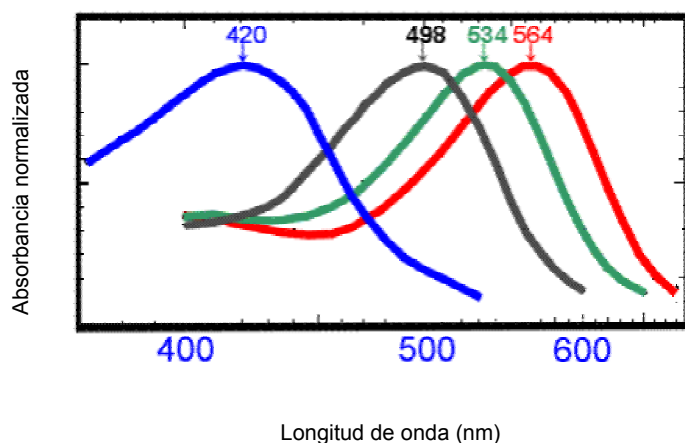
**Los fotorreceptores:** Los fotorreceptores retinianos, **conos** y **bastones**, han sido considerados durante muchos años como las únicas células fotosensibles de la retina de los vertebrados. Ambos tipos celulares se diferencian en la estructura de su segmento externo y en el pigmento visual que contienen, el cual determina su función. Los bastones son muy sensibles a la luz, ya que son estimulados con intensidades lumínicas muy bajas ( $<0,001 \text{ cd/m}^2$ ). Estos fotorreceptores realizan su labor funcional en condiciones de adaptación a la oscuridad o condiciones escotópicas. Estas condiciones de luminosidad se dan sólo por la noche, y no permite la visualización de colores o detalles espaciales del estímulo visual. Por el contrario, los conos necesitan mayor intensidad lumínica para ser estimulados ( $>0,3 \text{ cd/m}^2$ ). Estos fotorreceptores realizan su labor funcional en condiciones de adaptación a la luz o condiciones fotópicas. Estas condiciones lumínicas se dan durante el día, y permiten la visualización de detalles espaciales y la percepción de colores. En condiciones de luminosidad intermedia

(>0,001 y <0,3 cd/m<sup>2</sup>), también llamadas condiciones mesópicas, participarían ambos tipos de fotorreceptores, conos y bastones (Peichl, 2005).

Los conos y los bastones se disponen espacialmente en la retina siguiendo patrones característicos. En la retina humana, existe una zona central dedicada a la visión más nítida, que sólo tiene conos; dicha área es conocida como fovea. La fovea en humanos tiene un diámetro de un milímetro y medio. Sin embargo, no todos los mamíferos presentan fovea, aunque muchos de ellos muestran un área de mayor densidad de conos. En la retina de ratón, tan solo sólo un 2,8% del total de fotorreceptores (~437.000 células/mm<sup>2</sup>) son conos (Carter-Dawson y LaVail, 1979; Chang-Jin *et al.*, 1998). Existe gran variación en el ratio cono/bastón en la retina de los vertebrado. Las especies animales de hábitos nocturnos llegan a tener sólo un 0,5% de conos en su capa de células fotorreceptoras, mientras que hay mamíferos diurnos que llegan a tener un 95% de conos (Ahnelt y Kolb, 2000; Peichl *et al.*, 2000).

Los fotorreceptores clásicos muestran en su segmento externo una proteína que les hace sensibles a la luz, el fotopigmento o pigmento visual. En el caso de los bastones, su fotopigmento ha sido denominado rodopsina y presenta una máxima sensibilidad para estímulos lumínicos de una longitud de onda de 498 nm. Los conos, en cambio, pueden tener distintos tipos funcionales de fotopigmentos. En el caso de los humanos, se han descrito tres fotopigmentos distintos, con mayor sensibilidad para el azul, el verde y el rojo (Yokoyama, 2000). El cono azul, también llamado *S* de “*short wavelength*”, es máximamente sensible a la longitud de onda de 420 nm; el cono verde, o *M* de “*medium*

*wavelength*”, es máximamente sensible a la longitud de onda de 534 nm. Por último, el cono rojo o *L* de “*long-wavelength*”, es máximamente sensible a la longitud de onda de 564 nm. La **figura 4** muestra las curvas de sensibilidad espectral de los fotorreceptores de la retina humana. La mayoría de los mamíferos, y entre ellos el ratón, sólo presentan en su retina dos clases de conos, los verdes y los azules. En el caso del ratón, los conos *S* son máximamente sensibles a una longitud de onda de 360 nm y los conos *M* son máximamente sensibles a una longitud de onda de 508 nm (Yokoyama y Yokoyama, 2000).

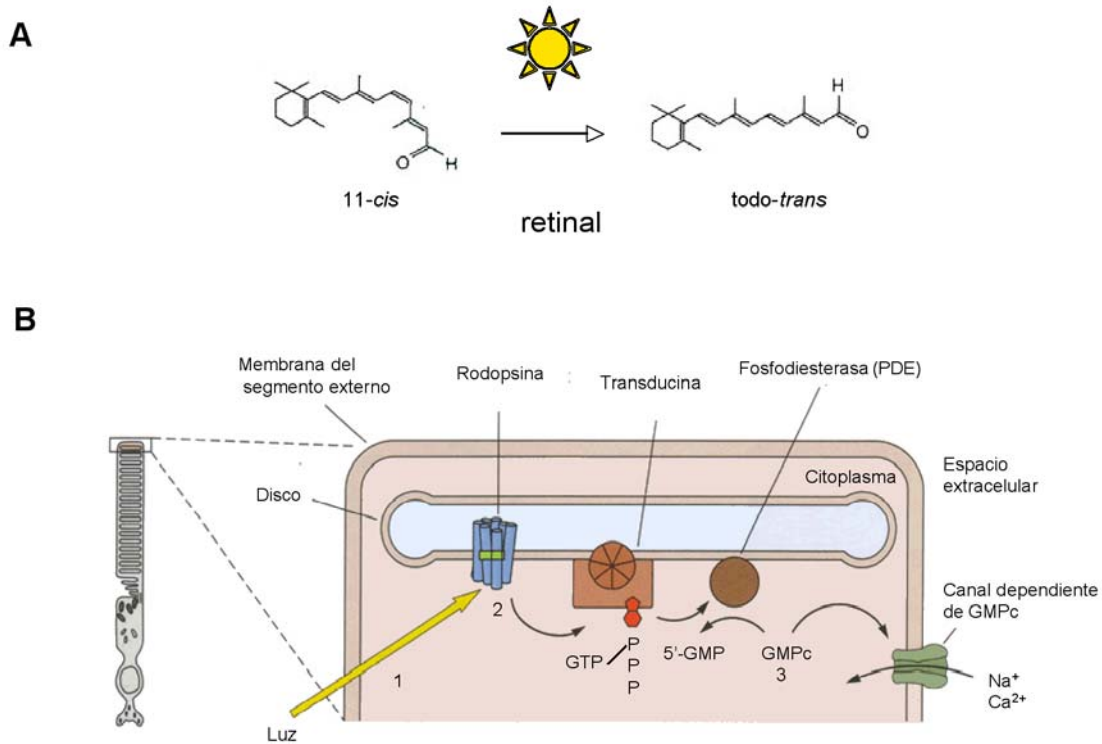


**Figura 4: Curvas de Sensibilidad Espectral de conos y bastones.**

Se muestra en código de colores la curva de sensibilidad espectral correspondiente a cada tipo de cono (rojo, verde y azul). La curva negra corresponde a los bastones. Se indica el valor numérico de la máxima sensibilidad. Tomado de [www.phys.ufl.edu](http://www.phys.ufl.edu)

Como ya ha sido mencionado, los fotorreceptores son responsables del proceso de fototransducción. La fototransducción es el proceso por el cual la energía lumínica recibida por los fotorreceptores es traducida en energía/señales eléctricas. Dicho proceso ocurre a nivel del segmento externo de los fotorreceptores, los cuales contienen los pigmentos visuales. Los pigmentos visuales son unos complejos covalentes compuestos por una proteína de gran peso molecular, llamada **opsina**, y un pequeño compuesto químico, derivado de la vitamina A, que absorbe la luz, el **retinal**. La

rodopsina, en su estado inactivado, contiene el isómero del retinal, el 11-*cis* retinal. La **figura 5** muestra el efecto de la luz sobre el retinal y la cascada de reacciones bioquímicas que se desencadena.



**Figura 5. Mecanismo molecular de la fototransducción en el bastón.**

**A.** Estructura del retinal en sus dos isómeros 11-*cis* y todo-*trans*. Por efecto de la luz, el 11-*cis* retinal se convierte en todo-*trans* retinal. **B.** Esquema del proceso de fototransducción en el segmento externo del bastón. La luz incide en el retinal (1), que al cambiar su conformación altera la estructura de la rodopsina, que se transforma en metarrodopsina. La metarrodopsina activa la subunidad alfa de la transducina (2), una proteína G que al ser activada libera otras unidades inhibitorias en el citoplasma. Cuando la subunidad alfa de la transducina es activada intercambia GDP por GTP y es capaz de unirse a la fosfodiesterasa (PDE). La PDE activada comienza la hidrólisis del GMPC que se encuentra en abundancia en el interior del citoplasma del fotorreceptor, con lo cual disminuye su concentración. Cuando la concentración de GMPC en la célula disminuye se cierran los canales catiónicos GMPC-dependientes, permeables a Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. El bloqueo del flujo de cationes al interior de la célula, produce la hiperpolarización del fotorreceptor. Modificado de Kandel, 2001.



La absorción de la luz por el 11-*cis* retinal induce su transformación en su isómero, el todo-*trans* retinal. Este cambio determina una modificación conformacional del retinal que a su vez activa la rodopsina, la cual desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el seno de la célula fotorreceptora que acabará por producir un cierre de canales catiónicos y la hiperpolarización de la célula.

Aunque los conos expresan opsinas con distinta sensibilidad, su mecanismo de fototransducción es similar al de los bastones. La señal eléctrica generada en el fotorreceptor por efecto de la fototransducción es transmitida sobre las células postsinápticas a los fotorreceptores en la capa plexiforme externa. En ausencia de estímulo lumínico, los fotorreceptores liberan glutamato sobre sus células postsinápticas. Cuando los fotorreceptores reciben su estímulo natural, se hiperpolarizan y disminuyen la liberación de glutamato por su terminal axónica, lo que determina la respuesta funcional de sus células postsinápticas y el comienzo de la codificación de la información sensorial en la retina.

**Las células horizontales:** Las células horizontales establecen sus conexiones sinápticas con los fotorreceptores a nivel de la terminal axónica de estos. Su función es establecer una vía de comunicación trasversal de los fotorreceptores entre sí. Por otra parte, las células horizontales establecen conexiones eléctricas (*gap junctions*) con otras células horizontales (Kaneko, 1971). Las células horizontales abarcan una gran extensión en la retina, debido a la distribución espacial de sus dendritas y axón, abarcando cada célula horizontal una región de hasta 700 fotorreceptores (Rodieck,

1998). La principal función conocida de las células horizontales es proveer a los fotorreceptores de un mecanismo de inhibición lateral, que permita la correcta percepción de los contornos (Rodieck, 1998).

**Las células bipolares:** Desde un punto de vista funcional, existen dos tipos principales de células bipolares: las células bipolares de cono y las células bipolares de bastón, de acuerdo al tipo de fotorreceptor de quien reciben su *input* principal. A su vez, las células bipolares de cono puede sub-clasificarse en células *off* y células *on*. Cada una de estas células tiene una reacción distinta a la señal glutamatérgica recibida de los fotorreceptores. Las células bipolares de cono tipo *off* se despolarizan por efecto del glutamato, debido sus receptores de AMPA/kainato (Wässle y Boycott, 1991). Además, sus terminales axónicas establecen sus sinapsis en la porción más superficial de la capa plexiforme interna, a nivel de la denominada sublámina *off*.

Por su parte, las células bipolares de cono tipo *on*, se hiperpolarizan por efecto del glutamato debido a que expresan receptores de tipo metabotrópico (De la Villa et al., 1995). Asimismo, las terminales axónicas de las células bipolares tipo *on* establecen sus conexiones sinápticas en la sublámina *on* de la capa plexiforme interna.

Las células bipolares de cono, tanto *off* como *on*, establecen conexiones sinápticas con células ganglionares y células amacrinas a nivel de la capa plexiforme interna. Ambos tipos celulares liberan glutamato, neurotransmisor que actúa sobre receptores de membrana tanto en células amacrinas como en células ganglionares.

Por otro lado, las células bipolares de bastón sólo reciben *input* de bastones y son todas de tipo *on*. Las células bipolares de bastón no establecen conexiones directas con células ganglionares, sino que establecen sinapsis únicamente con las células amacrinas de tipo AII (véase más adelante)(Mills y Massey, 1995). A través de estas células amacrinas, las células bipolares de bastón se comunican con los dos tipos de células bipolares de conos a nivel de sus terminales axónicas. En la sublámina *off*, las células amacrinas AII actúan sobre las bipolares de cono de tipo *off* liberando glicina. En la sublámina *on*, las células amacrinas AII actúan sobre las bipolares de cono de tipo *on* a través de conexiones eléctricas (Famiglietti *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1978).

**Las células amacrinas:** Las células amacrinas son un grupo muy heterogéneo de interneuronas que modulan la información sensorial en la capa plexiforme interna. Hacen sinapsis con células bipolares, células ganglionares y también con otras células amacrinas, pudiendo actuar como células excitadoras o inhibitoras. En este sentido, la gran mayoría de las células amacrinas son capaces de liberar glicina o GABA.

Desde los trabajos clásicos de Cajal, que describía cuatro clases distintas de células amacrinas (monoestratificadas, biestratificadas, difusas y dislocadas) (Cajal 1904), hasta la fecha, se han descrito más de veinticinco tipos distintos de células amacrinas en la retina de los mamíferos (MacNeil y Masland, 1998). Las células amacrinas más abundantes son las ya mencionadas células AII las cuales participan en la vía de los bastones y representan aproximadamente el 12% de la totalidad de células amacrinas. Las AII tienen un campo dendrítico pequeño, y estratifican sus prolongaciones tanto en

la sublámina *a* de la capa plexiforme interna como en la sublámina *b*. Otra clase de células amacrinas ampliamente estudiadas son las amacrinas *starburst*, las cuales parecen potenciar la respuesta de las células ganglionares a estímulos en movimiento (Borg-Graham *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1995; He y Masland, 1997).

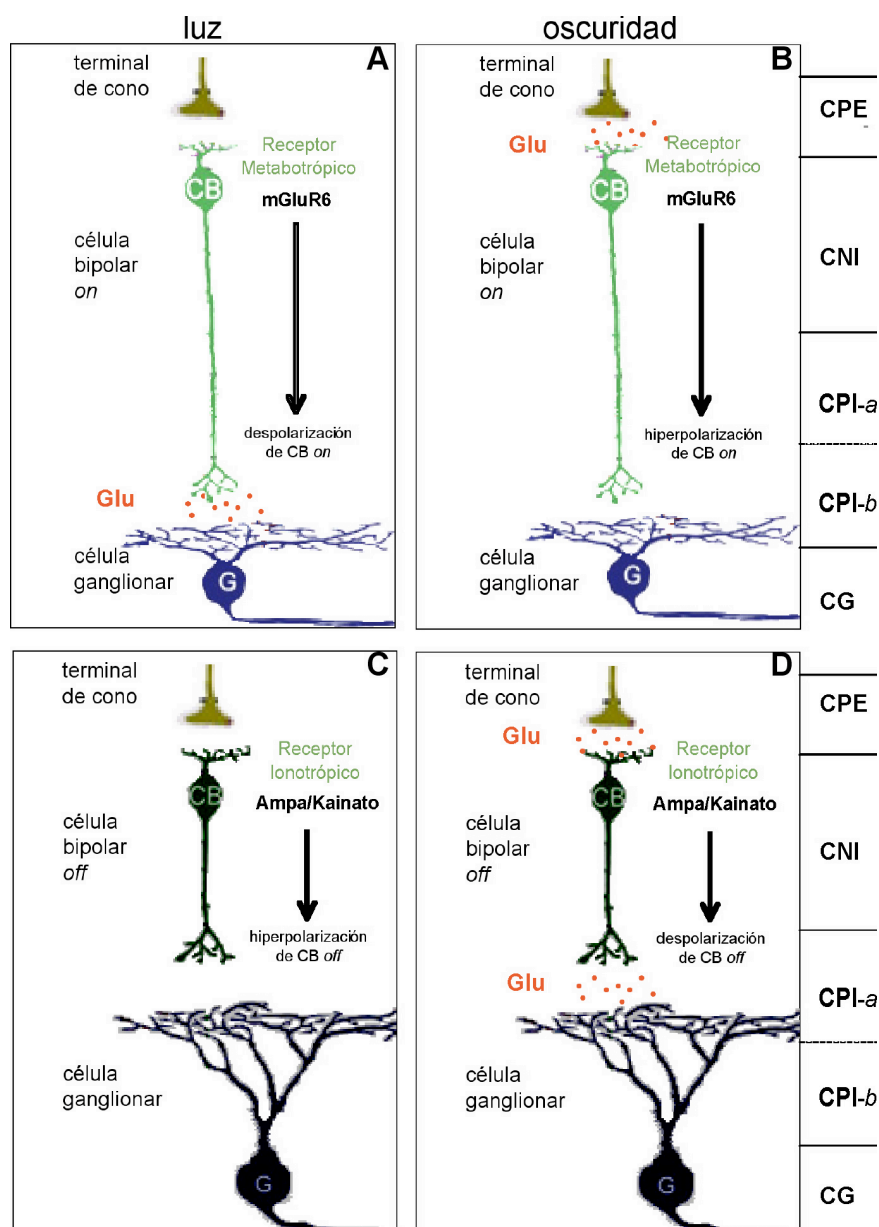
Últimamente, se ha centrado gran interés en un tipo de célula amacrina que es capaz de sintetizar y liberar dopamina, son las células amacrinas dopaminérgicas (DA) (Dowling y Ehinger, 1975; Eglén *et al.*, 2003; Viney *et al.*, 2007; Vugler *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Las células amacrinas dopaminérgicas presentan un amplio árbol dendrítico que estratifica en la parte más externa de la capa plexiforme interna, y parecen estar involucradas en ciertas funciones visuales como modular los mecanismos de adaptación a la luz y a la oscuridad en los circuitos retinianos (Witkovsky, 2004). En este sentido, la dopamina lleva a cabo su función moduladora a través de diferentes mecanismos; la dopamina modula la conductancia de las *gap junctions* entre células horizontales y entre las propias células amacrinas; también potencia la respuesta de los receptores ionotrópicos de glutamato en las células bipolares de cono; asimismo también parece regular el balance centro-periferia de las respuestas de las células ganglionares de la retina (Masland, 2001). La dopamina parece actuar en la retina tanto a nivel sináptico como a nivel paracrino.

Hasta la fecha se ha descrito que la liberación de la dopamina por las células dopaminérgicas parece estar inducida por estímulos lumínicos, ya sea la incidencia de una luz mantenida sobre la retina como la estimulación con una iluminación fluctuante

(*flicker*). También se ha descrito cierta autorregulación circadiana de la retina, independiente de la luz, que pudiera regular la liberación de dopamina (Bauer *et al.*, 1980; Mangel y Dowling, 1985; Umino *et al.*, 1991; Weiler *et al.*, 1997; Nir *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2002a, b; Ribelayga *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

**Las células ganglionares:** Las células ganglionares son el último relevo funcional de las neuronas de la retina, y las células capaces de convertir los cambios de lentos potencial de las interneuronas retinianas (bipolares y amacrinas) en potenciales de acción. Las células ganglionares conducen los potenciales de acción hacia otros centros nerviosos a través de sus axones, que conforman el nervio óptico. Las mayoría de las células ganglionares de la retina poseen campos receptores circulares, con un centro y una periferia de respuesta antagónica. Así, las células ganglionares de centro *on* (que se excita con la luz), presenta una periferia *off* (que se inhibe con la luz), y viceversa. (Masland, 1986, 2001).

La **figura 6** muestra las vías centrípetas *on* y *off* de transmisión de la información en la retina de mamíferos. Se muestran los mecanismos de transmisión sináptica, neurotransmisores y receptores postsinápticos, en la primera y segunda sinapsis de la vía visual, tanto en condiciones de oscuridad como bajo la acción de un estímulo lumínico.



**Figura 6: Vías *on* y *off* de transmisión sináptica de la información visual.**

Los esquemas muestran las transmisiones sinápticas entre una terminal de cono, una célula bipolar, y una célula ganglionar, en cuatro casos distintos: en la vía *on* de la retina (con luz (A) y en la oscuridad (B)), y en la vía *off* de la retina (con luz (C) y en la oscuridad (D)). A continuación se describe el mecanismo subyacente en cada situación. La luz hiperpolariza los fotorreceptores, los cuales dejan de liberar glutamato. Esta reacción se canaliza de distintas formas en la retina, de acuerdo con el tipo de célula postsináptica. En la vía *on* de la retina (A), las células bipolares tienen receptores metabotrópicos (mGluR6) que al no recibir glutamato despolarizan la célula bipolar y causan una liberación de glutamato por parte de la misma. Por el contrario, en la vía *off* de la retina (C), las células bipolares tienen receptores ionotrópicos (AMPA/kainato) que al no recibir glutamato hiperpolarizan la célula bipolar y cierran la liberación de glutamato por parte de la misma. La oscuridad causa efectos exactamente contrarios a los descritos. Sin luz, los fotorreceptores están despolarizados y liberan glutamato. Éste provoca la hiperpolarización de las células bipolares de la vía *on* (B) así como la despolarización de las células bipolares de la vía *off* con una consecuente liberación de glutamato (D). Se muestran las capas celulares correspondientes en el lado derecho de la imagen, y las abreviaturas son las siguientes: CPE (capa plexiforme externa), CNI (capa nuclear interna), CPI-a (capa plexiforme interna-sublámina a), CPI-b (capa plexiforme interna-sublámina b), CG (capa de células ganglionares).

El estudio de las células ganglionares de la retina, desde un punto de vista funcional, ha sido objeto de numerosas investigaciones por un gran número de grupos de investigación. Inicialmente se describieron dos tipos funcionales de células ganglionares, las células ganglionares X y las células ganglionares Y (Enroth-Cugell y Robson, 1966). Las células X, en ratón llamadas de tipo II, tienen un soma pequeño y unas dendritas densamente agrupadas en un área reducida. Estas células proyectan tanto al núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) como al colículo superior (CS) (Provencio *et al.*, 1998b). Las células ganglionares X responden de forma sostenida a estímulos visuales y permiten discriminar entre estímulos próximos en el espacio. Las células Y, equivalentes a las tipo I en ratón (Dreher *et al.*, 1985), tienen un soma grande y expansiones dendríticas amplias; proyectan al NGLd (Provencio *et al.*, 1998a). Las células ganglionares Y responden de forma transitoria a estímulos visuales y permiten discriminar entre estímulos próximos en el tiempo (Cudeiro, 2005).

Posteriormente se describió un tercer tipo de célula ganglionar, las célula ganglionar W, o de tipo III en ratón; son de soma pequeño y amplias ramificaciones dendríticas. Estas células proyectan al colículo superior, al pretecto, y al núcleo óptico accesorio, con lo que se ha sugerido que están relacionadas con la actividad visuomotora. Fisiológicamente son difíciles de estimular, por su respuesta tardía y sin una clara organización centro/periferia (Cudeiro, 2005).

**Las células interplexiformes:** Por último, mencionar un sexto tipo de célula retiniana, la célula interplexiforme (Gallego, 1971). Éstas son parecidas a las células

amacrinas, por la localización de su soma y sus dendritas. Las células interplexiformes emiten a su vez un axón que se dirige a la capa plexiforme externa, estableciendo conexiones con las células horizontales. Aunque no está muy claro su papel funcional, parece que ejercen una función neuromoduladora de la actividad sináptica de la retina (Dowling, 1987). En algunos vertebrados se ha descrito que las células interplexiformes pudieran ser dopaminérgicas (Witkovsky, 2004).

Hasta aquí hemos intentado describir los tipos celulares y la organización estructural de la retina, centrándonos en aquellos elementos que serán más útiles para desarrollar los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral. Pasamos a continuación a describir la vía no visual.

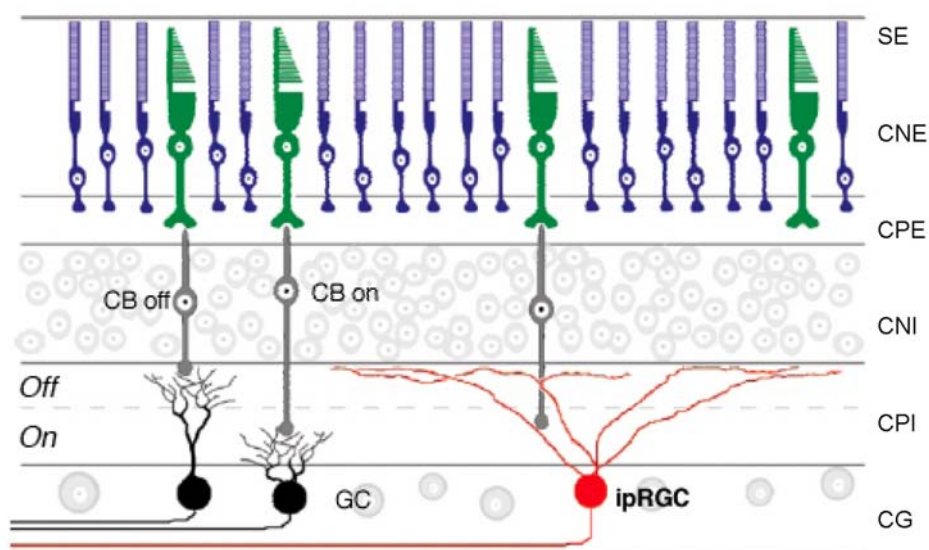


## LA VÍA NO-VISUAL

Desde que Von Kris propuso su teoría dual de la visión a finales del siglo XIX, ha sido ampliamente aceptado que sólo existían dos tipos de fotorreceptores retinianos, el de los bastones y el de los conos (los **fotorreceptores clásicos** ya descritos). Aun siendo esta teoría generalmente aceptada, a lo largo de los años han ido publicándose estudios que proponían la posibilidad de la existencia de otras células fotosensibles en la retina. Keeler observó en 1928 una reacción de la pupila en ratones totalmente ciegos. Sugirió varias explicaciones, como la existencia de células pigmentarias, o la estimulación directa de las células ganglionares (Keeler, 1928). Años más tarde, Kashani propuso la hipótesis "triple" de la visión, donde defendía una función no visual de la retina llevada a cabo por un grupo de células ganglionares fotosensibles (Kashani, 1993). Finalmente Berson se encargó de poner nombre a estas células y describirlas ampliamente (Berson, 2003), células que han sido denominadas "**células ganglionares intrínsecamente fotosensibles**" o **ipRGC** ("*intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells*"). Estas células constituyen un grupo reducido de células ganglionares (1-3%), capaces de captar directamente la energía lumínica procedente del entorno (Berson *et al.*, 2002; Sekaran *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2003), y cuya función es regular las funciones no visuales de la retina. Para desempeñar su función, las ipRGC contienen un pigmento sensible a la luz, la **melanopsina** (Provencio *et al.*, 1998a, 2002; Gooley *et al.*, 2001; Hannibal y Fahrenkrug., 2002; Hannibal *et al.*, 2002; Hattar *et al.*, 2002, 2003; Lucas *et al.*, 2003). Esta opsina, al igual que las opsinas de los bastones y los conos, tiene un cromóforo, el retinal, que cambia de conformación 11-*cis* a *todo-trans* con el contacto con la luz y

provoca una actividad eléctrica de la célula ganglionar (Berson *et al.*, 2002; Dacey *et al.*, 2005). La melanopsina es menos sensible a la luz que los fotorreceptores de los los fotorreceptores clásicos y su respuesta es 100 veces más lenta (Fu, 2005).

Las ipRGC tienen un campo receptivo extremadamente amplio, de aproximadamente 200-300  $\mu\text{m}$  (Hattar *et al.*, 2002) y sus escasas dendritas se estratifican en su mayor parte en la lámina más exterior de la capa plexiforme interna, incluso adentrándose a veces a la capa nuclear interna (Hattar *et al.*, 2002). La figura 7 muestra de forma esquemática la disposición de las ipRGC.



**Figura 7: Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC).**

Esquema de la localización de la ipRGC en la retina de mamíferos. Se muestra la disposición del soma y dendritas de las ipRGC en relación a las células bipolares y ganglionares de la vía visual. Se muestran en diferentes colores las tres células fotosensibles de la retina: bastones (azul), conos (verde) y células ganglionares fotosensibles (rojo). Modificado de Berson (2003). Abreviaturas: SE (capa del segmento externo), CPE (capa plexiforme externa), CNI (capa nuclear interna), CPI (capa plexiforme interna), CG (capa de células ganglionares).

Se han descrito distintas subclases de células melanopsínicas, según el nivel de estratificación de sus dendritas (Provencio *et al.*, 2002; Viney *et al.*, 2007). En este sentido se proponen tres tipos de células ipRGC: las que disponen sus prolongaciones dendríticas justo por debajo de la CNI (tipo I), zona asociada con la vía *off* de la retina; las que disponen sus prolongaciones dendríticas en la porción más inferior de la CPI (tipo II), zona asociada con la vía *on* de la retina; y las que disponen sus prolongaciones dendríticas a ambos niveles (tipo III).

Las ipRGC también se han clasificado de acuerdo a la respuesta electrofisiológica a la estimulación lumínica (Sekaran *et al.*, 2003, 2005). En este aspecto, las células ipRGC se dividen en tres subtipos dependiendo si su respuesta a la luz es transitoria, sostenida o repetitiva (Tu *et al.*, 2005). De forma añadida, la activación eléctrica de las ipRGC en ratones sin fotorreceptores clásicos induce a su vez la respuesta eléctrica de algunas células ganglionares no melanopsínicas, sugiriendo la comunicación de las ipRGC con otras células ganglionares vía uniones eléctricas o *gap junctions* (Sekaran *et al.*, 2003, 2005). Actualmente se sigue investigando la tipología de éstas células ya que parecen haber más clasificaciones posibles aun no descritas. En relación a su sensibilidad cromática, las ipRGC presentan una mayor sensibilidad a estímulos de 484 nm (Provencio y Foster, 1995).

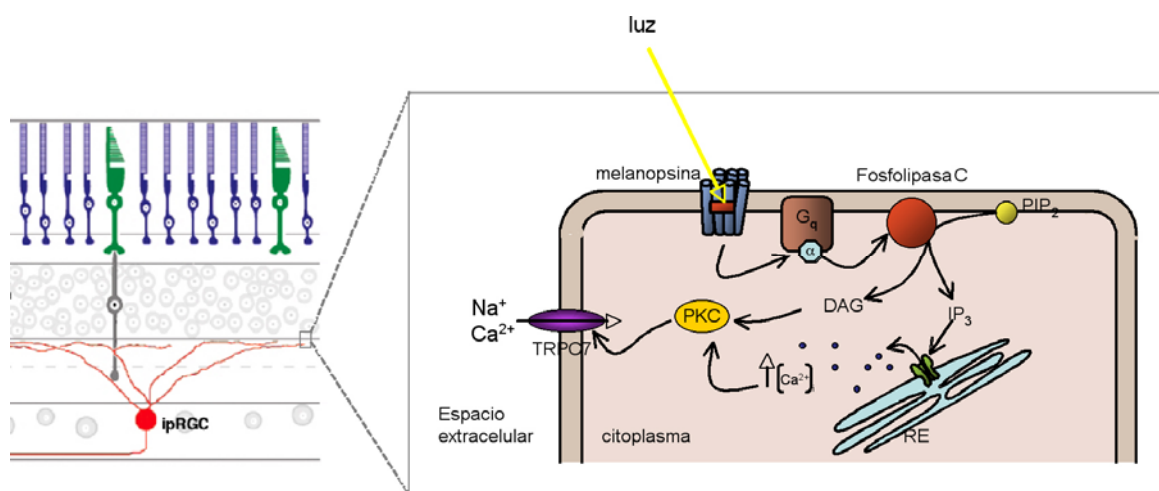
Desde un punto de vista funcional, es importante entender que las ipRGC reciben un *input* doble; por una parte reciben un estímulo directo de la luz ambiental (respuesta intrínseca), y por otra parte reciben un *input* sináptico desde los fotorreceptores clásicos,

a través de las sinapsis que establecen con las interneuronas retinianas (células bipolares y amacrinas) (Belenky *et al.*, 2003; Dacey *et al.*, 2005; Pérez-León *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007). Las ipRGC son células de proyección puesto que sus axones proyectan a diversos centros visuales. Se ha descrito que proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático (SCN), aunque también se han visto significativas proyecciones a la lámina intergeniculada (IGL) (Moore *et al.*, 1995) y al núcleo pretectal de la oliva (OPN) (Provencio *et al.*, 1998a). Las sinapsis que establecen las ipRGC en sus núcleos de proyección parece que son glutamatérgicas, si bien se ha descrito que estas terminales presinápticas también son capaces de liberar *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) en sus centros diana en el cerebro (Hannibal y Fahrenkrug, 2004b).

Hasta la fecha, se propone que las funciones no visuales de las ipRGC son la ***sincronización del ritmo circadiano*** con los ciclos luz/oscuridad (Provencio *et al.*, 2000; Gooley *et al.*, 2001, 2003; Hannibal y Fahrenkrug, 2002; Hannibal *et al.*, 2002; Hattar *et al.*, 2002, 2003; Panda *et al.*, 2002, 2003; Ruby *et al.*, 2002; Rollag *et al.*, 2003; Semo *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2003), la ***regulación del diámetro de la pupila*** dependiente de la luz (Lucas *et al.*, 2001, 2003; Gooley *et al.*, 2003; Hattar *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003), la ***supresión de melatonina*** debida a estimulación lumínica (Freedman *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001, 2003), la ***supresión de la actividad motora (masking)*** (Mrosovsky y Hattar, 2003), y la ***regulación de las fases de sueño/vigilia*** (Panda *et al.*, 2003).

Otro aspecto interesante de las ipRGC es que son funcionales desde el nacimiento (Hannibal y Fahrenkrug, 2004a; Sekaran *et al.*, 2005). De hecho, las ipRGC de la retina de los mamíferos ya expresan melanopsina de forma prenatal; aproximadamente del 10% del total de las células ganglionares presentes en la retina prenatal son capaces de expresar melanopsina (Fahrenkrug *et al.*, 2004), habiéndose propuesto que estas células son capaces de ejercer todas sus funciones no visuales de forma previa a la diferenciación de los fotorreceptores clásicos (conos y bastones).

Quizá el aspecto más llamativo desde un punto de vista de biología del desarrollo es que estas células parecen tener un origen rhabdomérico (Isoldi *et al.*, 2005). Tanto la estructura de la opsina como las señales de transducción de estas neuronas son característicos de las células rhabdoméricas de los animales invertebrados (**figura 8**).



**Figura 8: Posible mecanismo molecular de la fototransducción en las ipRGC.**

Esquema del posible proceso de fototransducción en la membrana celular de una ipRGC. La luz induce un cambio de conformación del retinal de la melanopsina, de 11-*cis* a todo-*trans*. Esto libera la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_q$  que activa la fosfolipasa C de la superficie interna de la membrana celular. La fosfolipasa C rompe el fosfatidilinositol bifosfato ( $PIP_2$ ) en inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  se une a los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) del retículo endoplasmático (RE) induciendo la liberación de calcio desde sus depósitos intracitoplasmáticos. Tanto el DAG como el calcio intracelular activan la protein-quinasa C (PKC), la cual abre los canales TRPC7 que permiten la entrada de cationes que despolarizan la célula.

La activación de las ipRGC por la luz, aunque actualmente no está completamente descrita, se presenta muy parecida a la fototransducción que tiene lugar en los fotorreceptores de la *Drosophila* (Zuker, 1996): el retinal, que es biestable, pasa de su forma *cis* a su forma *todo-trans* por el efecto de la luz. El cambio de conformación del cromóforo activa la opsina que a su vez inicia un sistema de segundos mensajeros relacionados con el inositol fosfato que acaba por abrir los canales TRP (*transient receptor potential*), correspondientes a los TRPC7 en el caso de las ipRGC (Foster y Hankins, 2007).

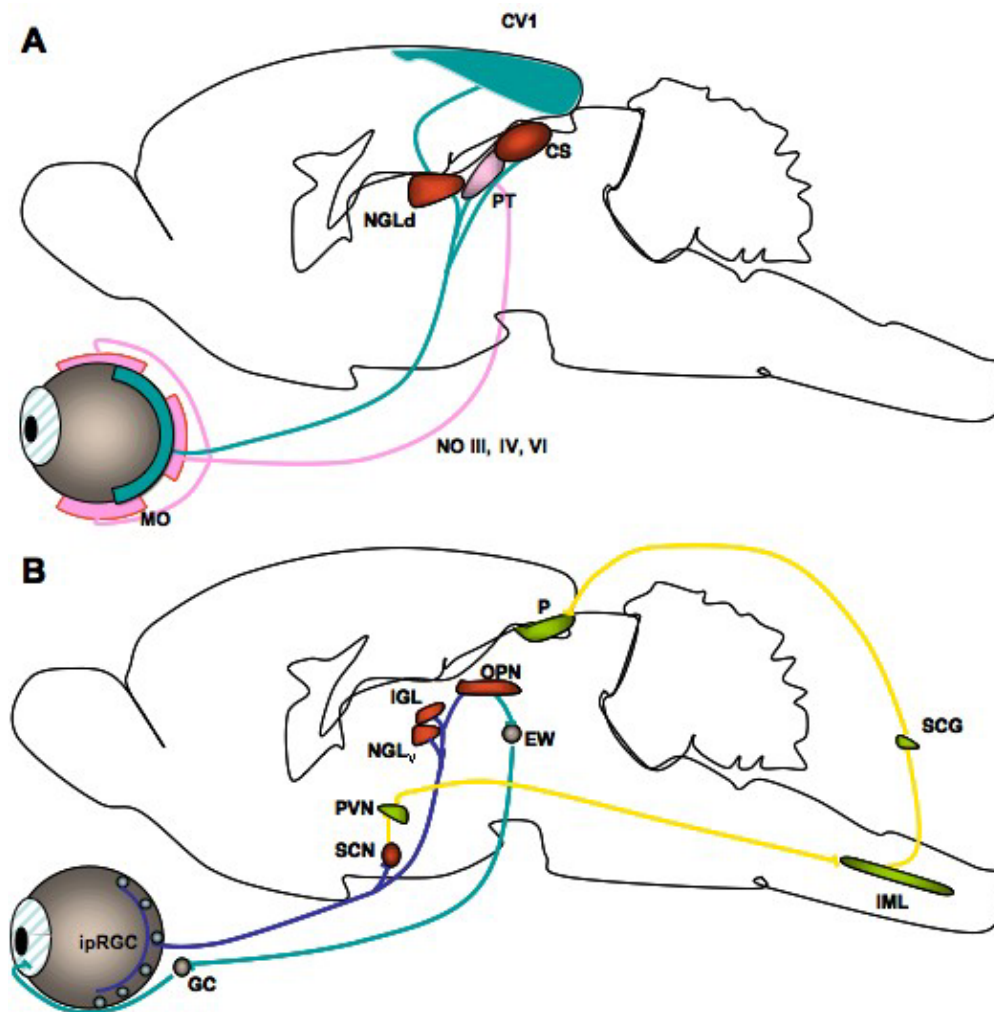
La descripción del sistema fotosensible integrado por las ipRGC ha permitido confirmar que lo que parecían dos ramas evolutivas totalmente distintas y diferenciadas en la escala filogenética, resultan ser mecanismos colaboradores en un mismo sistema visual, haciendo que en la retina de los vertebrados coexistan un sistema de fotodetección visual, involucrado en funciones perceptivas, y otro sistema de fotodetección no visual, involucrado en funciones homeostáticas.

## VÍAS AFERENTES DEL NERVIO ÓPTICO

Los dos nervios ópticos, constituidos por los axones de las células ganglionares, se agrupan en una estructura llamada el quiasma óptico, cruce donde se produce la decusación de una gran proporción de los axones de las células ganglionares. Dichos axones pasan a formar parte del tracto óptico que proyecta a diversas estructuras nerviosas. En humano, el 80% de los axones de las células ganglionares terminan en el núcleo geniculado lateral (NGL). Esta estructura está situada en el tálamo dorsal y la configuran 6 capas distintas. La información parte segregada desde la retina para acabar en una de estas capas, según si llevan información sobre el movimiento, el detalle, o el color de la imagen. Desde el NGL las señales son transmitidas hacia la corteza visual. Otro 10% de los axones de las células ganglionares pasan a formar parte de la proyección retinorrectal, la cual acaba en el colículo superior (CS). Su función es la de permitir una correcta orientación de los ojos en respuesta a estímulos luminosos periféricos. El último 10% de axones de las células ganglionares conectan con el cerebro medio y el hipotálamo. En el hipotálamo se encuentra el **núcleo supraquiasmático** (SCN), el cual es el encargado de la sincronización de los ritmos biológicos con los ciclos luz y oscuridad.

Si bien las proyecciones de las células ganglionares en el encéfalo son diversas, conviene diferenciar claramente la proyección de las ipRCG de las proyecciones del resto de células ganglionares, puesto que unas se encargan de las funciones no visuales de la retina y las otras de las funciones visuales. En el ratón, el 97% de las células

ganglionares proyectan al colículo superior, mientras que la mayoría de las ipRGC proyectan al SCN. La **figura 9** muestra las proyecciones centrales de las células ganglionares de la retina de ratón.



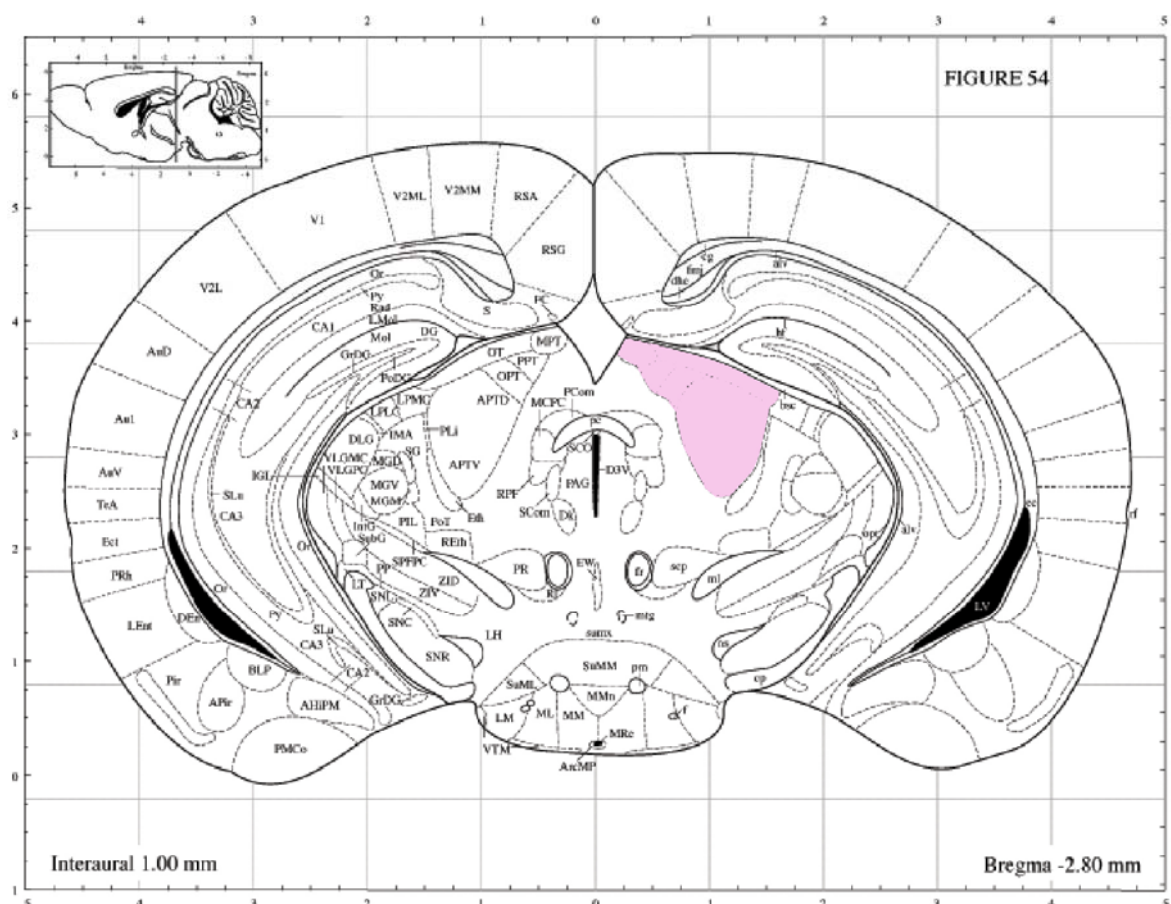
**Figura 9: Proyecciones centrales de las células ganglionares de la retina en el ratón.**

A. Esquema de las proyecciones de las células ganglionares de la vía visual de la retina sobre estructuras sub-corticales en el ratón: área pretectal (PT), colículo superior (CS) y núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd). Se muestran las vías eferentes responsables de los movimientos oculares (nervios oculomotores, NO, III, IV y VI). B. Esquema de las proyecciones de las células ganglionares de la vía no visual (ipRGC) de la retina sobre estructuras sub-corticales en el ratón: núcleo supraquiasmático (SCN), núcleo periventricular (PVN), núcleo geniculado lateral ventral (NGLv), lámina intrageniculada (IGL), núcleo de la oliva pretectal (OPN), corteza visual primaria (CV1). Se muestran las vías eferentes vegetativas responsables del reflejo fotomotor (núcleo de Edinger Westfall, EW; ganglio ciliar, GC) y de la estimulación de la secreción de melatonina (núcleo intermediolateral, IML; ganglio cervical superior, SCG; glándula pineal, P). Modificado de Berson (2003).



## *Las proyecciones visuales*

En el ratón, las células ganglionares tienen tres destinos principales: el colículo superior (CS), el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd), y en menor escala, el pretecto. El CS se encuentra en la región dorsal del mesencéfalo, y recibe el 97% de las fibras oculares (Sauve, retina.umh.es/webvision). Los axones de las células ganglionares proyectan a la capa más exterior del CS y forman un mapa retinotópico del campo visual del animal, lo que implica una localización espacial de los estímulos visuales. Asimismo, el CS recibe información auditiva y somatosensorial en sus capas más profundas. Esos tres *inputs* sensoriales participan en la orientación de los ojos, la cabeza o el cuerpo del animal (Drager y Hubel, 1975). El NGLd es un centro de relevo para las proyecciones dirigidas a la corteza visual. En humano, un 80% de las células ganglionares proyectan al NGLd, las cuales se dirigen mediante las radiaciones ópticas a la corteza visual, donde tiene lugar la percepción visual (Kandel *et al.*, 2001). Por su parte, el pretecto es un complejo de cinco núcleos situado en el cerebro medio, localizado centralmente al CS (Oyster, 1999). El pretecto está conformado por el núcleo del tracto óptico (NOT), el núcleo pretectal de la oliva (OPN), y los núcleos pretectales anterior, medial, y posterior (**figura 10**). Los dos primeros núcleos, el NOT y el OPN, son los que más aferencias reciben de las células ganglionares. En este sentido, el NOT ha sido el más estudiado y su función parece estar relacionada con el control de los movimientos oculares, específicamente con el reflejo optoquinético (Kandel *et al.*, 2001).



**Figura 10: Área preteccal en cerebro de ratón.**

Localización de los núcleos preteccales de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del cerebro de ratón. Se muestran resaltados en color rosado los núcleos preteccales: **OT**: núcleo del tracto óptico, **OPT**; núcleo preteccal de la oliva, **PPT**: núcleo preteccal posterior, **MPT**: núcleo preteccal medial, **APTV**: núcleo preteccal anterior ventral, **APTD**: núcleo preteccal anterior dorsal. La imagen de la esquina superior izquierda muestra la sección coronal correspondiente al mapa cerebral. Modificado de Paxinos y Franklin (2001).

### ***Reflejo optoquinético y otros movimientos oculares***

El reflejo optoquinético es uno de los seis sistemas de control motor ocular, que tiene la función de mantener la fovea sobre la imagen visual. Además, se describen otros cinco sistemas de control óculo-motor, que son los movimientos de sacudida, los movimientos suaves de persecución, los movimientos de convergencia, la fijación y el reflejo vestibulo-ocular (Kandel *et al.* 2001). De estos cinco, los cuatro primeros mantienen la fovea sobre un objetivo visual, y son de carácter voluntario. Sin embargo, tanto los movimientos oculares relacionados con el reflejo optoquinético como con el reflejo vestibulo-ocular son de carácter involuntario; son responsables de mantener la imagen en la retina durante movimientos de la cabeza.

El reflejo vestibulo-ocular es generado por receptores situados en el oído interno que son capaces de detectar la aceleración y el cambio de posición de la cabeza respecto a la gravedad y generar movimientos oculares compensatorios (Kandel *et al.*, 2001). Gracias a este reflejo es posible moverse y a la vez mantener una imagen fijada en la retina. El reflejo vestibulo-ocular es probablemente la forma más primitiva de control de la posición ocular.

El reflejo optoquinético es el movimiento compensatorio visual más estudiado, siendo común en todos los vertebrados con ojos móviles. Este reflejo permite mantener la imagen fija en la retina cuando hay un movimiento del estímulo visual, o bien cuando hay un movimiento translacional de la cabeza. El movimiento ocular del reflejo

optoquinético consiste en dos fases, una lenta que sigue al estímulo visual, y una rápida, llamada también sacudida, que compensa la primera fase. Así, alternativamente, van teniendo lugar fases lentas y rápidas en direcciones opuestas, constituyendo el nistagmus optoquinético. En situaciones naturales, el reflejo optoquinético suele activarse al mismo tiempo que el reflejo vestíbulo-ocular, ya que rara vez se da el movimiento corporal sin variación de la posición de la cabeza.

Las aferencias de la retina relacionadas con el reflejo optoquinético llegan al núcleo del tracto óptico y de ahí la información sería transmitida al núcleo del nervio oculomotor III (figura 9A). Este núcleo transmite la señal a los músculos extraoculares que son los que se encargan de mover el ojo para que se pueda seguir el estímulo visual.

### *Las proyecciones no visuales*

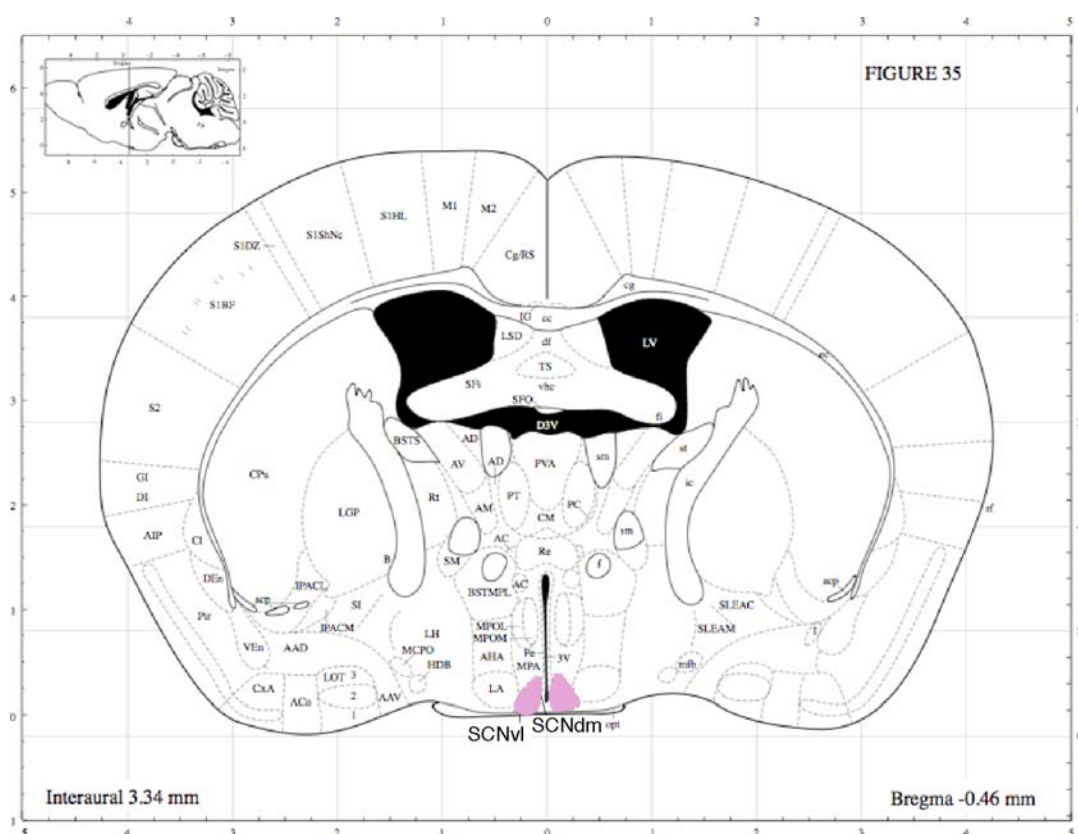
Todas las funciones no visuales de la retina corresponden a las diferentes proyecciones de los axones de las ipRCG. Dichas proyecciones se dirigen principalmente al núcleo supraquiasmático (SCN) a través de la vía monosináptica del tracto retinohipotalámico (RHT, Moore y Lenn, 1972; Moore *et al.*, 1995; Pickard *et al.*, 2002). El SCN en mamíferos es responsable de la regulación de los ritmo circadianos (véase más adelante "Ritmo circadiano").

En menor escala, las ipRGC proyectan directamente al núcleo pretectal de la oliva (OPN)(Hattar *et al.*, 2002). Esta proyección determina el reflejo fotomotor de la pupila y funciona mediante una conexión parasimpática entre el núcleo de Edinger-Westphal

(EW), el ganglio ciliar (GC) y las fibras de músculo liso del iris (I)(véase figura 9B). Otra proyección de las ipRGC es la del núcleo geniculado lateral (NGL), concretamente en la lámina intergeniculada (IGL) y en menor escala en el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv) (Hattar *et al.*, 2002). La IGL se ha relacionado también con la sincronización del ritmo circadiano (Berson, 2003), mientras que las proyecciones al NGLv son tan débiles que las ipRGC parecen tener poca influencia directa a la corteza visual. En menor medida, también ha sido descrito un *input* desde células melanosínicas al colículo superior (Morin *et al.*, 2003), aunque con débil representación y con función dudosa.

### ***El ritmo circadiano***

Como ya se ha mencionado, el principal responsable de los ritmos circadianos en los mamíferos es el núcleo supraquiasmático (SCN). El SCN está constituido por un grupo reducido de neuronas situado en el hipotálamo frontal (**figura 11**). Dicho núcleo es el regulador de los ritmos circadianos y endocrinos en los mamíferos, incluyendo locomoción, termorregulación y funciones cardiovasculares (Cassone *et al.*, 1993). La importancia del SCN en los ritmos circadianos fue descrita por vez primera por RITCHER a mediados del siglo pasado, al darse cuenta que lesionando la parte frontal del hipotálamo de la rata se perdía la habilidad de regular el ritmo circadiano. Más tarde, gracias a una serie de estudios realizados a lo largo de los años 70, la zona responsable de los ritmos circadianos se limitó a un par de núcleos situados justo encima del quiasma óptico, cada uno compuesto de unas 10.000 neuronas.



**Figura 11: Núcleo supraquiasmático en cerebro de ratón.**

Localización del núcleo supraquiasmático de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del cerebro de ratón. Se muestran resaltados en color rosado los núcleos supraquiasmáticos ventrolateral (SCNvl) y dorsomedial (SCNdm). Modificado de Paxinos y Franklin (2001).

Las células del SCN son capaces de oscilar de forma endógena gracias a sus genes-reloj, los cuales se expresan según un lazo de retroalimentación negativa y positiva (García, 2005). Así, el exceso de una proteína reloj inhibe su propia transcripción, y *viceversa*. Todas las neuronas del SCN están acopladas entre sí, por lo que pueden seguir una misma oscilación sincrónica. A pesar de poderse regular de forma totalmente autónoma, el SCN se sincroniza al ritmo de la luz exterior gracias al *input* de que recibe de las

ipRGC a través del tracto retinohipotalámico. Esa sincronización permite una adaptación al entorno y un aprovechamiento de los factores ambientales.

El SCN se comunica con otros centros en el encéfalo con el fin de regular todos los ritmos biológicos corporales (García, 2005). Por una parte, regula los ritmos de comportamiento sueño/vigilia mediante su comunicación con núcleos del tronco encefálico (núcleos del rafe, *locus coeruleus*), y aunque es una vía pobremente descrita, se conoce que es muy sensible a los cambios lumínicos. Por otro lado, existen relojes periféricos en el organismo (hígado, corazón, pulmones...) que son regulados por ritmos endocrinos dirigidos por el SCN mediante su comunicación con glándulas secretoras. Así, el SCN, mediante vías vegetativas, regula a glándulas cuyas hormonas regularan los ritmos de otros tejidos.

La función mejor descrita del SCN sobre la regulación endocrina es la regulación de la glándula pineal (Bear *et al.*, 1996). La glándula pineal está situada en la línea media de la porción posterior de techo del tercer ventrículo y es responsable de la secreción de melatonina durante las horas de oscuridad. El SCN regula la glándula pineal mediante una vía de inervación simpática que incluye el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, el núcleo intermediolateral (IML) de la médula espinal y el ganglio cervical superior (SCG) (véase figura 9B). Esta vía también es responsable de las funciones de inhibición de segregación de melatonina y del efecto supresor motor (“*masking*”) atribuidas a las células melanopsínicas.

En la presente Tesis, es necesario acentuar que los ritmos corporales endógenos existen igualmente sin el *input* lumínico de las ipRGC, ya que como se ha dicho, el SCN puede regular el ritmo independientemente de la luz. Es el llamado ritmo endógeno, o ritmo en curso libre, cuya duración varía según especie (en humano equivale a 25 horas, mientras que en ratón es menor de 24). Por otro lado, también cabe resaltar que existen numerosos parámetros fisiológicos que dependen de una periodicidad, y que sus acrofases o valores máximos ocurren en diferentes puntos a lo largo del ciclo diario, dependiendo de las características del animal (García, 2005). De esta manera, un animal nocturno como el ratón, tiene un desfase de 180° en sus actividades diarias comparado con un animal diurno, es decir, por ejemplo su actividad motora tendrá lugar en la noche, mientras que la actividad motora de un animal diurno tendrá lugar durante el día.



## DEGENERACIONES RETINIANAS

Las degeneraciones retinianas constituyen un grupo de enfermedades de la retina que son consecuencia de una progresiva desaparición o muerte de estructuras oculares que han alcanzado un desarrollo completo y que, por consiguiente, no son deformaciones congénitas (Giménez-Almenara, 1997). Las degeneraciones de la retina se pueden clasificar por su forma de herencia, por la localización de la lesión y por el tipo de célula afectada. De acuerdo con su incidencia, los procesos degenerativos retinianos más frecuente son la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), la degeneración de etiología vascular (Diabetes), la degeneración de las células ganglionares ligadas al Glaucoma, y las Distrofias Hereditarias de la Retina (más conocidas por Enfermedades Heredodegenerativas de la Retina). El trabajo de la presente Tesis Doctoral está relacionado con este último tipo de degeneración retiniana.

### *Degeneraciones hereditarias de la retina*

Se incluyen en este grupo un conjunto de enfermedades retinianas transmitidas hereditariamente que se caracterizan por una atrofia retiniana con predominio del complejo fotorreceptor-epitelio pigmentario. Se entiende como atrofia cuando el tejido plenamente desarrollado, anatómicamente y fisiológicamente, sufre un proceso de desintegración prematura y se alteran sus funciones fisiológicas sin que exista causa aparente que lo justifique (Giménez-Almenara, 1997). Los distintos procesos degenerativos de naturaleza hereditaria de la retina se diferencian unos de otros en

aspectos como el modo de herencia, el ratio de progresión, la apariencia del fondo de ojo explorada por oftalmoscopia y el tipo de minusvalía visual que causa en los pacientes (Andréasson , 2006).

Las distrofias retinianas se pueden clasificar en dos grandes tipos, según que afecten predominantemente a la retina central o a la periférica. Dentro del primer grupo destaca por su frecuencia la distrofia de conos y conos-bastones, mientras que en el segundo grupo se incluye la retinosis pigmentaria.

### ***Distrofia de conos***

La distrofia de conos y conos-bastones es un grupo muy heterogéneo de desórdenes, tanto en términos clínicos como genéticos. Se caracterizan por la pérdida progresiva de la visión, anormalidades en la visión de los colores, disminución del campo visual, y un grado variable de nistagmo y fotofobia (molestia ante luz brillante). Objetivamente se caracteriza por una ausencia de la función de conos en las pruebas electroretinográficas y *test* psicofísicos. Los pacientes con desorden cono-bastón desarrollan además anormalidades en el sistema de bastones que lleva a la ceguera nocturna en el proceso de la enfermedad (Cotlier y Weinreb, 2006).

## ***Retinosis Pigmentaria***

Debido a diversas deficiencias genéticas específicas de los genes expresados en los bastones se produce una serie de enfermedades degenerativas de la retina que clínicamente se agrupan bajo el nombre de *retinosis pigmentaria* (Milam *et al.*, 1999; Phelan y Bok, 2000; Weleber y Gregory-Evans, 2001). Por ejemplo, diversas mutaciones de la rodopsina (*Rho*) provocan la degeneración y muerte de los bastones y consecuentemente a una pérdida de la visión escotópica (Berson *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 1992; Sung *et al.*, 1994). La retinosis pigmentaria (RP) es progresiva y de carácter hereditario, y es la cuarta causa de ceguera en el mundo occidental después de la retinopatía diabética, el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad, afectando a un 1/5000 habitantes (Gutiérrez, 1995). Se puede estimar que existen en España 25.000 personas afectadas ([www.retinosispigmentaria.org](http://www.retinosispigmentaria.org)).

Aunque la etiología de la RP a nivel molecular no es completamente conocida, existen numerosas teorías que indagan sobre la causa última que puedan desencadenar la enfermedad (Gutiérrez, 1995). La teoría vascular se basa en que una esclerosis en la coroides o en los vasos retinianos podrían ser la primera causa de la enfermedad. Una segunda teoría involucra la afectación previa del epitelio pigmentario y sostiene que la estructura retiniana se desorganiza por la presencia de pigmento o la migración a través de ella de células errantes cargadas de pigmento. Otra teoría se centra en la afectación inicial del neuroepitelio, por afectación original de conos y bastones, en la que diferentes causas pueden provocar la muerte de estas células. Otras posibles causas de la afectación de fotorreceptores son la senilidad, la luz, influencias endocrinas, patología

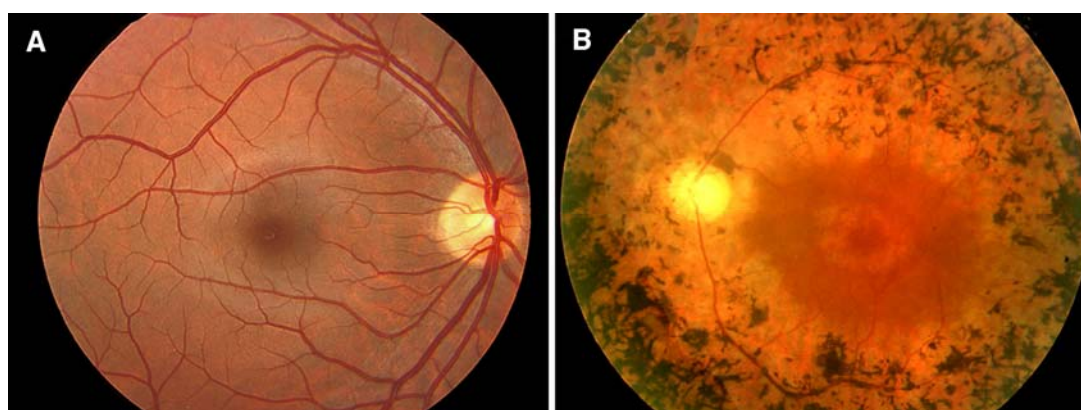
metabólica o deficiencias vitamínicas. Por último, la teoría inmunológica propone una reacción autoinmune, al descubrirse que el material procedente de los segmentos externos de los bastones resulta ser altamente antigénico (Gutiérrez, 1995).

La mutación original en la RP puede ser de carácter autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al sexo, e incluso esporádico. Este último caso es el más frecuente en humanos, por lo que resulta difícil determinar las causas de la aparición de estas mutaciones (Gutiérrez, 1995). Clínicamente, los síntomas más característicos de la retinosis pigmentaria son ceguera nocturna, campo de visión limitado y deslumbramiento. Los pacientes tienen dificultades para ver de noche, cuando está oscureciendo y en lugares de poca iluminación. Asimismo, los pacientes experimentan una reducción del campo visual, tropiezan con objetos y presentan progresivamente disminución de la visión. La pérdida de visión periférica les obliga a girar la cabeza, para poder ver los objetos que tienen alrededor. La enfermedad suele iniciarse en la infancia (3-8 años) y la dificultad de adaptación a la oscuridad puede ser el único síntoma durante años. A los 6-12 años de edad, la sintomatología se hace más evidente, y a los 20 años de edad puede llegar a ser incapacitante, llegando a los 50 años de edad con una ceguera próxima al 90% (Gutiérrez, 1995). Para el diagnóstico de la retinosis pigmentaria resultan de utilidad diversas pruebas, incluyendo el examen oftalmológico completo (**figura 12**), electroretinografía y estudios genéticos.

Como estrategias terapéuticas se han utilizado distintas aproximaciones, aunque hasta la fecha no se conoce un tratamiento suficientemente eficaz y ninguno de ellos es

plenamente curativo. Entre las medidas generales se recomienda proteger los ojos de la luz solar. Se han ensayado tratamientos con nutrientes antioxidantes: vitaminas A, C, E y B<sub>6</sub> y minerales como el zinc y el selenio. La fotocoagulación de la retina con láser tiene un efecto positivo ya que aumenta la supervivencia de los fotorreceptores mutados en las retinas de pacientes con retinosis pigmentaria. Actualmente se está desarrollando una prótesis epirretiniana independiente y funcional que podría restaurar la visión; el mecanismo de funcionamiento de esta prótesis consistiría en estimular eléctricamente las capas más internas de la retina, evitando los fotorreceptores dañados y logrando una mejora significativa de la visión.

El uso de sustancias neuroprotectoras o antiapoptóticas sobre células en proceso de degeneración está resultando un campo de estudio eficaz en el tratamiento de la enfermedad (véase más adelante). Finalmente, se han intentado aproximaciones de terapia génica, sin que todavía se haya ensayado en humanos.



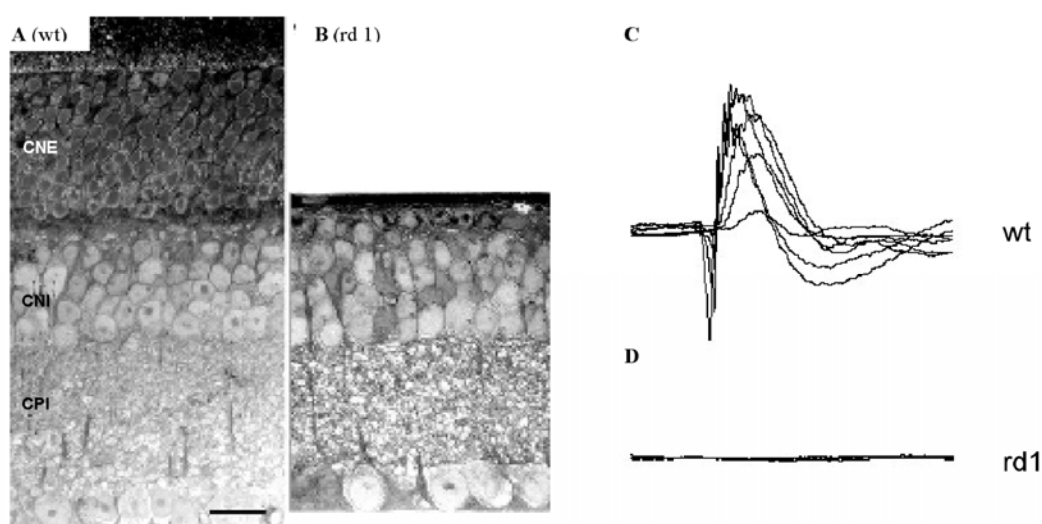
**Figura 12 : Imágenes del fondo de ojo de pacientes con retinosis pigmentaria.**

**A.** Fondo de ojo en un sujeto sano. **B.** Fondo de ojo de un paciente con Retinosis Pigmentaria avanzada: Obsérvese las manchas negras características de la retinosis pigmentaria. Tomado de [retina.umh.es/webvision/clinicalERG.html](http://retina.umh.es/webvision/clinicalERG.html)

### ***Modelos experimentales de retinosis pigmentaria***

Las mutaciones de fotorreceptores en mamíferos, ya sean naturales o diseñadas, han resultado ser una herramienta de valor incalculable para el estudio de enfermedades degenerativas de la retina (Baehr y Frederick, 2000; Menon *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002). La similitud entre especies se traduce en numerosas enfermedades homólogas que pueden ser investigadas en animales y dar soluciones para los humanos. En este aspecto, el ratón es un buen ejemplo, ya que comparte el 99% del ADN con el ser humano (Gunter y Dhand, 2002). De hecho, existe una mutación en ratón que da lugar a una enfermedad degenerativa de la retina que es exactamente homóloga a la RP humana (McLaughlin *et al.*, 1993, 1995). Se trata de la mutación ampliamente estudiada como mutación *rd* (*rod degeneration*) (Keeler, 1966; Pittler *et al.*, 1993). Esta mutación se ha encontrado en diversas líneas de ratón de laboratorio y en algunas líneas de ratones de campo (Chang *et al.*, 2002). En concreto, los ratones homocigotos para la mutación *rd* tienen una degeneración de los bastones debida una mutación *nonsense* en el exón 7 del gen *Pde6b* que codifica para la subunidad  $\beta$  del complejo GMPC-PDE (ver fototransducción). Se ha descrito que la degeneración de los bastones en estos modelos animales va seguida de una degeneración de conos, aunque la razón de ésta es aun incomprendida (Provencio *et al.*, 1998b). El resto de la retina parece conservar el número de células, aunque sufre grandes remodelaciones internas (Marc *et al.*, 2003). La degeneración retiniana en los ratones *rd* es fácilmente evidenciable por técnicas estructurales o funcionales (**figura 13**).

Se han encontrado más de 10 modalidades de la mutación *rd* (Chang *et al.*, 2002), y varían en su curso temporal y en la agudeza de la degeneración. La mayoría de ellas ofrecen un escenario más que idóneo para la investigación de la retinosis pigmentaria. En los experimentos realizados en la presente Tesis, se han utilizado 4 tipos de ratones, un control, el **C57Bl/6J**; dos modelos de ratones con degeneración retiniana, el **rd1** y el **rd10**; y un ratón transgénico, el **hProIns** (véase más adelante) productor de proinsulina humana de forma constitutiva a nivel muscular.



**Figura 13: Degeneración retiniana en ratones rd.**

**A, B.** Imágenes a microscopía óptica de secciones transversales de la retina de un ratón control sano (wt) y un ratón con degeneración retiniana (rd1) de 90 días de edad (Tomadas de Marc *et al.*, 2003.) **C, D.** Registros electroretinográficos realizados en un ratón control sano (wt) y un ratón con degeneración retiniana (rd1) de 30 días de edad. En comparación con el registro control, donde se pueden apreciar las deflexiones negativas y positivas de un electroretinograma normal, el trazado inferior corresponde a un electroretinograma "plano" registrado en un animal rd1 con degeneración retiniana. Registros cedidos por la Dra. Rima Barhoum.

## NEUROPROTECCIÓN

La RP tal como otras enfermedades neurodegenerativas han animado a numerosos grupos investigadores a la búsqueda de factores neuroprotectores capaces de evitar o retrasar el proceso degenerativo. Ya desde los estudios de Detwiler en la década de los años 30, realizados en embriones de anfibios, es conocido que la supervivencia neuronal depende de "factores tróficos" o "factores de crecimiento" liberados por células diana de dichas células. En términos generales, un factor de crecimiento (conocidos genéricamente como citoquinas) se define como una proteína reguladora que controla la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de las células así como el efecto de ciertas señales. Actualmente, la familia de citoquinas mejor estudiada es la de las neurotrofinas, que en los mamíferos están representadas por: NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), NT 3 (*Neurotrophin 3*) y NT 4-5 (*Neurotrophin 4-5*). Molecularmente, las neurotrofinas se componen de dímeros con un nudo cisteína. Hoy se sabe que los factores tróficos actúan más allá de sus células diana, ya que también pueden ser sintetizados y secretados de forma paracrina, autocrina y endocrina (Moris y Vega, 2003; Isenmann *et al.*, 2003). En este sentido, la regulación de supervivencia, crecimiento y diferenciación de la célula depende tanto de la secreción de neurotrofinas como de la expresión de receptores de las mismas en las membranas celulares. De hecho, el control genético en la expresión de los receptores es el mecanismo que determina qué células podrán responder a una neurotrofina determinada y cuales no.



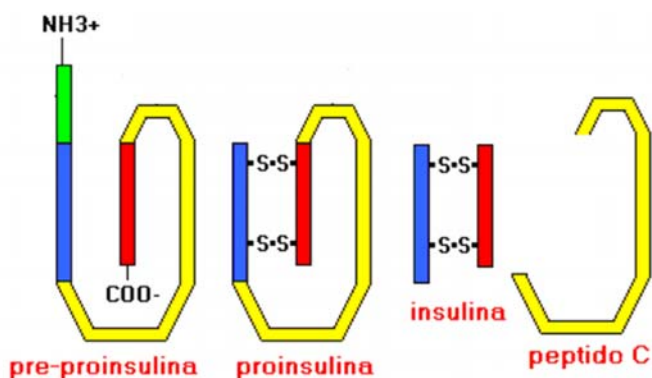
En relación con la retinosis pigmentaria, se han utilizado algunos factores neurotróficos con el fin de retardar la degeneración de los fotorreceptores (LaVail *et al.*, 1998). Se ha observado que el GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), incrementa la supervivencia de los fotorreceptores en un modelo de retinosis pigmentaria (Frasson *et al.*, 1999; McGee *et al.*, 2001). Con respecto al BDNF, se ha descrito que se expresa en numerosas regiones del cerebro y ejerce un papel importante en la maduración y diferenciación neuronal. En retina, se ha propuesto que el BDNF ejerce un papel como mediador de la plasticidad neuronal y modulador de la sinaptogénesis (Alsina *et al.*, 1998). Otro factor neurotrófico que ha resultado útil en ralentizar la degeneración de los fotorreceptores es el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (LaVail *et al.*, 1998). Este factor, liberado por células transformadas genéticamente e introducidas en pequeñas cápsulas, produce un retardo en la degeneración de los fotorreceptores retinianos (Tao *et al.*, 2002). Esta técnica orientada a la terapia de la retinosis pigmentaria, actualmente se encuentra en fases iniciales de investigación clínica.

Todos estos estudios demuestran que los factores tróficos BDNF, GDNF y CNTF presentan un efectivo potencial terapéutico y pueden ser utilizados a corto plazo para el tratamiento de la retinosis pigmentaria. Sin embargo, estos factores retrasan, pero no previenen, la degeneración retiniana. Es necesario por ello la búsqueda de alternativas experimentales, que conjuntamente con los procesos descritos, permitan restaurar la visión. En este sentido, nuestro trabajo se ha centrado en un factor trófico de la familia de la insulina, la **proinsulina**.

## Proinsulina

Recientemente, se ha propuesto que la **proinsulina**, precursor de la insulina (**figura 14**), podría ejercer un efecto neuroprotector sobre células de la retina (De Pablo y De la Rosa, 1995; Alarcón *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2000; Hernández-Sánchez *et al.*, 2002; Hernández-Sánchez *et al.*, 2006; Corrochano, 2006; Barhoum, 2006; Istillarte, 2007).

La insulina es una hormona polipeptídica que coordina la distribución y el metabolismo procedentes de los alimentos así como el flujo de sustratos endógenos durante el ayuno, actuando sobre el hígado, el tejido adiposo y la masa muscular (Levi *et al.*, 2006). Dentro de la familia de factores de la insulina se encuentran la propia insulina, su precursor la **proinsulina**, y sus factores de crecimiento IGF-I e IGF-II (*Insulin Growth Factor-I e Insulin Growth Factor-II*). Todos ellos están involucrados en el control de aspectos primordiales de la vida de los mamíferos, como el crecimiento, el metabolismo y la reproducción.



**Figura 14. Esquema de la estructura molecular de Proinsulina.**

La traducción del ARN de la Insulina da lugar a la preproinsulina, la cual se pliega y sufre sulfooxidación, con lo que se genera la proinsulina. La insulina se genera por excisión del peptido C.

Recientemente, a ésta familia se le han atribuido más funciones que las ya mencionadas. Estudios de transcripción demuestran que tanto la preproinsulina como los mRNAs de IGF-I y IGF-II son abundantes en las diferentes fases embrionarias del desarrollo. De hecho, los IGF se producen en múltiples tejidos y presentan una acción sobre el crecimiento prenatal, independiente de la hormona del crecimiento (De Pablo y De la Rosa, 1995; Hernández-Sánchez *et al.*, 2006).

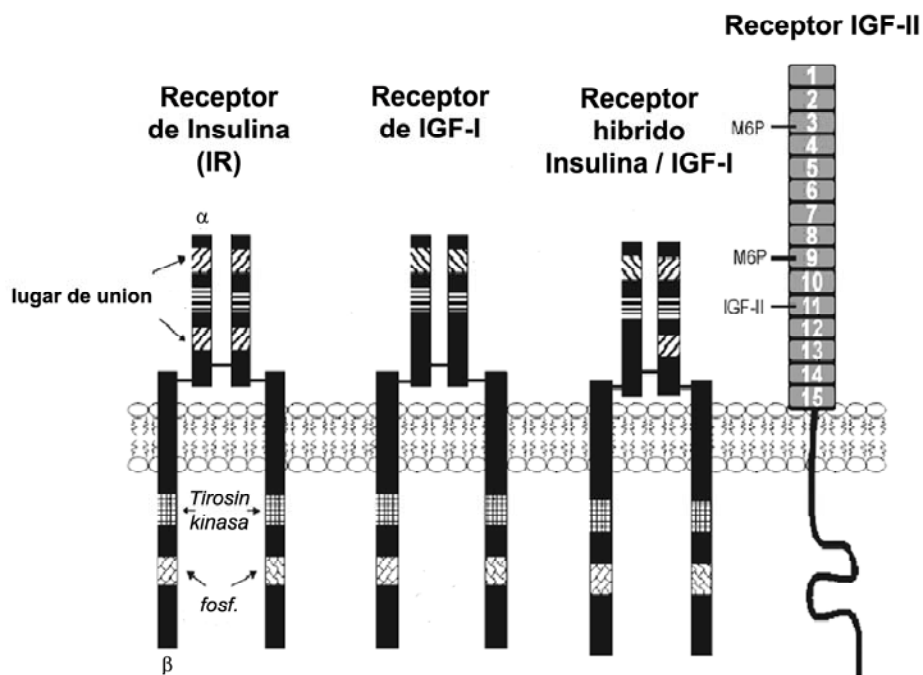
En la retina, diversas investigaciones han evidenciado que los diferentes tipos neuronales tienen requerimientos tróficos diversos. Es así como la insulina y sus factores relacionados han sido implicados en la estimulación de la proliferación de células neuroepiteliales, la diferenciación, maduración, supervivencia e incluso en la disminución de la apoptosis. Mediante estudios de hibridación “*in situ*” en embrión de pollo, se encontró una clara señal para el ARN mensajero de proinsulina en el neuroepitelio retiniano, especialmente a E4 y disminuyendo posteriormente hacia E8 (De la Rosa *et al.*, 1994; Pérez-Villamil *et al.*, 1994; Le Roit *et al.*, 1995; Frade *et al.*, 1996; D’Ercole *et al.*, 2002; Hernández-Sánchez *et al.*, 2006). Inversamente, la expresión del ARN mensajero de IGF-1 fue escasamente detectada en estadios tempranos, pero se incrementó a E8, cuando la señal para proinsulina se hizo débil. Esto sugiere que el control temprano de la neurogénesis pudiera depender de la insulina o su precursor, la proinsulina, mientras que en el proceso más tardío podría depender de IGF-1. Adicionalmente, este efecto se relacionó con la supervivencia celular o prevención de la muerte temprana, ya que al bloquear la proinsulina y el receptor de insulina “*in ovo*” con anticuerpos específicos se encontró que la proporción de células apoptóticas era significativamente más alta que la presente en los embriones no tratados.

En cultivos de neuroretina en desarrollo, se ha observado una secreción de proinsulina al medio. Además, se ha observado que la proinsulina permanece sin procesar en el embrión en neurulación y en la neuroretina de pollo, lo que pudiera representar una vía constitutiva secretoria prepancreática y extrapancreática. (De Pablo y de la Rosa, 1995; Hernández-Sánchez, 1995; Morales *et al.*, 1997; Díaz, 1999, 2000; Hernández-Sánchez *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2005). Postnatalmente, a la insulina y al IGF-1 también se les atribuyen propiedades tróficas naturales sobre las neuronas retinianas. La adición de IGF-I en cultivos de neuronas disociadas de retina de rata previene la muerte neuronal casi completamente, mientras que por el contrario, si dichos cultivos son privados de insulina se produce la muerte de estas células (Politi *et al.*, 2001).

Como ya se ha comentado, la existencia de los receptores de los factores neurotróficos es igualmente importante que la secreción de los mismos para su efecto. Los receptores de insulina y IGFs están distribuidos ampliamente por todo el sistema nervioso tanto en su desarrollo como en fases adultas (Havrankova *et al.*, 1978; Baskin *et al.*, 1994). Los receptores de los agentes de la familia de la insulina son receptores "tirosin kinasa", y están formados por 4 subunidades unidas a través de puentes disulfuro, dos subunidades  $\alpha$  que se encuentran totalmente fuera de la membrana celular y dos subunidades  $\beta$  que atraviesan la membrana y sobresalen en el interior del citoplasma. Dichos receptores existen como homodímeros, dos monómeros  $\alpha/\beta$  idénticos, o como heterodímeros, dos monómeros diferentes. Una vez que se unen al sustrato, estos receptores experimentan un cambio conformacional, por el cual la subunidad  $\beta$  se autofosforila con ATP en residuos específicos de tirosina, se activa la tirosin kinasa, y son capaces de fosforilar a

diferentes sustratos intracelulares. Todo esto conduce a la activación de las dos principales cascadas de señalización: la MAPK (mitogen activated protein kinase) y la PI3K. (Nakae *et al.*, 2001; Reiter y Gardner, 2003; Russo *et al.*, 2005).

Hay por lo menos tres receptores que interactúan con sustratos de la familia de la insulina (**figura 15**): el receptor de insulina (**IR**), el receptor de IGF-I (**IGFIR**) y el receptor de IGF-II (**IGFIIR**). El IR se une preferentemente a insulina, aunque también puede unirse con menor afinidad a la proinsulina y a los IGFs.



**Figura 15. Estructura de los receptores de los factores tróficos de la familia de la insulina.**

El receptor de insulina (IR) y el de IGF-I son miembros de la familia de receptores tirosin kinasas, cuya activación produce la fosforilación (fosf) de la molécula. El receptor híbrido, está compuesto por una hemimolécula del IR y otra de receptor de IGF-I. El receptor IGF-II, es una glicoproteína transmembrana (modificado de Hawkes y Kar, 2004).

El receptor de insulina, cuando se localiza en cerebro o en retina, mantiene un estado tónico de actividad (Reiter y Gardner, 2003). Por su parte, el IGFIR se une a su correspondiente IGF-I con alta afinidad, algo menos con IGF-II y aún menos con insulina. Se conoce que en tejidos donde se co-expresan IR e IGFR pueden observarse receptores híbridos, Insulina / IGF-I, heterodiméricos. Están formados por monómeros  $\alpha/\beta$  del receptor de insulina y otro monómero  $\alpha/\beta$  del receptor IGF-I. Estos receptores híbridos se encuentran en la neuroretina, en estadios tempranos del desarrollo, presentando una elevada afinidad para la insulina, la proinsulina y para el IGF-I. En la vida postnatal, se ha demostrado su existencia en la mayoría de tejidos de los mamíferos (Bailly *et al.*, 1997; García-de Lacoba *et al.*, 1999; Pandini *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2005; Hernández-Sánchez *et al.*, 2006), observación que se corresponde con las funciones de supervivencia y antiapoptóticas atribuidas a la proinsulina (Hernández-Sánchez *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1999; Valenciano *et al.*, 2006; Corrochano, 2006, Barhoum, 2006).

## COMPORTAMIENTO VISUAL

El ratón ha sido utilizado como animal de experimentación científica desde siglos pasados y hoy en día es el mamífero más ampliamente utilizado en los laboratorios de experimentación animal. Su reducido tamaño, su corto período de gestación, y su facilidad de reproducción dentro del ambiente del laboratorio lo convierten en el animal idóneo para la investigación. El ratón se utiliza en todo tipo de investigaciones, incluyendo cáncer, inmunología, toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, envejecimiento, y estudios cardiovasculares (Suckow *et al.*, 2001). Además, actualmente se conoce el 100% del genotipo del ratón, con lo que le da un valor añadido a su uso.

El estudio del sistema visual también pasa por la utilización del ratón, aunque no se ha dado siempre el caso. Al ser un animal nocturno se consideraba poco adecuado para el estudio de la visión. Por otro lado, se puede argumentar que un animal nocturno tiene una visión mucho más sensible a la luz que un animal diurno, y que el uso de otros sistemas sensoriales para sobrevivir no excluye la posibilidad de un sistema visual eficaz (Pinto *et al.*, 2000). Entre los numerosos métodos experimentales utilizados hoy en día para el estudio del sistema visual del ratón están los que no dependen del comportamiento del animal y los que si lo hacen. En el primer grupo podemos incluir el genotipaje, el examen del fondo de ojo, el reflejo pupilar, el electrorretinograma y los potenciales evocados. En el segundo grupo podemos incluir los laberintos, el condicionamiento al miedo o supresión, el *test* optomotor y los cambios inducidos del

ritmo circadiano (Pinto *et al.*, 2000). El primer grupo de experimentos da resultados muy objetivos, aunque normalmente aporta información sobre el funcionamiento de un grupo de células muy concreto, obviando el funcionamiento general del sistema visual. El grupo de experimentos de comportamiento visual da resultados más subjetivos, ya que dependen de factores como el ambiente, la capacidad de aprendizaje del animal (Wahlsten *et al.*, 2003) o la metodología utilizada (Wahlsten, 2001). Sin embargo, si se logra minimizar esa variación ambiental y se sigue un *test* de comportamiento estandarizado, los resultados son muy significativos ya que ilustran muy claramente el funcionamiento general del sistema visual. En esta tesis se ha optado por estudiar la vía visual y la vía no visual de la retina con dos experimentos de comportamiento visual: el *test* optomotor y el estudio de la actividad circadiana.

### *Test Optomotor*

Con el fin de evaluar las funciones de las células ganglionares de la retina se ha optado por el estudio del reflejo optoquinético mediante un experimento de comportamiento visual: el ***test optomotor***. El estudio del reflejo optoquinético, como el de cualquier otro reflejo, tiene una ventaja respecto los otros experimentos exclusivos de comportamiento. Los reflejos son innatos e involuntarios, con lo que pueden ser estudiados prácticamente desde el primer día de experimentación, sin conllevar ningún tipo de aprendizaje por parte del animal ni tiempo de preparación por parte del investigador (Prusky *et al.*, 2004). De esta manera, una evaluación del reflejo



optoquinético bien estandarizada puede dar información muy demostrativa del sistema visual del ratón.

El *test* optomotor es un experimento de comportamiento visual ampliamente utilizado para el estudio del reflejo optoquinético. En éste experimento, descrito hace años (Balkema, 1984), se inmoviliza el animal en medio de un tambor giratorio con barras verticales blancas y negras. Seguidamente se hace rotar el tambor a diferentes velocidades angulares, mientras una cámara filma los movimientos oculares suscitados por los estímulos visuales. Se establece el buen funcionamiento de la vía visual de la retina cuando se produce una correcta respuesta refleja. De lo contrario, una baja o nula respuesta al *test* optomotor se asocia con una disfunción de la vía visual de la retina.

Recientemente se ha diseñado un *test* experimental muy parecido donde el animal no está inmovilizado, sino encima de una plataforma alzada (véase material y métodos). Los movimientos oculares causados por el reflejo optoquinético se acompañan de movimientos de la cabeza en la misma dirección (Prusky *et al.*, 2004), con lo que una cámara de vídeo situada sobre el ratón, enfocando desde arriba da la misma información sobre el reflejo optoquinético que la cámara enfocando directamente al ojo inmovilizado. Esta segunda metodología es preferible ya que es menos invasiva y estresante para el animal.

## *Rueda de Actividad Circadiana*

Para el análisis de la vía no-visual de la retina hemos optado por el estudio del ritmo circadiano. Dicho estudio, incluido dentro de los *test* de comportamiento animal, ha sido el más ampliamente utilizado para evaluar la función de las ipRGC y está ampliamente estandarizado y aceptado por la comunidad científica internacional. Se trata de la **rueda de actividad circadiana** (véase material y métodos). En el experimento se coloca al animal dentro de una jaula equipada con una rueda de actividad cuyas vueltas son monitorizadas a lo largo del tiempo. De ésta forma se establece una relación directa entre el nivel de actividad del animal con las condiciones lumínicas que lo han suscitado. Como en el caso del reflejo optoquinético, el ritmo circadiano es algo que no depende de la colaboración del animal ni de su capacidad para el aprendizaje, por esto la rueda de actividad es un experimento fiable y ampliamente utilizado para el estudio de ritmos circadianos (Pinto *et al.*, 2000).

En la presente tesis, y mediante los citados experimentos de comportamiento animal se comparará la funcionalidad de la vía visual y no visual de ratones control, ratones que padecen una distrofia retiniana, y ratones con distrofia retiniana que a su vez tienen una sobre-expresión de proinsulina. El estudio funcional de la vía no visual se complementará con un estudio morfológico mediante tinciones inmunohistoquímicas (ver material y métodos).



## **OBJETIVOS**



El presente trabajo de investigación persigue la caracterización funcional de la vía no-visual de la retina, originada en las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, en ratones que sufren distrofia retiniana de origen heredodegenerativo (ratones *rd*). Dicha caracterización, bien documentada a nivel electrofisiológico en experimentos *in vivo* (animales anestesiados) e *in vitro*, no ha sido estudiada en igual medida en experimentos de conducta visual, motivo por el cual llevamos a cabo el trabajo resumido en la presente memoria. Con el fin de documentar dicha caracterización, creemos necesario de forma previa documentar desde un punto de vista estructural las modificaciones que hayan podido sufrir las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, para lo cual llevamos a cabo una serie de experimentos de marcaje inmunocitoquímico en preparaciones histológicas de retina.

Asimismo, múltiples trabajos han podido documentar desde una perspectiva electrofisiológica y estructural la degeneración de los fotorreceptores clásicos (conos y bastones) y la consiguiente remodelación del resto de la retina en modelos murinos de degeneración retiniana. Sin embargo, son escasos los trabajos que exploran conductualmente la vía visual de los ratones que sufren un proceso heredodegenerativo de la retina. Es por ello, que la presente Tesis Doctoral trata de caracterizar en animal entero no anestesiado la funcionalidad de la vía visual en ratones que sufren distrofia retiniana de origen heredodegenerativo.

La **hipótesis** de la presente Tesis Doctoral defiende que el proceso de neurodegeneración retiniana en ratón *rd* que afecta de forma bien documentada a la vía visual, no afecta en igual medida a la vía no-visual de la retina, a pesar de los profundos cambios estructurales que sufren las retinas de los animales *rd* de edad avanzada. Con el fin de demostrar dicha hipótesis se han utilizado dos modelos animales de degeneración retiniana (ratones *rd1* y *rd10*).

Por otra parte, en un intento de profundizar en la búsqueda y caracterización de agentes neuroprotectores que pudieran atenuar el proceso de neurodegeneración en ratones que sufren distrofia retiniana de origen heredodegenerativo, el presente trabajo de investigación ha intentado documentar hasta qué punto la proinsulina, neuromodulador que ha sido propuesto como agente neuroprotector, podría atenuar los efectos de la degeneración retiniana sobre la vía visual y la vía no visual de la retina. En este sentido, se plantea como **hipótesis** que la proinsulina es capaz de atenuar el efecto de la degeneración retiniana sobre la disfuncionalidad de la vía visual y la vía no visual ya demostrado en estudios de caracterización estructural y funcional de los fotorreceptores clásicos. Con el fin de demostrar dicha hipótesis se ha utilizado un ratón transgénico, que además de sufrir una degeneración retiniana es capaz de sobre-expresar proinsulina (hProIns).

Los objetivos concretos de la presente Tesis Doctoral son:

- Estudiar desde un punto de vista estructural las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina y sus posibles conexiones con otras células retinianas involucradas en procesos funcionales de adaptación lumínica en ratones *rd1*, *rd10* y *hProIns*
- Estudiar desde un punto de vista funcional la vía visual de la retina en ratones *rd1*, *rd10* y *hProIns*.
- Estudiar desde un punto de vista funcional la vía no-visual de la retina en ratones *rd1*, *rd10* y *hProIns*.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En la presente tesis doctoral se ha utilizado el ratón como animal de experimentación. El ratón es uno de los animales más utilizados en la ciencia experimental por sus especiales características, como su reducido tamaño, su corto período de gestación y su facilidad de reproducción dentro del ambiente del laboratorio. El ratón se utiliza en todo tipo de investigaciones, incluyendo cáncer, inmunología, toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, envejecimiento, y estudios cardiovasculares (Suckow *et al.*, 2001). Además, actualmente se conoce el 100% del genoma de ratón (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).

En la presente tesis doctoral se han utilizado cuatro tipos de ratón distintos: 1) ratones control sanos (**C57BL/6J**); 2) modelo de ratón con degeneración retiniana de curso temporal rápido (**rd1**); 3) modelo de ratón con degeneración retiniana de curso temporal intermedio (**rd10**); 4) ratones transgénicos con sobreexpresión de proinsulina humana (**hProIns**). Se exponen a continuación sus características diferenciales. En la **figura 16** se muestra la apariencia (fenotipo) de los ratones utilizados, en fondo genético C57BL/6J.



**Figura 16. Animales de Experimentación.**

Apariencia de los ratones utilizados. Los cuatro modelos presentan la misma pigmentación y aspecto externo.

**C57BL/6J:** Adquirido directamente a los laboratorios Jackson ([www.jax.org](http://www.jax.org)) y estabulado en la Universidad de Alcalá. Es una de las cepas más utilizadas como ratón control. Tiene un genotipo puro; estos ratones han sido cruzados entre ellos durante al menos 20 generaciones y son virtualmente idénticos los unos a los otros. Tienen una vida media de entre 2 y 3 años y su background genético les permite la máxima expresión de las mutaciones inducidas ([www.jax.org](http://www.jax.org)). A lo largo de toda la memoria nos referiremos a él como "C57" o como ratón control.

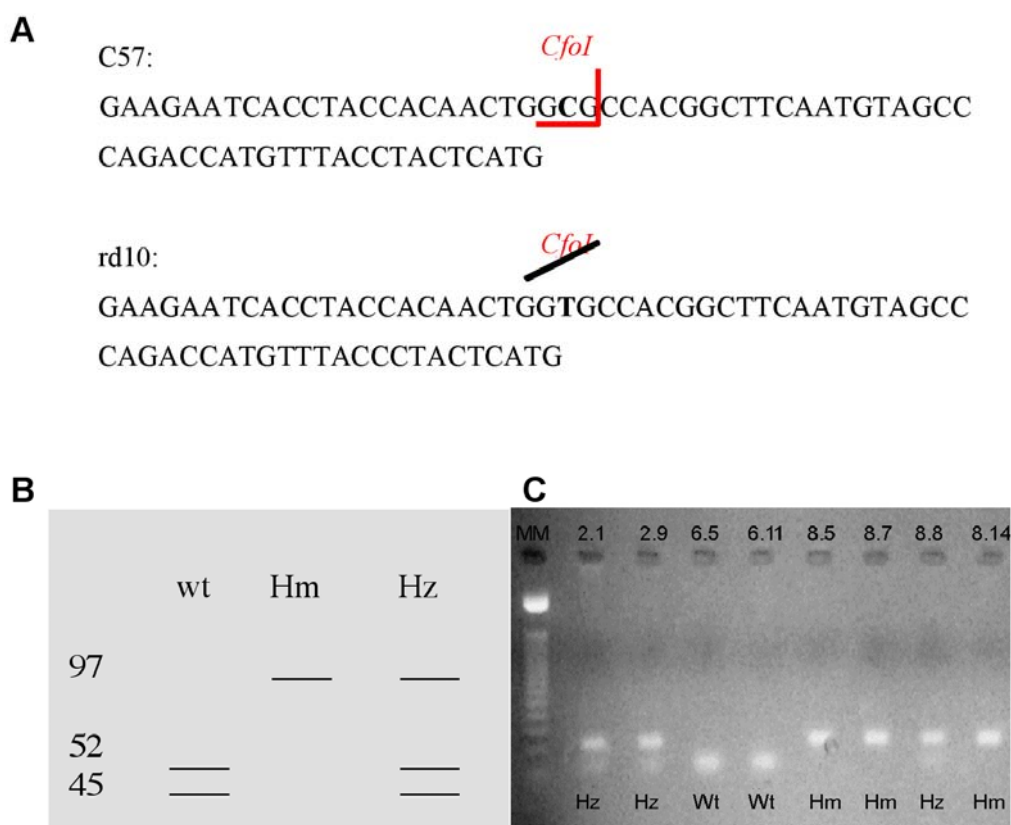
**Rd1 (*Pdeb*<sup>rd1/-</sup>):** Animales adquiridos a través de los laboratorios Jackson, gracias a la donación de la “Fundación Internacional de lucha contra la ceguera”. Forma parte del grupo de ratones *rd*, que como ya se descrito en el apartado de introducción sufre enfermedades visuales homólogas a la retinitis pigmentaria de los humanos. En concreto, el ratón *rd1* sufre una mutación recesiva en el exón 7 del gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa del GMP cíclico de los bastones (Bowes *et al.*, 1990), la cual inactiva la proteína y provoca el acumulo de GMP cíclico en la célula y en consecuencia el exceso de calcio intracelular. Esto resulta en una degeneración de los bastones en períodos postnatales tempranos (Lolley *et al.*, 1994; Portera-Cailliau *et al.*, 1994). La degeneración de bastones es seguida de la degeneración de los conos y de la reorganización consecuente de las otras capas de la retina (Marc *et al.*, 2003). La degeneración de los fotorreceptores en los ratones *rd1* homocigotos es de naturaleza apoptótica (Portera-Cailliau *et al.*, 1994), habiéndose documentado que estos animales comienzan a perder los fotorreceptores aproximadamente hacia el día 9 postnatal (p9) ,

antes de abrir los ojos, y al llegar a p35 han perdido la totalidad los fotorreceptores, observándose una ausencia total de la capa nuclear externa de la retina. La identificación de los ratones rd1 es posible por técnicas de genotipaje, mediante PCR, así como por oftalmoscopia, debido a la atenuación de los vasos sanguíneos de la retina y a las manchas pigmentadas que aparecen en su fondo de ojo (Hawes *et al.*, 1999). Estos ratones se encuentran en un fondo genético C57BL/6J.

***Rd10 (Pdeb<sup>rd10/-</sup>):*** Donado gentilmente por el Dr. B. Chang, de los laboratorios Jackson. Este ratón también forma parte del grupo de ratones *rd*. El ratón rd10 sufre una mutación en el exón 13 de la subunidad  $\beta$  del gen de la fosfodiesterasa de bastones (Chang *et al.*, 2002). La degeneración sufrida por estos ratones es similar a la que padecen los rd1, aunque el curso temporal de la degeneración de fotorreceptores es más lento. Los fotorreceptores comienzan a degenerar aproximadamente hacia los veinte días de desarrollo postnatal (p20). Su capa del fotorreceptores empieza a desaparecer a partir de dicha edad, y a p40 la degeneración es prácticamente completa. (Barhoum, 2006). A nuestro juicio, los ratones rd10 parecen ser más apropiados para el estudio de las enfermedades heredodegenerativas de la retina porque el curso temporal más lento de la degeneración abre una ventana para posibles ensayos terapéuticos. Estos ratones también se encuentran en un fondo genético C57BL/6J.

***hProIns (Ratones transgénicos productores de Proinsulina):*** Los ratones hProIns son ratones transgénicos generados en el Servicio de Producción Animal del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CEBATEG) dirigido por la Dra.

Fátima Bosch. Dichos ratones fueron generados para la realización de los proyectos de investigación de referencia SAF2001-1038 y SAF2004-5870 del Ministerio de Educación y Ciencia. La construcción del ratón transgénico consistió en la inserción de un plásmido (pMLC-hIns) de un tamaño de 6,4 kb en la cadena ligera de la miosina (MLC), promotor muscular constitutivo, en el ADN de ratones control de fondo mixto C57BL/6J y SJL. Esta inserción permite a los ratones producir **proinsulina humana** de forma constitutiva en el músculo estriado (de ahí el nombre de hProIns – *human Pro-Insulin*) al tiempo que se expresa el gen MLC. La proinsulina generada no se procesa a insulina y produce unos niveles elevados de proinsulina en sangre (Riu *et al.*, 2002). Los ratones transgénicos, de fondo mixto, se retrocruzaron con ratones rd10 en fondo genético C57BL/6J, con el fin de conseguir ratones rd10/hProIns. Los ratones rd10/hProIns han sido utilizados en esta Tesis Doctoral como modelo animal de degeneración retiniana con sobre-expresión del factor neuroprotector proinsulina. Asimismo, se generaron ratones C57/hProIns que fueron utilizados como controles no distróficos. Debido a que los ratones hProIns originales se encontraban en fondo genético mixto C57BL/6J y SJL, se estimó que era necesario llegar hasta la quinta generación de retrocruzamientos (F5) para conseguir un fondo genético homogéneo C57BL/6J. El seguimiento de los animales procedentes de las distintas líneas de retrocruzamiento (F1 – F7) ha sido posible gracias a la genotipaje, mediante técnica de PCR, tanto de la mutación rd10 como del transgén de la proinsulina humana. Para la detección de la mutación rd10, se utilizó una encima de restricción, la encima *CofI*, capaz de cortar el exón 13 en ratón control, pero no en rd10 (**figura 17**).

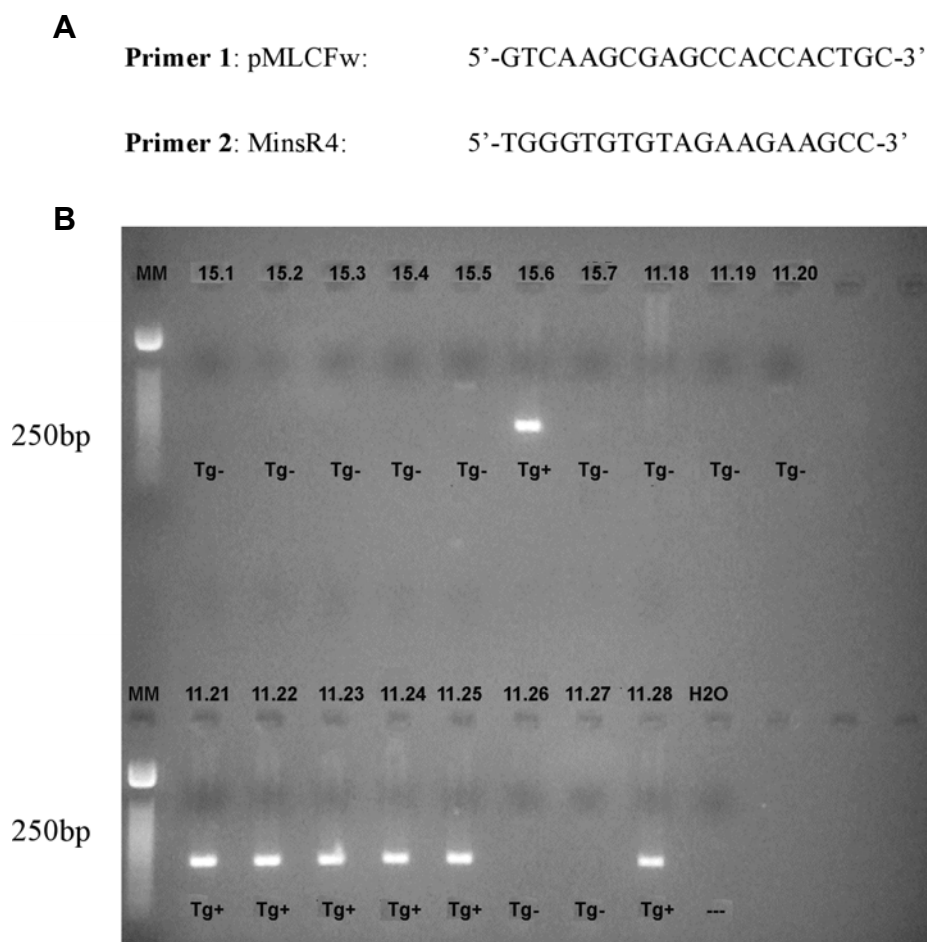


**Figura 17: Identificación de los ratones rd10 por análisis del genotipo.**

A. Secuencia parcial del exón 13 dentro del cual se encuentra la mutación de sustitución (de citosina a timidina) del ratón rd10 y la consecuente pérdida del sitio de inserción de la *CofI*. B. Esquema de los resultados esperados de la digestión de los productos de la PCR con *CofI* de ADN de animales C57BL/6J (wt), rd10 homocigoto (Hm), y rd10 heterocigoto (Hz). C. Resultados del genotipaje para rd10 de los animales de la línea 2 (2.1, 2.9), línea 6 (6.5, 6.11) y línea 8 (8.5, 8.7, 8.8 y 8.14) empleadas en la presente Tesis Doctoral. Se indica debajo de cada banda el resultado del análisis del genotipo: Hz, Wt y Hm.

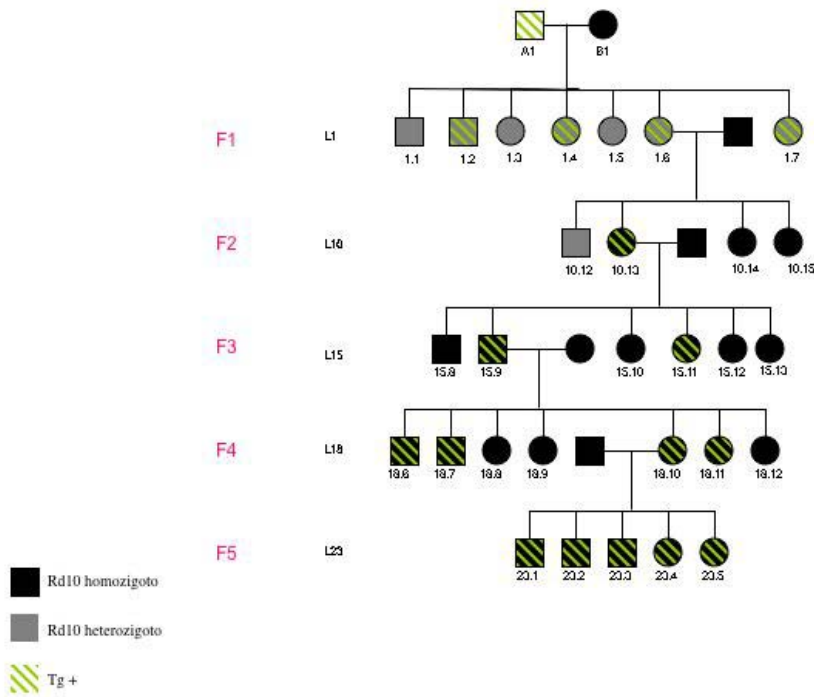
Por otro lado, el gen de la proinsulina humana fue fácil de detectar ya que es totalmente exógeno al DNA del ratón (**figura 18**). Con los resultados de las PCR se pudieron diseñar todos los retrocruces necesarios para llegar a la construcción del ratón rd10/hProIns de background homogéneo (véase ejemplo del seguimiento de las distintas líneas de animales en la **figura 19**).





**Figura 18: Identificación de los ratones hProIns por análisis del genotipo.**

**A.** Primers utilizados para realizar la PCR del gen de la proinsulina humana. **B.** Resultados de la PCR de los animales de la línea 15 (15.1 – 15.7) y la línea 11 (11.18 – 11.28) empleados en la presente Tesis Doctoral. El gen amplificado contiene aproximadamente 250 pares de bases. Se indica debajo de cada columna el resultado de la identificación, marcándose como Tg+ a los ratones hProIns, que expresan el transgén, y como Tg- a los que no expresan el transgén. Se muestra asimismo, el control negativo (H2O).



**Figura 19: Árbol genealógico de los ratones transgénicos hProIns**

Las líneas de animales transgénicos hProIns han sido creadas a partir de ratones transgénicos en fondo mixto C57BL/6J - SJL generados en el CEBATEG (A1-A7). Se muestra el árbol genealógico de una línea de animales transgénicos (A1), indicando los sucesivos retrocruzamientos (F1 – F5) con ratones homocigotos rd10 en fondo genético C57BL/6J hasta alcanzar la quinta generación (F5). Cada símbolo corresponde a un animal distinto (□=♂; ○=♀), y se indica mediante el código mostrado en la esquina inferior izquierda la condición de homocigosis o heterocigosis para la mutación rd10 y/o la presencia del transgén (Tg+) en los animales hProIns. Junto a la indicación del retrocruzamiento se indica el número correspondiente a cada línea mostrada (L1, L10, L15, L18 y L23). Debajo de cada símbolo se muestra el número de identificación de cada uno de los animales incluidos en el presente árbol (p.ej., animal 23.1 = línea 23, animal número 1).

## *Mantenimiento y sacrificio de los animales*

El mantenimiento y estabulación de los ratones utilizados en la presente Tesis Doctoral se realizó en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá. Dicho centro cumple en todos sus extremos las recomendaciones del Convenio del Consejo de Europa ETS 123 y la normativa vigente sobre Protección de los Animales utilizados en Experimentación y otros Fines Científicos, reflejada en el R.D. 1201/2005, de 10 de Octubre de 2005. Asimismo, dicho Centro de Experimentación Animal se encuentra registrado en la Dirección General de Agricultura de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid, con el número ES280050001165.

Los ratones fueron estabulados en *racks* ventilados, con jaulas independientes, con ultrafiltración de aire de entrada y salida a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air Filters) absolutos de una eficiencia de 99,997% (filtra las partículas < 0.3 micras). La temperatura de mantenimiento fue de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , la humedad relativa del aire fue de  $55 \pm 10\%$ , y la ventilación fue de >30 renovaciones/hora. Los animales se alimentaron con pienso A04 de mantenimiento de rata/ratón de la empresa Panlab, y el lecho fue de madera de chopo. Durante la estabulación, los animales fueron sometidos a un ritmo luz/oscuridad de 12h:12 horas. En los experimentos en que fue necesario, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Cedex, Francia) a una concentración de 95 mg/Kg.

## MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO

### *Preparación de los cortes histológicos*

Tras el sacrificio del animal, los dos ojos fueron enucleados, procediéndose a continuación a su fijación. Previamente, se procedía a separar el polo anterior del ojo, para conseguir una mejor fijación. La cúpula del ojo fue fijada en paraformaldehído al 4% en PBS (Sigma, D5652-10X1L, Steinheim, Alemania) al 0,1M con un ph de 7.4 y a una temperatura de 4°C. Seguidamente el ojo se bañó en PBS al 0,1M y se crio-protegió en sucrosa al 30% durante la noche (*overnight ON*). El polo posterior del ojo fue sumergido en OCT (*Optimal Cutting Temperature*, Tissue-Tek,, Hatfield, USA), congelado con hidrógeno líquido, y cortado sagitalmente en secciones de 15µm en el criostato (Bright Instrument Company LTD, Modelo OTF, Huntington, England). Los cortes se montaron sobre portaobjetos de vidrio que habían sido previamente gelatinizados. El tejido fue sometido a diferentes lavados para optimizar el efecto de los anticuerpos; primero se lavaron las preparaciones con PBS 0,1M para eliminar el exceso de OCT y seguidamente se lavaron con bromuro de sodio para disminuir la autofluorescencia del paraformaldehído. Se hizo otro lavado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% en metanol 100% para inhibir la peroxidasa endógena, y por último se lavaron con PBS 0,1M + Triton X 0,2% para facilitar la permeabilidad de las membranas celulares al anticuerpo. Seguidamente los portas fueron congelados hasta el proceso de inmuno-tinción.

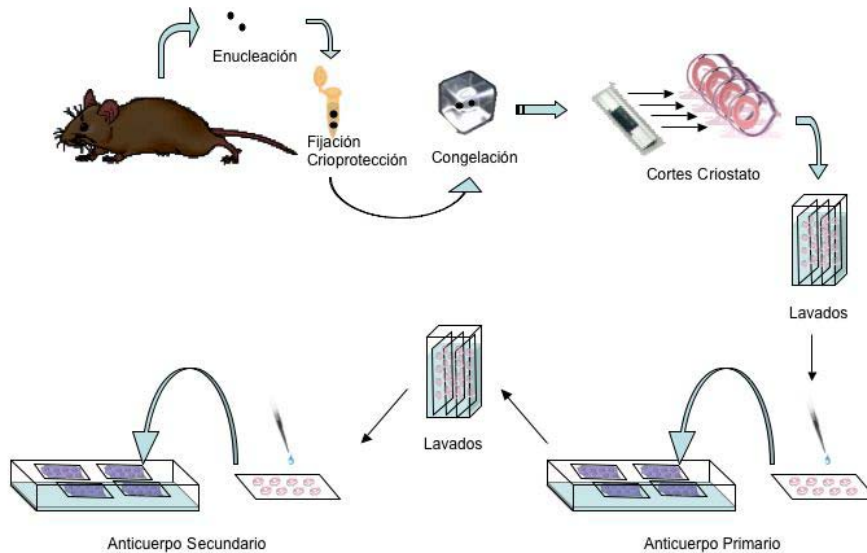
## *Anticuerpos utilizados*

En la presente Tesis Doctoral se han realizado marcajes inmunocitoquímicos utilizando dos anticuerpos específicos contra dos moléculas (melanopsina y tirosina hidroxilasa) ubicadas de forma específica en sendos tipos celulares de la retina (respectivamente, células ganglionares intrínsecamente fotosensibles y células amacrinas dopaminérgicas). Se describe a continuación el método de marcaje específico para cada molécula.

***Melanopsina:*** Los cortes fueron marcados con el método indirecto de inmunofluorescencia. Primeramente se incubaron a temperatura ambiente ON con un anticuerpo primario policlonal contra melanopsina (Affinity Bioreagents, Golden, USA) hecho en conejo y diluido a 1:100 en PBS 0,1M + 0.1% Triton X-100. Seguidamente los cortes fueron lavados con PBS 0,1M y transferidos al anticuerpo secundario inmunofluorescente *goat anti-rabbit* IgG asociado a Cyanine-2 (Cy2). El anticuerpo secundario (Jackson, Bar Harbor, USA) se preparó a una dilución de 1:100 en PBS 0,1M + 0.1% Triton X-100, y se dejó actuar durante 2 horas. Posteriormente, las preparaciones se lavaron con PBS 0,1M, se montaron con unas gotas de FluorSave Reagent (CalbioChem, Darmstadt, Alemania), y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio para examinarlas con microscopia confocal. La **figura 20** resume todo el proceso de marcaje inmunocitoquímico.

***Tirosina Hidroxilasa:*** Para el marcaje de esta molécula se siguió el mismo protocolo que con la melanopsina, cambiando tanto el anticuerpo primario como el secundario. El anticuerpo para tirosina hidroxilasa era monoclonal (Chemicon,

Temecula, USA), y se utilizó con una dilución del 1:400. El anticuerpo secundario inmunofluorescente, *goat anti-mouse IgG* asociado a Cyanine-3 (Cy3) (Jackson, Bar Harbor, USA) se aplicó igualmente a una dilución de 1:100. Como en el caso de la melanopsina, las preparaciones se lavaron con PBS 0,1M, se montaron con unas gotas de FluorSave Reagent y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio para examinarlas con microscopia confocal.



**Figura 20. Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico.**

Tras sacrificar el animal, se procedió a la enucleación. El ojo aislado fue fijado en paraformaldehído (4%) y congelado hasta su preparación para la realización de las secciones a criostato. Las secciones retinianas fueron sometidas a los procesos de lavado, inclusión en anticuerpo primario y secundario antes de ser observados a microscopia confocal.

En una serie de experimentos se procedió a un marcaje simultaneo de ambas moléculas, melanopsina y tirosina hidroxilasa. Para los dobles marcaje se fabricaron *cocktails* de los dos anticuerpos primarios y los dos anticuerpos secundarios respectivamente, manteniendo en todo momento la dilución óptima de trabajo de cada anticuerpo, y siguiendo los mismos protocolos de tinción y montaje para la microscopia confocal ya mencionados.

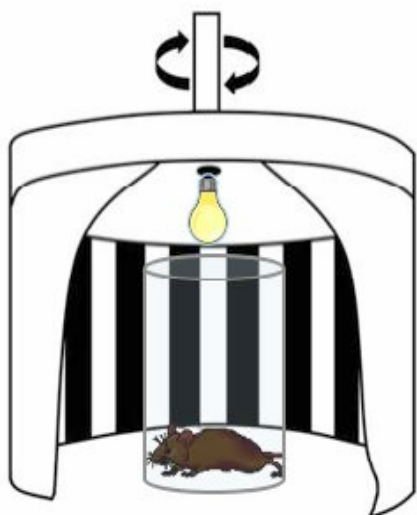
### *Microscopía*

Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica, Wetzlar, Alemania). Se utilizaron objetivos de aceite 63X, y se hicieron proyecciones Z de amplitud máxima para abarcar la totalidad de las células estudiadas. Para los estudios de doble marcaje, se recogieron imágenes confocales secuenciales para evitar estimulación simultánea de los marcadores fluorescentes de ambos tipos celulares.

## TEST OPTOMOTOR

Para la realización de los experimentos de **test optomotor** se siguió el procedimiento descrito por Mangini *et al.* (1985). Para ello se procedió a diseñar un equipo experimental similar al descrito por dichos autores, con las modificaciones necesarias

para adaptarlo al material disponible. El equipo constaba de un tambor giratorio conectado a un rotor (LKB Bromma, Suecia) con la posibilidad de girar a distintas velocidades angulares ( $\omega$ ). La pared interior del tambor contenía bandas verticales blancas o negras de distintos grosores, que se extendían en altura, aproximadamente desde  $-10^\circ$  a  $+50^\circ$  del plano horizontal. Los ratones se situaban en el centro del tambor y sus movimientos estaban limitados por un cilindro de plástico transparente a través del cual se podía ver claramente las bandas oscuras y claras (véase esquema de la **figura 21**).



**Figura 21: Esquema del material utilizado para la realización del Test Optomotor.**

El ratón es situado dentro de un cilindro de plástico transparente a través del cual puede ver el estímulo visual (bandas verticales blancas y negras) en las paredes del tambor en rotación. Los experimentos se realizaron en condiciones de adaptación a la luz, haciendo rotar el tambor a distintas velocidades angulares.

El tambor rotatorio estaba iluminado por arriba con 16 LEDs (Toyoda Gosei, Modelo E1L51-AWOC2, Japón) que aportaban una luminosidad de  $100 \text{ cd/m}^2$ . A su vez se dispuso una cámara digital (WOC, Modelo TTA-47T, China) situada por encima del tambor, la cual permitía observar y grabar los movimientos del ratón, los cuales se

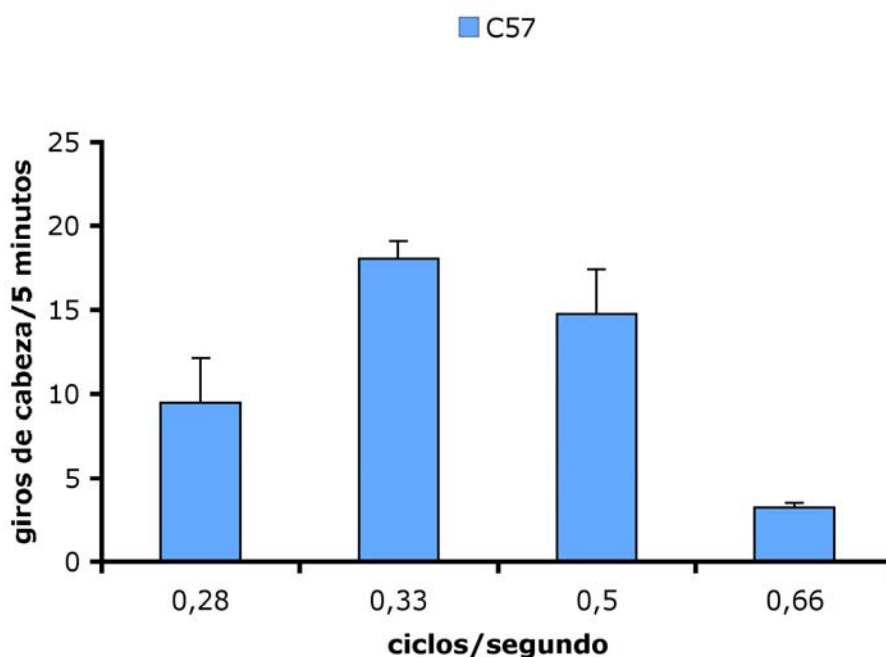


visualizaban en una pantalla (TVS, Modelo MM-9M, Taiwán). El protocolo de experimentación consistía en la observación y cuantificación del número de veces que el animal de experimentación desplazaba la cabeza en el sentido de rotación del tambor.

De forma previa a la realización del *test* en cada animal, este era mantenido durante 5 minutos dentro del cilindro de plástico transparente para permitir su habituación. A continuación comenzaba el experimento con la puesta en marcha del tambor rotatorio. Siguiendo los protocolos diseñados de acuerdo a referencias bibliográficas (Jellai *et al.* 2005; Shutoh *et al.*, 2002), se establecieron cuatro velocidades angulares del tambor en ciclos por segundo, siendo un ciclo el cambio de contraste (de negro a blanco y de blanco a negro). Cada animal era sometido a experimentos en las cuatro velocidades angulares del tambor, a razón de cinco minutos por cada velocidad angular. Cada 30 segundos se procedió a cambiar el sentido de rotación del tambor para evitar la habituación del animal. Se cuantificaron los giros de cabeza que realizaba el ratón en cada velocidad, contabilizando como positivo el giro de cabeza que coincidía con el paso de un ciclo por delante del campo visual del ratón, en el mismo sentido que el giro de cabeza.

Los resultados recogidos de cada ratón se representan en gráficas lineales XY, donde los valores de X corresponden a las cuatro velocidades angulares (ciclos/seg o cps) utilizadas en el experimento (0,28; 0,33; 0,5; 0,66), y los valores de Y corresponden al número de giros de cabeza contabilizados en los cinco minutos de cada velocidad angular. La **figura 22** muestra en forma de histograma de barras los resultados del *test*

optomotor aplicado a ratones controles C57 de 3 meses de edad. Para el análisis estadístico se aplicó One-way ANOVAs con el test posterior de Tukey mediante el programa GraphPad InStat (Versión 3.00 para Windows 95), GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

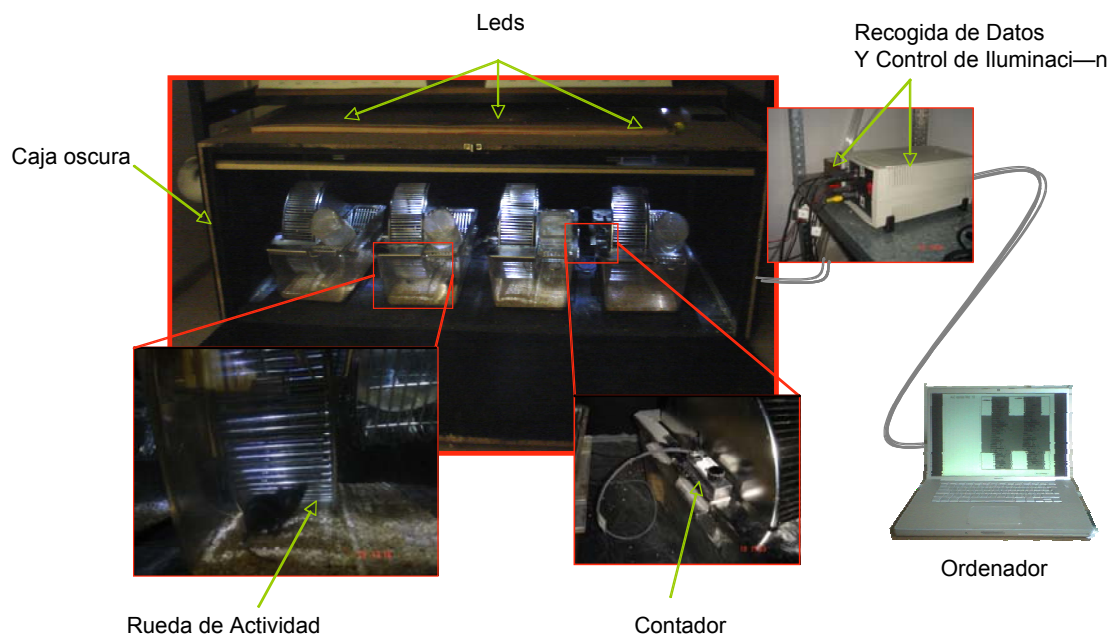


**Figura 22: Ejemplo de los resultados obtenidos en el test optomotor**

Se representan mediante histograma de barras la relación entre los giros de cabeza y la velocidad angular. Los valores corresponden los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en un grupo de cuatro animales controles C57 adultos sanos en un test de 5 minutos de duración. Se aprecia que los ratones muestran una mayor capacidad de discriminación visual para velocidades angulares de 0,33 y 0,5 ciclos por segundo.

## ACTIVIDAD CIRCADIANA

Para llevar a cabo los experimentos de actividad circadiana se han utilizado jaulas equipadas con una rueda de actividad (Linton Instrumentation, Modelo EWAC-R, Inglaterra). Cada jaula disponía de un sistema óptico que permitía el recuento informatizado de las vueltas que daba la rueda. Las jaulas estaban situadas dentro de una caja hermética, adecuadamente ventilada y cuyas paredes habían sido ennegrecidas (**figura 23**). El interior de la caja era iluminado mediante LEDs ( Toyoda Gosei, Modelo E1L51-AWOC2, Japón), pudiéndose ajustar la intensidad de iluminación mediante un alimentador controlado por un ordenador personal.



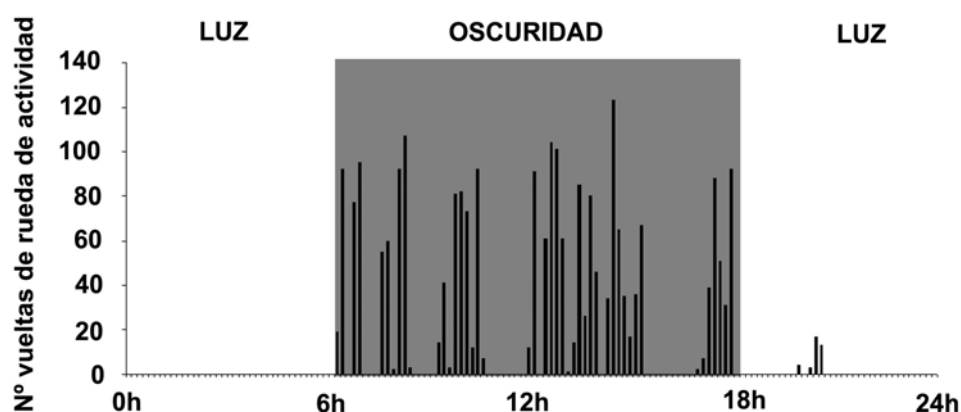
**Figura 23: Equipamiento empleado para la evaluación de la actividad circadiana.**

Los animales fueron mantenidos en jaulas equipadas con una rueda de actividad. Las jaulas están situadas dentro de una caja oscura en la que se puede ajustar la intensidad lumínica mediante LEDs. Cada vuelta dada por la rueda de actividad es detectada por un contador (dispositivo optoelectrónico) y transmitida a un ordenador personal a través de una tarjeta de adquisición de datos. El software informático *actividad circadiana 1.0 y 2.0* permite controlar la iluminación de los LEDs de acuerdo al protocolo de luz/oscuridad deseado, así como la representación en tiempo real de la gráfica de actividad (actograma).

Los tiempos de de encendido y apagado de los LEDs podían ser controlados de forma programada por el ordenador personal. Para la realización de los experimentos se ajustó el tiempo de iluminación a ciclos de 12 horas, estableciendo básicamente tres tipos de ciclos: 12 horas luz, 12 horas oscuridad (12:12 L/D), 24 horas oscuridad (24 D/D) ó 24 horas luz (24 L/L).

Los ratones se situaron individualmente en cada jaula, y fueron sometidos a distintos protocolos experimentales. Todos los experimentos de actividad circadiana se llevaron a cabo de forma paralela en animales control y animales *test* en grupos de cuatro. Cada uno de los experimentos mostrados en el apartado de resultados ha sido reproducido al menos en cuatro animales de experimentación distintos con similares resultados. El número de vueltas que daba cada rueda de actividad a lo largo de cada experimento fue recogido por un ordenador personal y representado gráficamente en la pantalla del mismo. El software utilizado para el control de la iluminación y la recogida de datos fue diseñado por D<sup>a</sup> Isabel Ventura, dentro del "Proyecto Fin de Carrera" titulado "Actividad Circadiana 1.0" (Ventura, 2004), y fue modificado por D. Pedro Escudero, en su "Proyecto Fin de Carrera" titulado "Actividad Circadiana 2.0" (Escudero, 2005).

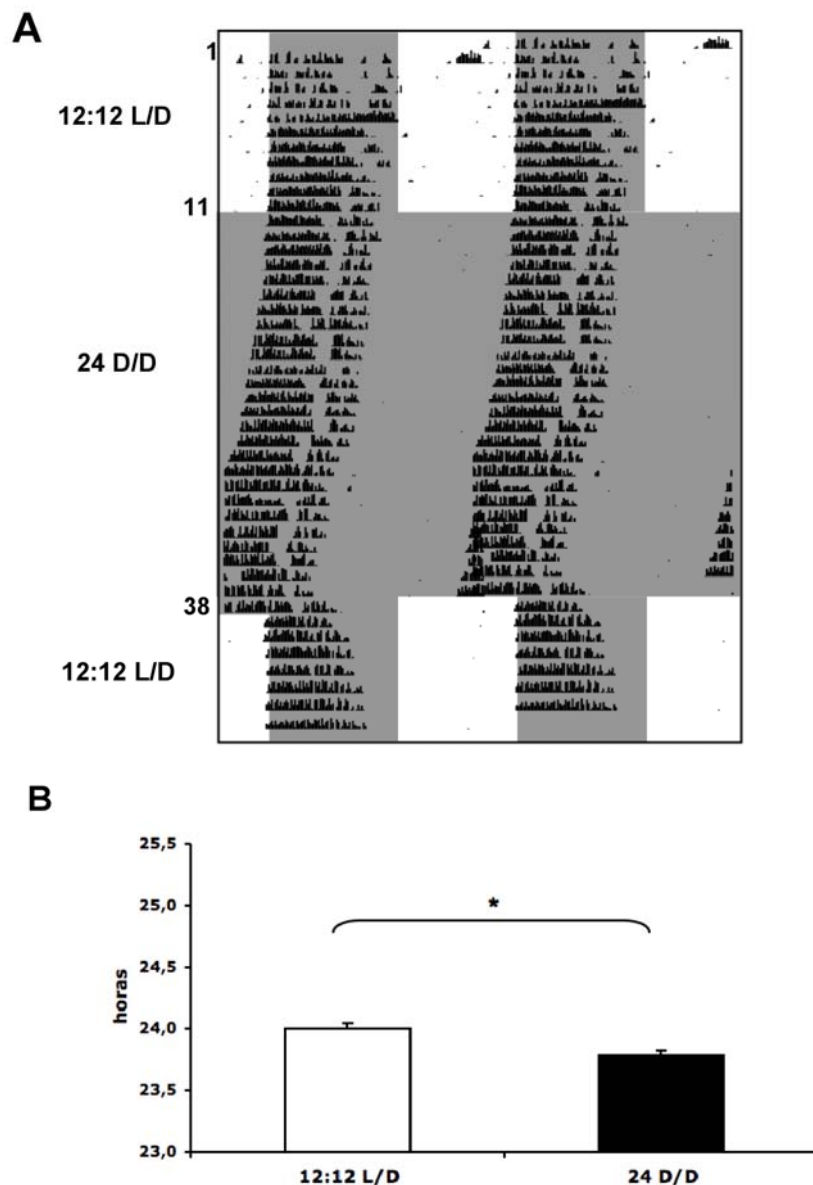
La actividad motora de los ratones durante las distintas fases de luz/oscuridad se presenta en forma de histogramas de actividad, en los cuales las vueltas dadas por las ruedas de actividad se resumen en periodos de 10 minutos y se muestran en forma de barras verticales yuxtapuestas para constituir 24 horas continuas de cuantificación (**figura 24**).



**Figura 24: Representación gráfica de la actividad motora de un animal control C57.**

Se representa en forma de histograma de barras el número de vueltas dadas por la rueda de actividad en unidades de tiempo de 10 minutos a lo largo de 24 horas continuas de registro. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fue sometido el animal de experimentación. Como se puede apreciar, el ratón es un animal nocturno, desarrollando una gran actividad cuando queda a oscuras y cesando toda actividad durante las fases de luz.

Un experimento de actividad circadiana suele durar varias semanas. Por ello, la actividad motora del animal se suele mostrar en forma de **actogramas** (representaciones gráficas de actividad circadiana). Los actogramas suelen mostrar dos periodos de 24 horas de forma continuada, superponiendo los histogramas de barras de un día con los del siguiente, lo que permite una visualización más clara de la tendencia del ritmo circadiano de cada animal. Con el fin de cuantificar la variación en la duración de la actividad circadiana, se representan en forma de histogramas de barras los valores medios del periodo de actividad en cada situación lumínica a la que es sometido cada animal. La **figura 25** muestra el actograma de un animal sometido a ciclos de luz/oscuridad y oscuridad continua durante varios días consecutivos. El análisis estadístico se realizó mediante el "*Unpaired Test*" y el Test de Welch del programa GraphPad Instat (Versión 3.00 para Windows 95, GraphPad Software).



**Figura 25: Representación gráfica de la actividad circadiana.**

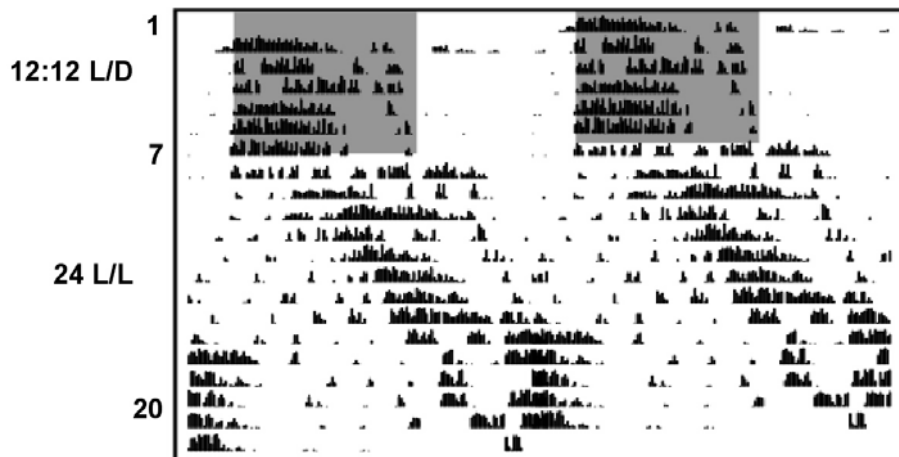
**A.** La actividad circadiana se representa gráficamente mediante "*actogramas*", los cuales muestran la actividad del animal (recuentos de las vueltas dadas por la rueda de actividad medidos periodos de 10 minutos) durante las fases de luz y oscuridad. Cada línea horizontal representa 48 horas de registro divididas en 288 columnas de 10 minutos cada una. Se representan de forma superpuesta los 45 días que duro el experimento: los 11 días iniciales en los que el animal fue sometido a ciclos luz/oscuridad (12 horas de luz/12 horas de oscuridad [12:12 L/D]), los 27 días que fue mantenido en oscuridad continua [24 D/D] y los últimos 7 días que volvió a ciclos luz/oscuridad [12:12 L/D]. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fue sometido el animal de experimentación. Durante los periodos de oscuridad continua la actividad motora comienza antes de cumplir las 24 horas (ritmo circadiano de actividad endógena < 24 horas), hecho que es fácilmente apreciable en el actograma por el desplazamiento relativo del comienzo de la actividad. **B.** Representación gráfica de los valores medios (media  $\pm$  ESM) del ritmo circadiano mostrado en A, correspondiente a un animal control sano sometido a ciclos luz/oscuridad (12 horas de luz/12 horas de oscuridad [12:12 L/D]) y oscuridad continua [24 D/D]. Durante los periodos de oscuridad continua el animal muestra un ritmo circadiano de actividad endógena de una duración significativamente menor (\* $P < 0,05$ ) que durante la fase de luz/oscuridad. Análisis estadístico realizado mediante "*Unpaired Test*" y Test de Welch (GraphPad Instat).

Cuando los animales de experimentación, controles sanos, son sometidos a ciclos de iluminación constante (24 L/L), el periodo de actividad circadiana tiende a mostrar valores superiores a las 24 horas (véase **figura 26**). En este caso, el análisis estadístico se hizo mediante "*One-way ANOVA*" con el test posterior de Tukey, también mediante el GraphPad InStat.

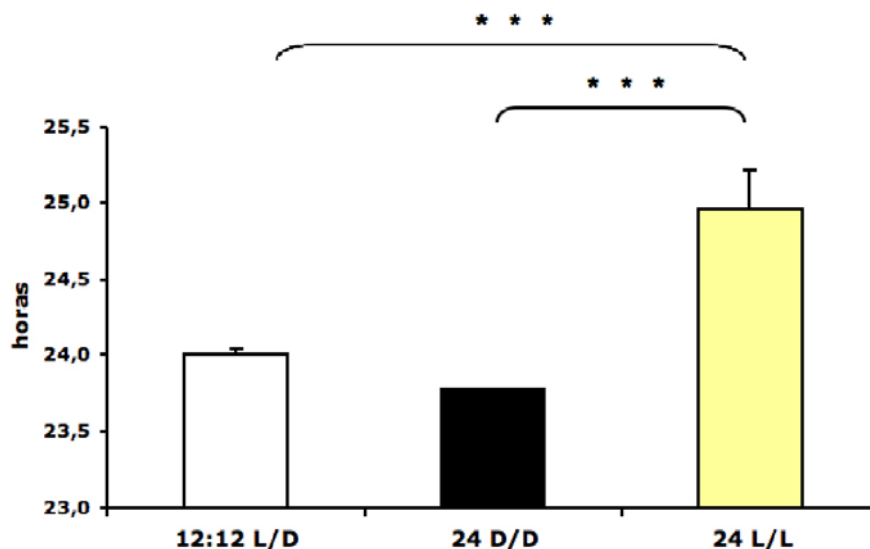
Utilizando el material y métodos descritos más arriba, se diseñaron tres protocolos de experimentación con el fin de conseguir evaluar la actividad circadiana en los modelos de animales ya referidos (C57, rd1, rd10 y hProIns):

- ***Estudio del ritmo endógeno***: Diseñado para ilustrar el ritmo circadiano endógeno de los ratones, independiente de la luz ambiental. En estos experimentos, los animales fueron sometidos a un periodo (~ 1 semana) de iluminación basal 12:12 L/D, seguidos de varias semanas de oscuridad absoluta (24 D/D).
- ***Estudio de la sensibilidad a la luminosidad***: Diseñado para ilustrar la participación de los fotorreceptores clásicos en la regulación de la actividad circadiana. Los animales fueron sometidos a varias semanas de iluminación cíclica 12:12 L/D; cada semana la luminosidad de la fase de luz era modificada con el fin de evaluar la sensibilidad lumínica. Se empezó con fases de luz (L) de gran intensidad ( $L=1400 \text{ cd/m}^2$ ) hasta llegar a fases de luz tenue ( $L=0,1 \text{ cd/m}^2$ ) y oscuridad total (D).
- ***Estudio de cambio de fase***: Diseñado para evaluar la capacidad de los ratones de adaptarse a nuevos ritmos de iluminación/oscuridad. Los animales fueron sometidos a varias semanas de iluminación cíclica 12:12 L/D; cada semana se avanzaba o retrasaba 6 horas el comienzo de la fase de luminosidad.

A



B



**Figura 26: Actividad circadiana en luz constante.**

**A.** Actograma de un ratón control sano obtenido en durante 20 días consecutivos de registro de actividad circadiana. El animal fue mantenido en condiciones de luz y oscuridad [12:12 L/D] durante los 6 primeros días, seguidos de 14 días de iluminación constante [12:12 L/L]. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fue sometido el animal de experimentación. Durante los periodos de luminosidad continua, la actividad motora comienza pasadas las 24 horas, hecho que es fácilmente apreciable en el actograma por el alargamiento relativo del comienzo de la actividad. **B.** Representación gráfica de los valores medios (media ± ESM) del ritmo circadiano del experimento mostrado en A. Se muestran los datos de la figura 25B para comparar. Los animales sometidos a iluminación continua muestran una actividad circadiana de una duración significativamente mayor (\*\*\*P<0,001) que los animales sometidos a ciclos luz/oscuridad y que los animales sometidos a oscuridad continua. Análisis estadístico mediante "One-way ANOVA" con el test posterior de Tukey (GraphPad Instat).





## **RESULTADOS**



## INMUNOHISTOQUÍMICA

### *Estudio inmunohistoquímico de las ipRGC*

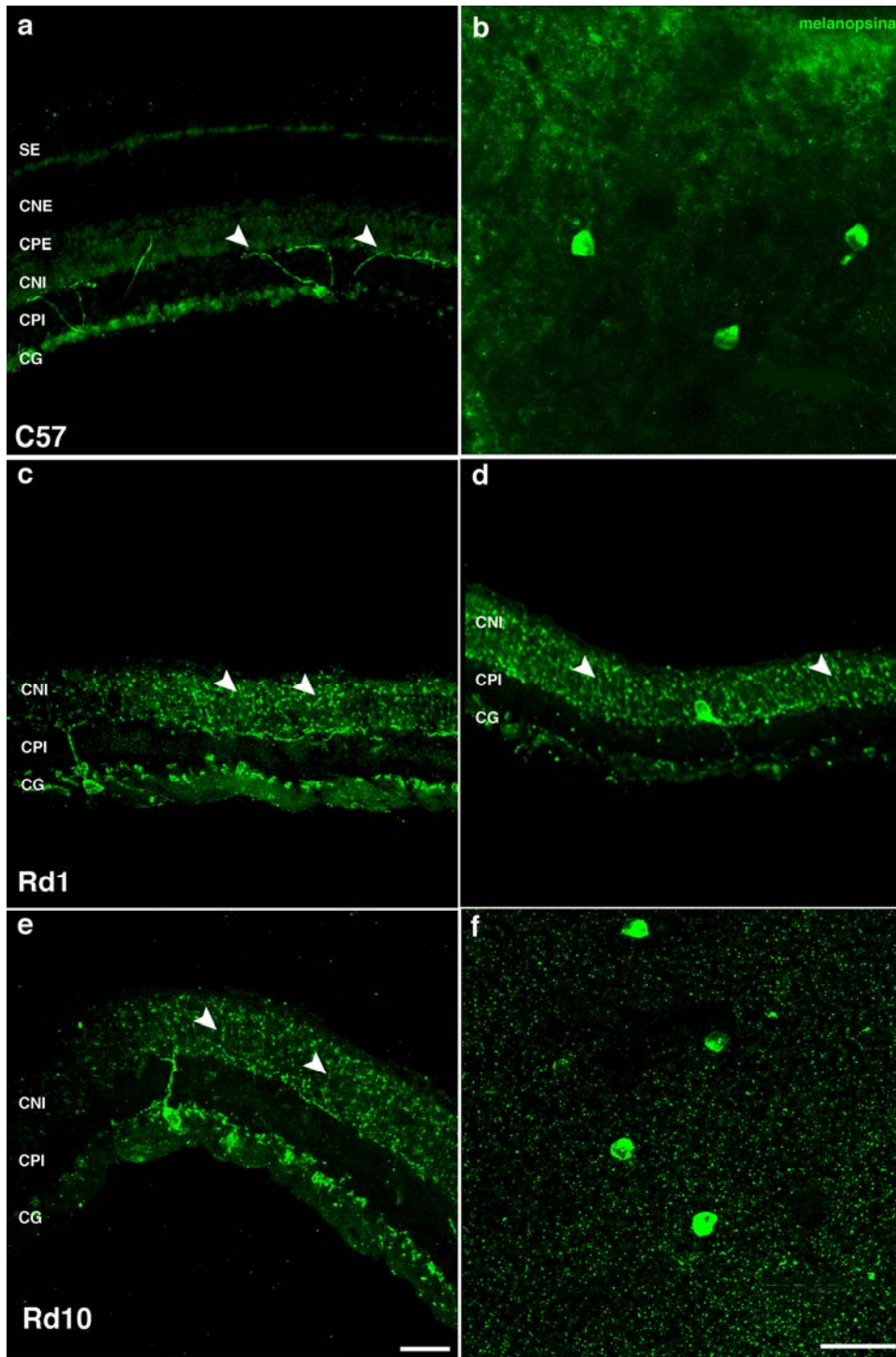
Las ipRGC han sido objeto de amplias investigaciones por diversos de grupos de trabajo, habiéndose documentado recientemente sus características estructurales y funcionales (véase introducción). En esta Tesis Doctoral, y con el propósito de conseguir los objetivos propuestos, se pretende responder a tres preguntas relativas a aspectos estructurales hasta ahora desconocidos de las ipRGC. Primeramente, se estudiará el efecto de la degeneración retiniana en éstas células, y para ello se comparará la morfología de las ipRGC de retinas de animales controles C57 con las ipRGC de retinas de animales rd1 y rd10. En segundo lugar se estudiará si el posible efecto neuroprotector de la proinsulina en la degeneración retiniana afecta en alguna medida a la morfología de las ipRGC en ratones hProIns, y para ello se analizarán comparativamente los marcajes inmunohistoquímicos de las ipRGC de retinas de ratón rd10 con aquellos de ratón hProIns. Por último, se intentará ilustrar la relación de las ipRGC con las células amacrinas dopaminérgicas (DA), que como ya se ha visto en la introducción, podrían jugar un papel importante en ciertas funciones visuales y no-visuales de la retina.

#### ***ipRGC en retinas de ratones distróficos rd1 y rd10***

Las ipRGC se marcaron con anticuerpo contra la melanopsina (ver material y métodos). Se hicieron marcajes en retina de animales C57 adultos, tanto en cortes sagitales como en retinas en plano (**figuras 27a y 27b**). Como ya se ha mencionado,

las ipRGC constituyen un porcentaje relativamente bajo de las células ganglionares de la retina de ratón (~1-3%) y sus dendritas, originadas en escasos troncos dendríticos, abarcan un gran área de la retina. Las prolongaciones dendríticas de las ipRGC estratifican fundamentalmente en la parte más exterior de la capa plexiforme interna (**figura 27a**, flechas blancas).

En ratones rd de considerable edad ( $\geq 200$  días), la retina se encuentra en avanzado estado de degeneración y ha sufrido severas modificaciones estructurales (véase introducción). En este sentido, los cambios estructurales de la retina también afectan a las ipRGC. Las retinas de los animales rd (rd1 y rd10) de 200 días de edad ya no presentan segmentos externos de fotorreceptores, ni es posible observar la capa nuclear externa, ni siquiera la capa plexiforme externa. Sin embargo su retina interna (capa nuclear interna, capa plexiforme interna y capa ganglionar) mantienen un aspecto relativamente "normal", al menos en cuanto a la apariencia de sus capas nucleares y plexiformes. Los cambios sufridos en la retina interna de los animales rd por las ipRGC consisten fundamentalmente en la aparición de numerosas prolongaciones finas que partiendo de sus dendritas se adentran en la capa nuclear interna (**figura 27c** y **figura 27d**, flechas blancas). En la **figura 27d** se muestra una ipRGC desplazada, fenómeno nada inusual en las células de la retina. Es importante destacar que, aunque las ipRGC sufran cambios morfológicos en sus prolongaciones, su densidad celular no varía con el avance del proceso degenerativo. Las imágenes de las **figura 27b** y **27f** muestran un similar número de células de las ipRGC en ratones controles C57 y rd10.



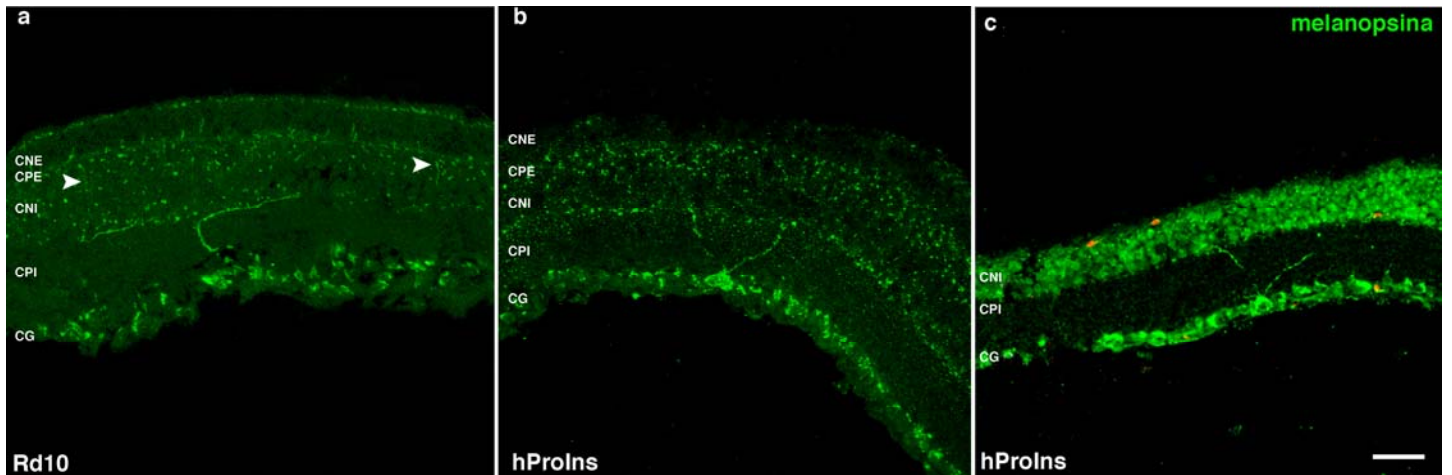
**Figura 27: Patrón de inmunorreactividad contra melanopsina en la retina de ratones controles sanos y distróficos.**

Marcaje de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles con un anticuerpo policlonal contra la melanopsina. La inmunolocalización de melanopsina está indicada con color verde (anticuerpo secundario conjugado con cyanina Cy2). Se muestran cortes sagitales de retina de ratones de 200 días de edad, correspondientes a controles C57 (a), ratón rd1 (c, d), y ratón rd10 (e). También se muestran tinciones en plano de retina de ratón control C57 (b) y de ratón rd10 (f) de 200 días de edad. Abreviaturas: segmento externo (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG) Barra de calibración = 40  $\mu$ m; misma calibración para las figuras b y f, y para las figuras a, c, d, y e.

### ***ipRGC en retinas de ratón hProIns***

Con el fin de ilustrar el posible efecto de la proinsulina sobre la morfología de las ipRGC en ratones con degeneración retiniana y ratones con sobreexpresión de proinsulina se compararon retinas de ratones rd10 y ratones hProIns. La comparación se hizo en dos estadios: a los 40 días de edad, cuando la retina del ratón rd10 todavía tiene algunos fotorreceptores, y a los 200 días de edad, cuando la degeneración de la capa nuclear externa es total. En la retina de ratones rd10 de 40 días de edad, la apariencia de las ipRGC es parecida a la de un ratón control, aunque se empiezan a observar prolongaciones de las dendritas de las ipRGC adentrándose en la capa nuclear interna (**figura 28a**, flechas blancas), como las mostradas en retinas de animales rd1 de edad avanzada. Asimismo, los ratones hProIns a los 40 días también mantienen algunos fotorreceptores, y es posible observar marcaje puntiforme melanopsínico en la capa nuclear interna (**figura 28b**).

A los 200 días de edad, ambos modelos animales (rd10 y hProIns) sólo mantienen aparentemente indemnes las capas nuclear interna, plexiforme interna y ganglionar (**figuras 27e y 28c**). Los animales rd10 muestran prolongaciones de las dendritas de las ipRGCs dentro de la CNI (**figura 27e, flechas blancas**), tal como lo hacen los rd1 de la misma edad. Los animales hProIns, cuyos procesos no son tan claros como en el caso de los ratones rd1 y rd10, muestran un evidente marcaje puntiforme para melanopsina en la CNI (**figura 28c**).



**Figura 28: Patrón de inmunorreactividad contra melanopsina en la retina de ratones distróficos y ratones con sobre-expresión de proinsulina.**

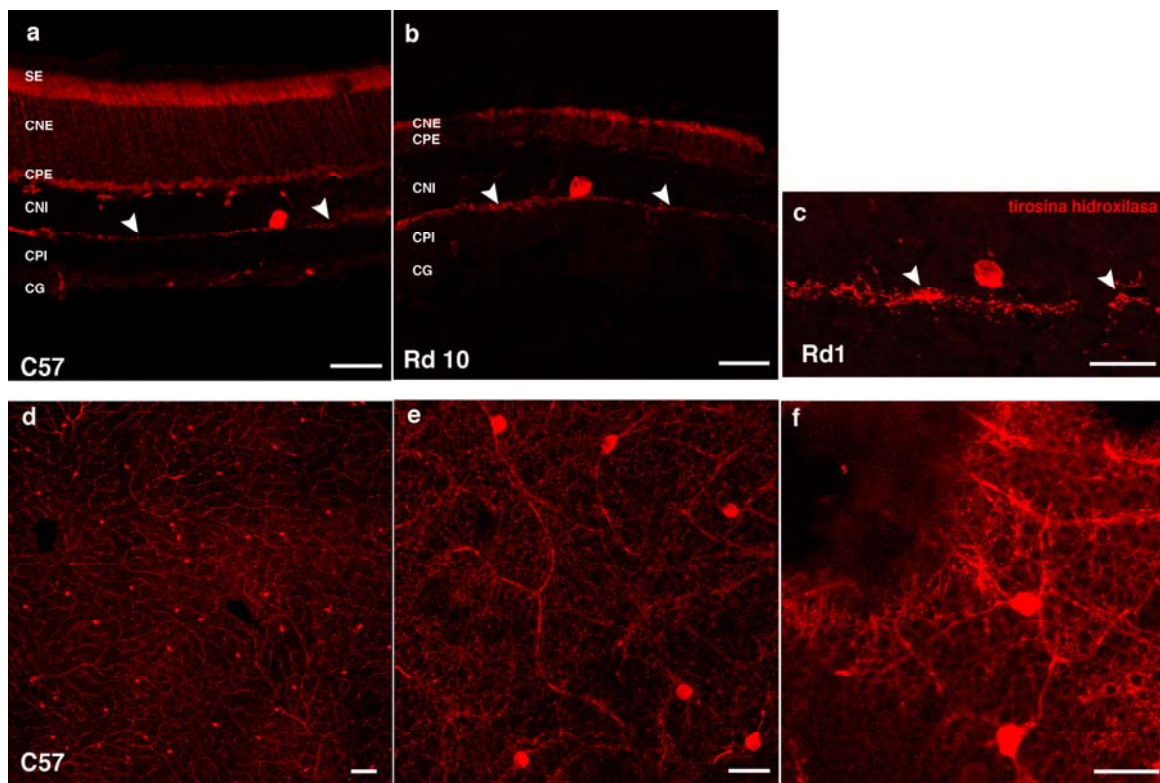
Marcaje de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles con un anticuerpo policlonal contra la melanopsina. Se muestra la inmunolocalización de melanopsina en color verde (anticuerpo secundario conjugado con cyanina Cy2). Se muestran cortes sagitales de retina de ratón rd10 (a) y de ratón transgénico hProIns, ambos de 40 días de edad (b). También se muestra un corte sagital de retina de ratón hProIns de 200 días de edad (c). Abreviaturas: capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG). Barra de calibración = 40  $\mu$ m.

### ***Células Amacrinas Dopaminérgicas (DA)***

El marcaje selectivo de las células amacrinas dopaminérgicas (DA) ha sido posible gracias al uso de anticuerpos específicos contra la tiroxina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de dopamina por las DA. Como ya se ha mencionado anteriormente, las células amacrinas dopaminérgicas desarrollarían importantes funciones visuales en la retina de los vertebrados. Estas células presentan su soma situado en la parte más interna de la capa nuclear interna, y sus dendritas forman un plexo denso en la parte más externa de la capa plexiforme interna (**figura 29a**, flechas blancas). Las células DA conforman el 10% del total de las células amacrinas (Kramer *et al.*, 1971), pero gracias al extenso plexo de prolongaciones abarcan la totalidad de la retina. Las **figuras 29d, 29e, y 29f** muestran tinciones en plano de células amacrinas



dopaminérgicas e ilustran tanto la densidad de las DA como la estructura del plexo que conforman. Las células amacrinas dopaminérgicas parecen no sufrir alteraciones estructurales significativas en retinas distróficas, tanto en ratones rd1 como en rd10 (**figuras 29b, 29c**), a pesar de los profundos cambios sufridos a nivel celular por otras células de la retina interna (Marc *et al.*, 2003). Las prolongaciones dendríticas de las DA siguen estratificando en la porción más externa de la CPI (**figura 29b, 29c**, flechas blancas) tanto en animales controles sanos como distróficos.



**Figura 29: Patrón de inmunorreactividad contra tirosina hidroxilasa en la retina de ratón.**

Marcaje de células amacrinas dopaminérgicas con un anticuerpo monoclonal contra la tirosina hidroxilasa (TH). La inmunolocalización de TH está indicada con color rojo (anticuerpo secundario conjugado con cyanina Cy3). Se muestran cortes sagitales de retina de ratón control C57 de 200 días de edad (**a**), ratón rd10 de 40 días de edad (**b**), y ratón rd1 de 200 días de edad (**c**). También se muestran tinciones en plano de retina de ratón C57 de 200 días de edad a diferentes escalas (**d, e, f**). Se aprecia un tenue marcaje inespecífico de los fotorreceptores en las figuras a y b. Abreviaturas: segmento externo (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG). Barra de calibración = 40  $\mu$ m.

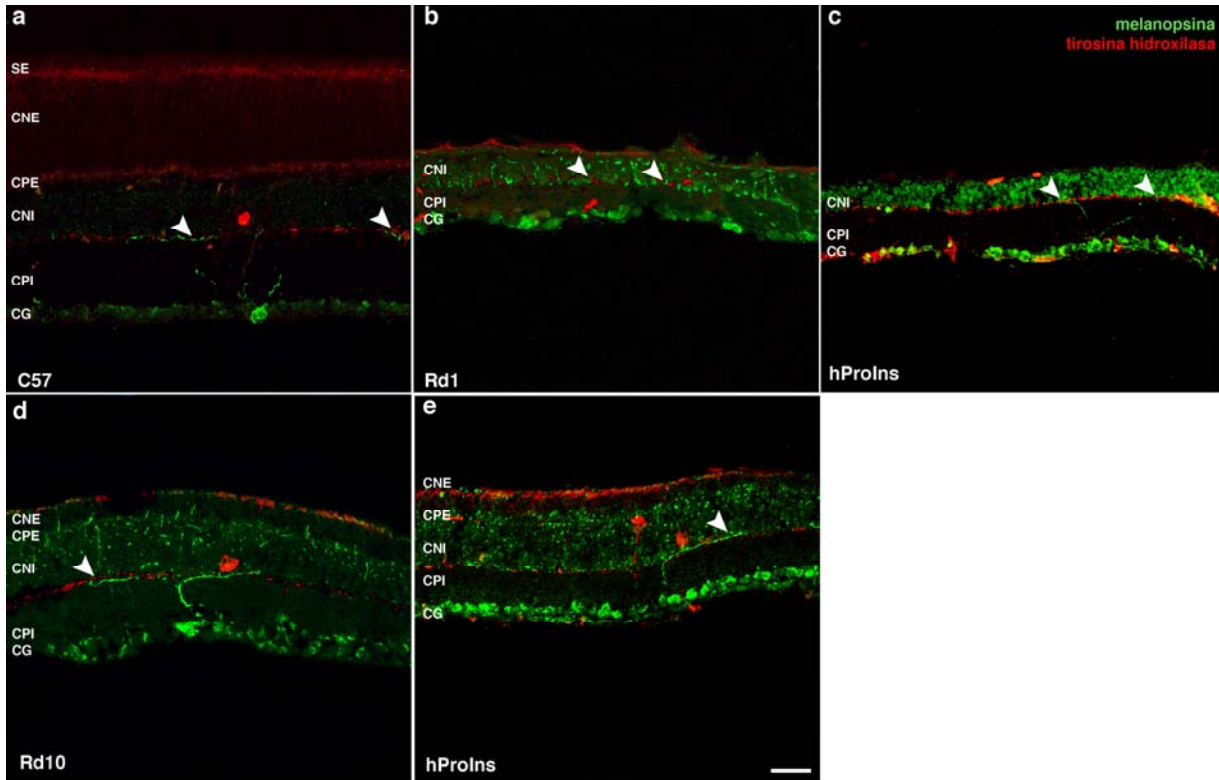
### ***Relación de las ipRGCs con las DA***

Las dendritas de las ipRGC estratifican al mismo nivel que las dendritas de las células amacrinas dopaminérgicas (DA). Como se ha mencionado anteriormente, las DA son capaces de liberar dopamina de forma cíclica, siguiendo un ritmo circadiano; si bien, se ha demostrado que es el estímulo lumínico el que induce la liberación de dopamina por las DA. Por dicho motivo planteamos explorar si ambas células presentan conexiones entre sí, que permita explicar su posible comunicación funcional. En un intento de ilustrar tal conexión, se llevaron a cabo dobles tinciones de cortes de retina donde se marcaron las ipRGC y las DA en ratones control, rd1, rd10 y hProIns.

En los ratones control C57, las dendritas de las ipRGC y las dendritas de las DA estratifican exactamente al mismo nivel, es decir, en la parte más externa de la capa plexiforme interna. De esta manera, al marcar ambos tipos celulares, observamos una superposición de sus dendritas (**figura 30a**, flechas blancas). También se procedió a realizar el doble marcaje de ipRGC y DA en ratones rd1, con el fin de ilustrar el posible efecto de la degeneración retiniana en la relación de ambas células. Tal y como se ha mostrado en la figura 27, las dendritas de las ipRGC del rd1 de avanzada edad se adentran a la CNI, y hasta parecen estratificarse en la parte más externa de la CNI. Por el contrario, las dendritas de las DA de los ratones rd1 mantienen su nivel de estratificación limitado al estrato más externo de la CPI. Como se aprecia en los dobles marcajes (**figura 30b**, flechas blancas), la superposición de los procesos dendríticos de las ipRGC y de las DA son escasas en estas retinas.

También se llevó a cabo una doble tinción en retina de ratones rd10 y hProIns de 40 días de edad, con la intención de ilustrar el posible efecto neuroprotector de la proinsulina sobre las conexiones entre las ipRGC y las DA en ratones de edad temprana. La tinción de ambos tipos celulares en estos animales muestran unos resultados similares a los ya mostrados, donde se puede apreciar claramente la superposición de las dendritas de las ipRGC con las dendritas de las DA (**figuras 30d y 30e**, flechas blancas). Si bien la retina de ratón rd10 y hProIns de 40 días de edad empieza a presentar extensiones de las dendritas de las ipRGC adentrándose a la CNI, dichos procesos no son seguidos por las prolongaciones dendríticas de las DA.

Por último, en un intento de ilustrar si el posible efecto neuroprotector de la proinsulina afectaba a la estructura de las ipRGC y DA en ratones con degeneración de edad avanzada, se llevó a cabo la tinción doble (melanopsina – TH) en retina de ratones hProIns de 200 días de edad. En este caso también se puede apreciar la superposición de dendritas de ambos tipos celulares (**figura 30c**, flechas blancas), sin que las prolongaciones de las dendritas de las ipRGC se acompañen de un crecimiento de las prolongaciones dendríticas de las DA en la CNI.

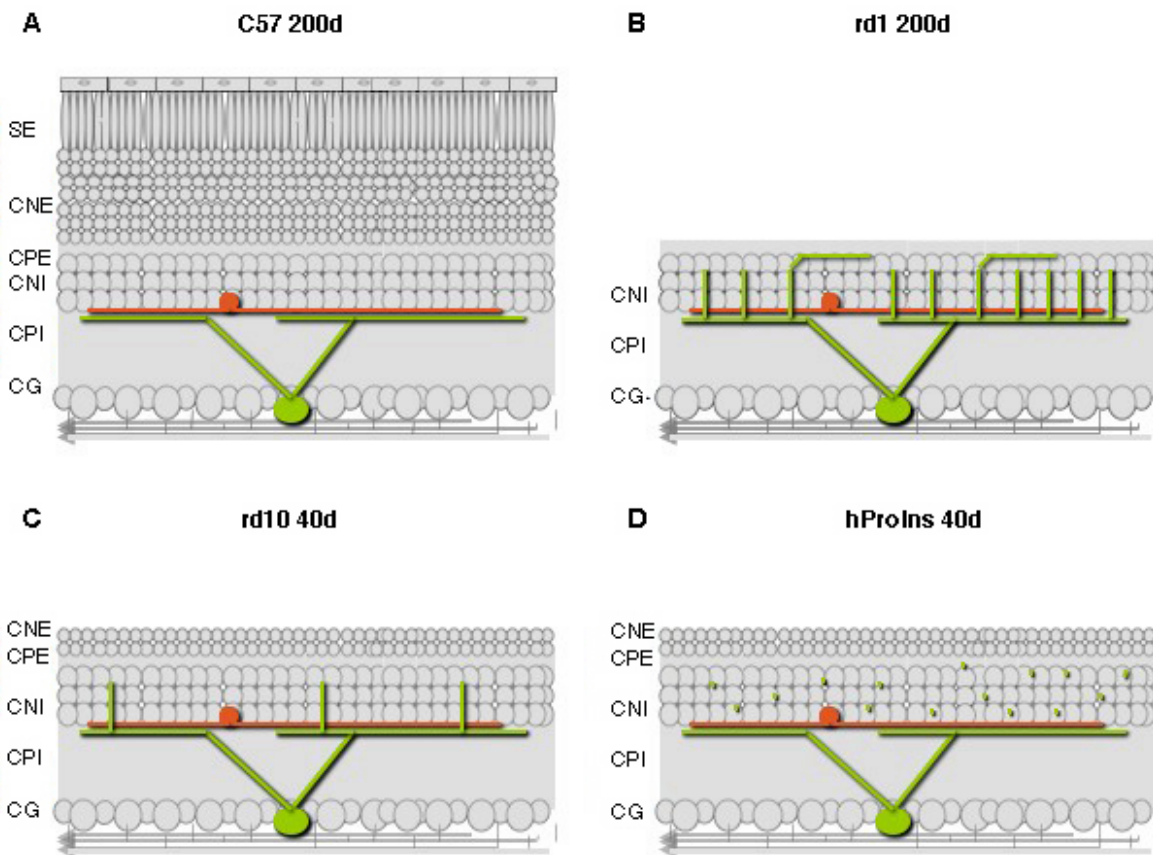


**Figura 30: Patrón de doble inmunoreactividad contra melanopsina y tirosina hidroxilasa en la retina de ratón.**

Doble marcaje de células amacrinas dopaminérgicas (DA) y células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). Las DA están marcadas con un anticuerpo monoclonal contra la tirosina hidroxilasa (TH). La inmunolocalización de TH está indicada con color rojo (anticuerpo secundario conjugado con cyanina Cy3). Se aprecia un tenue marcaje inespecífico de los fotorreceptores en las figuras a, d y e, y de vasos sanguíneos en las figuras b, c y e. Las ipRGC están marcadas con un anticuerpo policlonal contra la melanopsina. La inmunolocalización de la melanopsina está indicada con color verde (anticuerpo secundario conjugado con cyanina Cy2). Se muestran cortes sagitales de retina de ratón control C57 (a), ratón rd1 (b) y ratón transgénico hProIns (c) de 200 días de edad, y ratón rd10 (d) y ratón transgénico hProIns (e) de 40 días de edad. Abreviaturas: segmento externo (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG). Barra de calibración = 40  $\mu$ m.

Se muestran a continuación una serie de esquemas ilustrativos del patrón de distribución de la melanopsina y de la tirosina hidroxilasa en la retina de ratón control y ratón con degeneración (figura 31). En ratón control, tanto la gran mayoría de prolongaciones de las ipRGC como las prolongaciones de las DA estratifican en la parte más externa de la CPI (figura 31a), mientras que en los ratones distróficos las ipRGC muestran procesos dendríticos en la CNI. En las retinas de ratones distróficos,

las dendritas de las DA mantienen su estratificación a nivel del límite externo de la CPI. En ratones rd1 de 200 días de edad, las ipRGC expanden sus dendritas a la CNI hasta llegar a estratificar en su parte más externa (**figura 31b**). En ratones rd10 de 40 días las ipRGC han empezado a proyectar sus dendritas hacia la CNI, aunque en menor grado que en el caso anterior (**figura 31c**). Por último, en ratones hProIns de 40 días, no se aprecian procesos dendríticos enteros de ipRGC en la CNI, aunque sí existe un marcaje puntiforme (**figura 31d**).



**Figura 31: Alteración estructural en las ipRGC de ratones rd**

Esquemas representativos de la estructura de las ipRGCs y DA en ratones C57 (A), rd1 de 200 días (B), rd10 de 40 días (C), y hProIns (D) de 40 días. Las ipRGCs están dibujadas en verde, y las DA en rojo. Abreviaturas: segmento externo (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CG).

## TEST OPTOMOTOR: *Estudio conductual de la vía visual.*

### ***Diseño experimental y aplicación del test optomotor***

Para la realización de los experimentos que se describen a continuación se puso a punto la técnica de evaluación de comportamiento visual conocida como ***Test Optomotor***. Dicho test fue diseñado para evaluar la funcionalidad del reflejo optoquinético del ratón. Como ya se ha mencionado en la introducción, éste reflejo se origina en la retina, que a través de sus células ganglionares proyecta al núcleo del tracto óptico (NOT), situado en el pretecto. El NOT recibe la información visual directamente de las células ganglionares de la retina, con lo que, sobreentendiendo que las funciones cerebrales se desarrollan correctamente, los resultados del *test* optomotor son buenos indicadores del estado funcional de la vía visual de la retina del ratón. Así pues, el *test* optomotor se plantea como una prueba de comportamiento animal adecuada para evaluar el estado de la función visual de la retina en ratones que sufren degeneraciones retinianas.

Basados en la literatura y utilizando el tambor giratorio descrito en el apartado de material y métodos, se escogieron cuatro velocidades angulares ( $\omega$ ) distintas (0.28, 0.33, 0.5, y 0.66 ciclos/seg.). En una serie de experimentos preliminares se realizaron test optomotores en ratones C57 adultos, con el fin de poder documentar la mayor o menor sensibilidad de los animales por una u otra  $\omega$  (véase material y métodos, **figura**

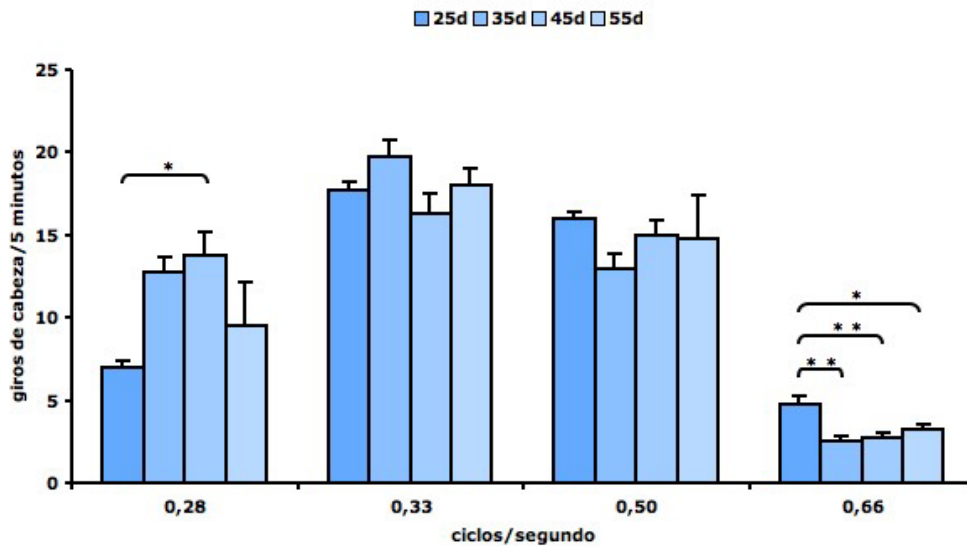
22). Con ello se demostró que las  $\omega$  del estímulo visual que determinaban una mayor respuesta en el reflejo optoquinético del ratón eran las de 0,33 y 0,5 ciclos/seg., y la  $\omega$  que menos respuesta motora inducía en el ratón era la de 0,66 ciclos/seg.

Se diseñaron los experimentos del *test* optomotor teniendo en cuenta que las degeneraciones retinianas sufridas por los ratones rd son de aparición relativamente precoz y siguen un curso temporal considerablemente rápido, con lo que los resultados del *test* sufrirían modificaciones a lo largo del tiempo en el que se desarrolla la degeneración de los fotorreceptores. Con el fin de evaluar funcionalmente la degeneración retiniana en los animales rd, se escogieron animales de cuatro edades distintas: 25, 35, 45 y 55 días de desarrollo postnatal. A dichas edades los ratones fueron sometidos al *test* optomotor, y sus resultados fueron comparados entre sí y con ratones control. El análisis estadístico utilizado para esta comparación, en todos los experimentos de *test* optomotor, fue el “*One-way ANOVA*” con el *test* posterior de Tukey.

### ***Test Opomotor en ratones C57***

Se llevaron a cabo experimentos mediante la aplicación del *test* optomotor en ratones C57 de 25, 35, 45 y 55 días, sometiéndoles a estímulos lumínicos mediante el tambor de rotación con velocidades angulares de 0,28, 0,33, 0,5 y 0,66 ciclos/seg., analizándose comparativamente los resultados obtenidos a las distintas edades (**figura 32**). Los ratones control muestran diferencias significativa entre las edades de 25 y 45 días para la  $\omega$  de 0,28 ciclos/seg. También se aprecian diferencias significativas para la

$\omega$  de 0,66 ciclos/seg., fundamentalmente entre la edad de 25 días y el resto de edades; a nuestro juicio estas diferencias no son de gran significación funcional, ya que como se ha comentado, en las pruebas preliminares la  $\omega$  de 0,66 ciclos/seg. no inducía el reflejo optoquinético con efectividad. En las dos velocidades angulares para las que los ratones muestran una mayor sensibilidad, no se encontraron diferencias significativas entre edades.



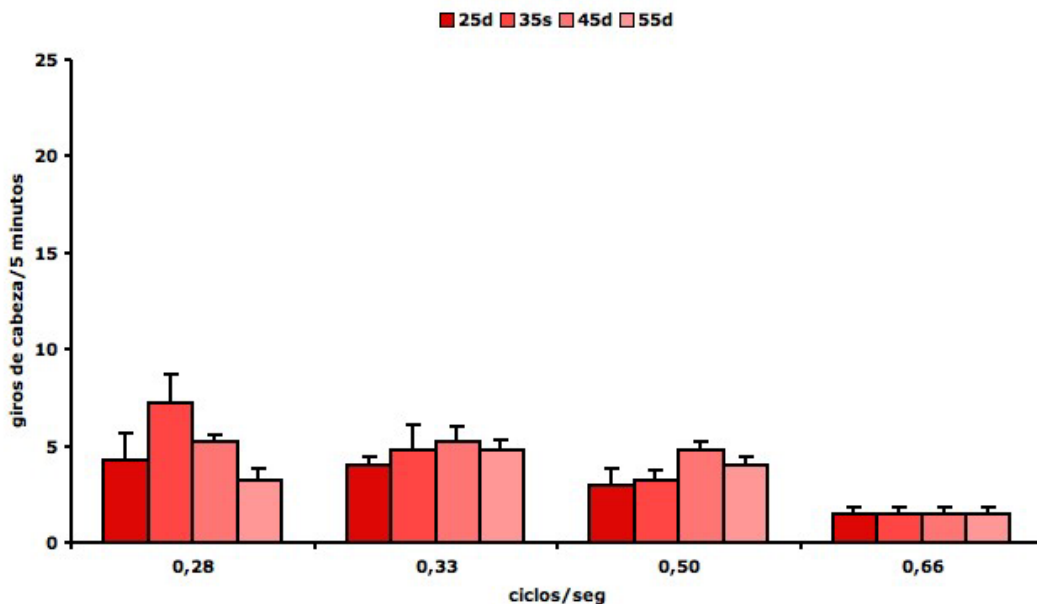
**Figura 32: Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en controles sanos.**

Resultados del *test* optomotor practicado en ratones C57 de 25, 35, 45 y 55 días de edad. Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales por cada grupo de edad. Como se puede apreciar, los ratones C57 tienen una buena respuesta al *test* optomotor, especialmente para velocidades angulares de 0,33 y 0,50 cps. Se muestran las diferencias significativas entre edades en cada velocidad angular, las cuales se han analizado, en este y en los demás experimentos de *test* optomotor, mediante *one-way ANOVA* con el *test* posterior de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



### ***Test Opomotor en ratones Rd1***

Se realizaron *test* optomores a ratones rd1 de 25, 35, 45 y 55 días a velocidades angulares de 0.28, 0.33, 0.5 y 0.66 cps, y se compararon los resultados entre edades. Como se observa en la **figura 33**, la respuesta al *test* optomotor por parte de los ratones rd1 es prácticamente nula en todas las edades y en todas las  $\omega$ . No se apreciaron diferencias significativas entre los distintos animales a las diferentes velocidades.

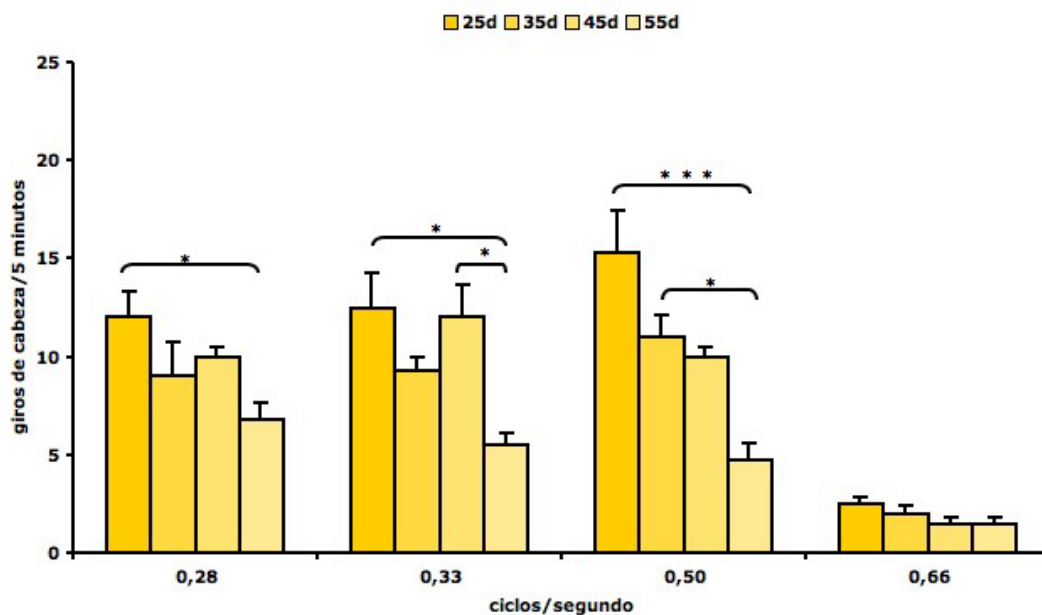


**Figura 33: Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en animales distróficos rd1.**

Resultados del test optomotor practicado en ratones rd1 de 25, 35, 45 y 55 días de edad. Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales por cada grupo de edad. Como se puede apreciar, los ratones rd1 tienen una respuesta extremadamente pobre al *test* optomotor para todas las edades y  $\omega$  estudiadas, sin que se hayan encontrado diferencias significativas entre los distintos grupos.

### Test Opomotor en ratones Rd10

Se realizaron *test* optomores a ratones rd10 de 25, 35, 45 y 55 días de edad a velocidades angulares de 0.28, 0.33, 0.5 y 0.66 cps, y se compararon los resultados entre grupos (**figura 34**), hallando diferencias significativas entre ciertos grupos. Para  $\omega$  de 0,28 y 0,33 ciclos/seg. se encontraron diferencias significativas entre las edades de 25 y 55 días ( $p < 0,05$ ). Para  $\omega = 0,33$  ciclos/seg., también se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las edades de 45 y 55 días. Para  $\omega = 0,5$  ciclos/seg. se encontraron diferencias muy significativas entre los animales de 25 días de edad y los de 55 días de edad ( $p < 0,001$ ), y también diferencias significativas entre los grupos de 35 y 55 días de edad ( $P < 0,05$ ).



**Figura 34: Función visual durante el desarrollo postnatal temprano en animales distróficos rd10.**

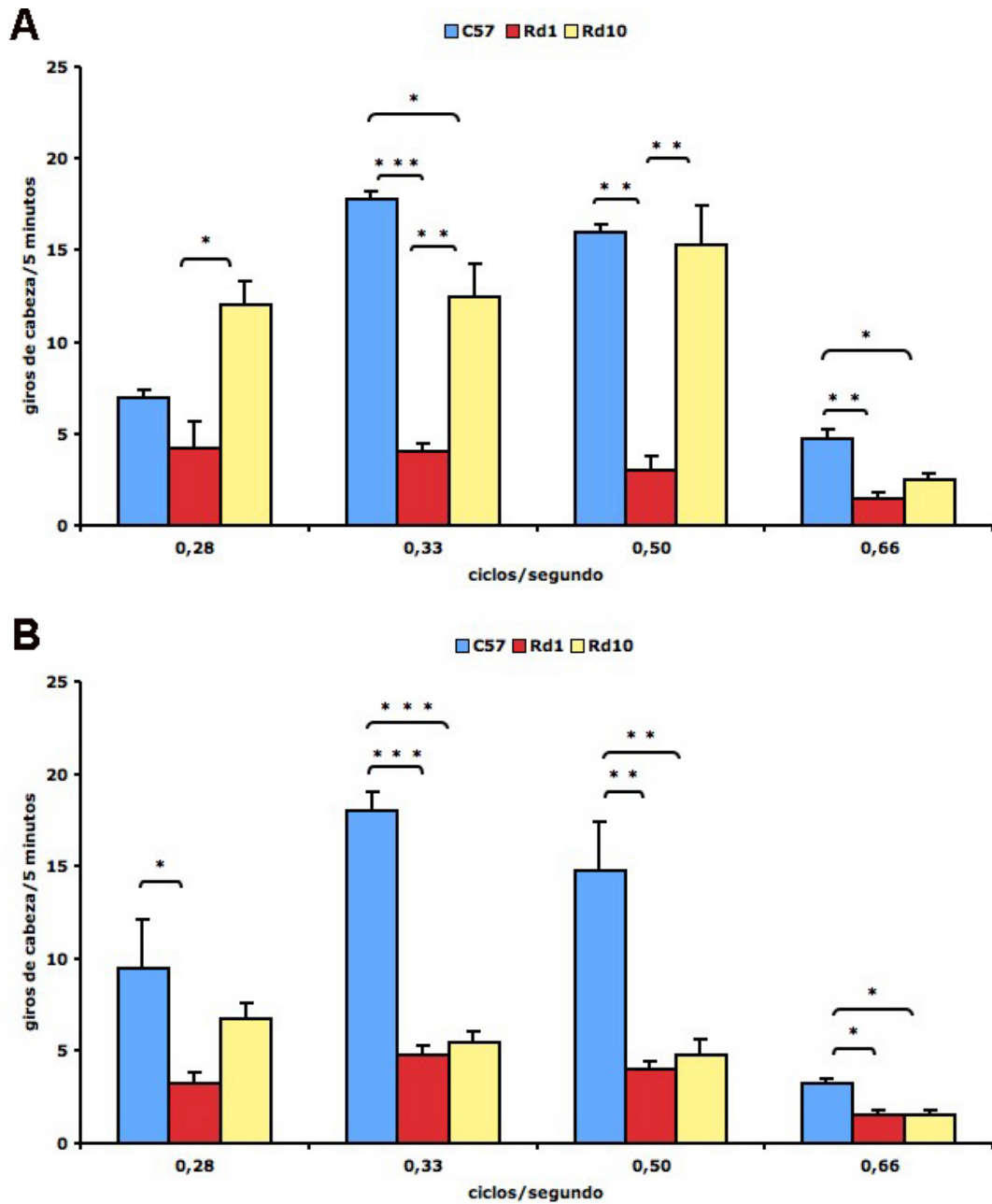
Resultados del *test* optomotor practicado en ratones rd10 de 25, 35, 45 y 55 días de edad. Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales por cada grupo de edad. Como se puede apreciar, los ratones rd10 disminuyen la respuesta al *test* optomotor con la progresión de la degeneración, mostrando una buena respuesta a los 25 días de edad que va mermando paulatinamente. Se muestran las diferencias significativas entre edades en cada velocidad angular (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

El análisis de los resultados obtenidos en ratones rd10 permite intuir un patrón temporal-dependiente de respuesta en el caso de este modelo animal; en todas las velocidades angulares, la respuesta mayor ocurre a los 25 días, y la respuesta menor a los 55 días, ilustrando así la degeneración progresiva de la retina.

### ***Comparación de resultados entre C57, Rd1, y Rd10***

Con el fin de poder ilustrar de forma clara la degeneración progresiva detectada en los ratones rd10, se compararon los resultados obtenidos en los *test* optomotores de los ratones control, rd1 y rd10 a los 25 días (**figura 35A**), y a los 55 días de edad (**figura 35B**). Los ratones de 25 días de edad muestran diferencias significativas entre animales rd1 y rd10 para  $\omega$  de 0,28 ciclos/seg. ( $p < 0,05$ ). A velocidades angulares de 0,33 ciclos/seg., encontramos diferencias muy significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,001$ ) y menos significativas entre animales C57 y rd10 ( $p < 0,05$ ). Para velocidades angulares de 0,5 ciclos/seg., encontramos diferencias significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,01$ ) y entre animales rd1 y rd10 ( $p < 0,05$ ). Por último, para velocidades angulares de 0,66 ciclos/seg., encontramos diferencias significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,01$ ) y menos significativas entre animales C57 y rd10 ( $p < 0,05$ ).

En general, podemos indicar que a los 25 días de edad, los resultados obtenidos en los ratones C57 y rd10 son similares. Esto es algo lógico si tenemos en cuenta que la degeneración de fotorreceptores en el caso de los ratones rd10, empieza a los 20 días de edad y no termina hasta los 40 días de edad. Así, se puede suponer que a los 25 días de edad, los ratones rd10 aun conservan la mayoría de sus fotorreceptores, lo que justifica su respuesta normal al *test* optomotor.



**Figura 35: Comparación de la función visual en animales controles, rd1 y rd10.**

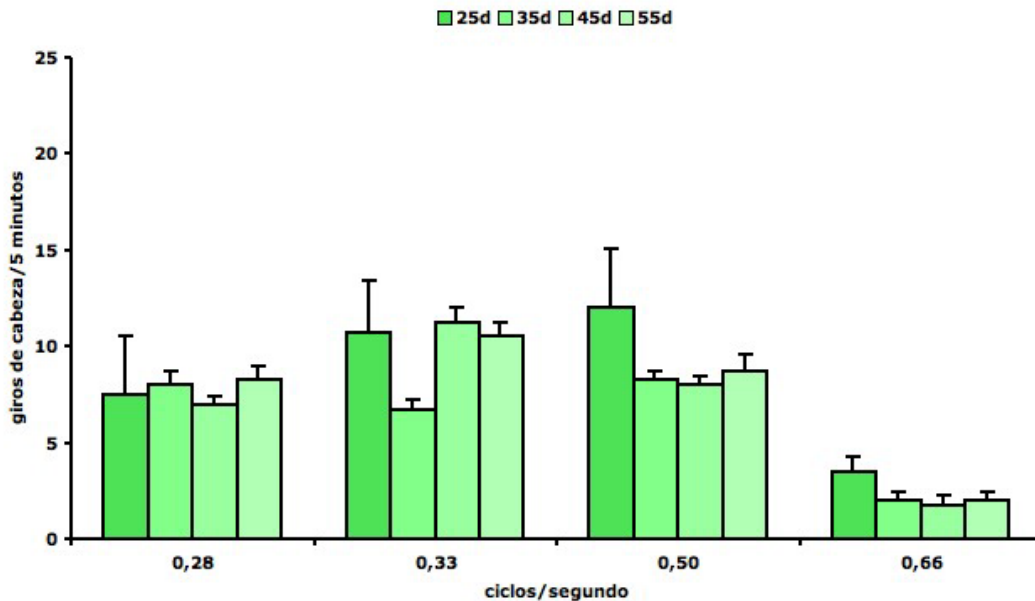
Comparación de resultados del test optomotor en ratones C57, rd1 y rd10 de 25 días (A) y de 55 días de edad (B). Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales por cada modelo animal y grupo de edad. Como se puede apreciar, los ratones rd10 muestran valores similares a los ratones C57 para el grupo de animales de 25 días de edad (A), mientras que a los 55 días de edad (B), los valores obtenidos en los ratones rd10 son similares a los resultados de los ratones rd1. Se muestran las diferencias significativas (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

A los 55 días de edad, también se encontraron diferencias entre los distintos modelos animales. Para  $\omega = 0,28$  ciclos/seg. se encontraron diferencias significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,05$ ). Para  $\omega = 0,33$  ciclos/seg. las diferencias fueron muy significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,001$ ), y entre C57 y rd10 ( $p < 0,001$ ). A velocidades angulares de 0,5 ciclos/seg. se observaron diferencias significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,01$ ), y entre C57 y rd10 ( $p < 0,01$ ). Y por último, para velocidades de 0,66 ciclos/seg. se observaron diferencias significativas entre C57 y rd1 ( $p < 0,05$ ), y entre C57 y rd10 ( $p < 0,05$ ).

De los experimentos expuestos, podemos resumir que los resultados obtenidos mediante la aplicación del *test* optomotor muestran que los ratones rd10, a los 55 días de edad, se comportan como los ratones rd1 de su misma edad. Esos resultados concuerdan con datos de registros electrofisiológicos obtenidos en nuestro laboratorio en ratones rd10 (Barhoum, 2006). La pérdida de fotorreceptores en los ratones rd10 conlleva la disfunción de la vía visual, objetivada por técnicas de conducta visual.

### ***Test Opomotor en ratones hProIns***

Tras la realización de los experimentos de evaluación de la función visual mediante aplicación del *test* optomotor en animales C57, y después de haber estudiado la respuesta optoquinética en ratones rd1 y rd10, nos propusimos evaluar el reflejo optoquinético de ratones hProIns. Se utilizaron los mismos grupos de edades y las mismas velocidades angulares utilizados en los otros modelos animales (**figura 36**).



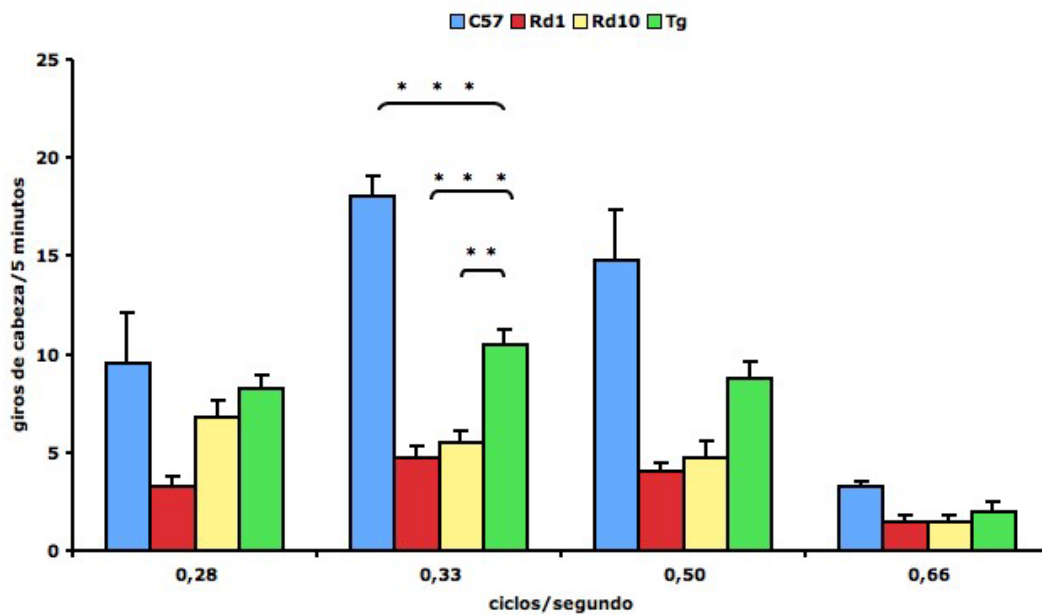
**Figura 36: Función visual en animales transgénicos hProIns.**

Resultados del test optomotor practicado en ratones hProIns de 25, 35, 45 y 55 días de edad. Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales por cada grupo de edad. Como se puede apreciar, los ratones hProIns no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos de edad.

Los resultados obtenidos en ratones hProIns no mostraron diferencias significativas entre las distintas edades ni en cuanto velocidades angulares. Aún y así se llevó a cabo la comparación con los otros modelos animales, C57, rd1 y rd10, a la edad de 55 días (**figura 37**). En este sentido, los ratones hProIns mostraron diferencias significativas en el *test* optomotor para velocidades angulares de 0,33 ciclos/seg. con los ratones C57 y ratones rd1 ( $p < 0,001$ ), así como con los ratones rd10 ( $p < 0,01$ ).

Dado que los ratones hProIns tienen un background similar al ratón rd10, cabría esperar unos resultados similares, al menos durante el proceso degenerativo. El hecho

de que los resultados obtenidos en animales hProIns hayan mostrado diferencias significativas con los ratones rd10 a los 55 días de edad, podría indicar que la vía visual de los ratones hProIns a dicha edad conserva una superior funcionalidad y quizá ello sea debido al efecto neuroprotector de la proinsulina expresada endógenamente en estos animales.



**Figura 37: Comparación de la función visual entre animales transgénicos hProIns y controles, rd1 y rd10.**

Comparación de resultados del *test* optomotor en ratones C57, rd1, rd10 y hProIns de 55 días de edad. Se representan los valores medios (media  $\pm$  ESM) de los resultados obtenidos en grupos de 4 animales. Como se puede apreciar, se produce una mejora de la respuesta al *test* optomotor por parte de los ratones hProIns comparada con los ratones rd10. Se indican las diferencias significativas únicamente de los ratones hProIns con los otros ratones (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## ACTIVIDAD CIRCADIANA: *Estudio conductual de la vía no-visual*

### ***La actividad circadiana***

Con el fin de evaluar el funcionamiento de la vía no visual de la retina, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se puso a punto el **test de actividad circadiana**, el cual ha sido eficazmente utilizado para analizar la funcionalidad de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (Silva *et al.*, 2005; Doyle *et al.*, 2006). Como ya ha sido comentado en la introducción, las ipRGC reciben un input procedente de los fotorreceptores clásicos, a través de las células amacrinas y células bipolares, y al mismo tiempo son capaces de responder directamente a estímulos lumínicos, debido al fotorreceptor (melanopsina) sintetizado intrínsecamente. Gracias a esta opsina, las ipRGCs son capaces de despolarizarse al recibir un estímulo lumínico, aun cuando no reciban input sinápticos de otras células retinianas (Berson *et al.*, 2002; Dacey *et al.*, 2005) por carecer de fotorreceptores.

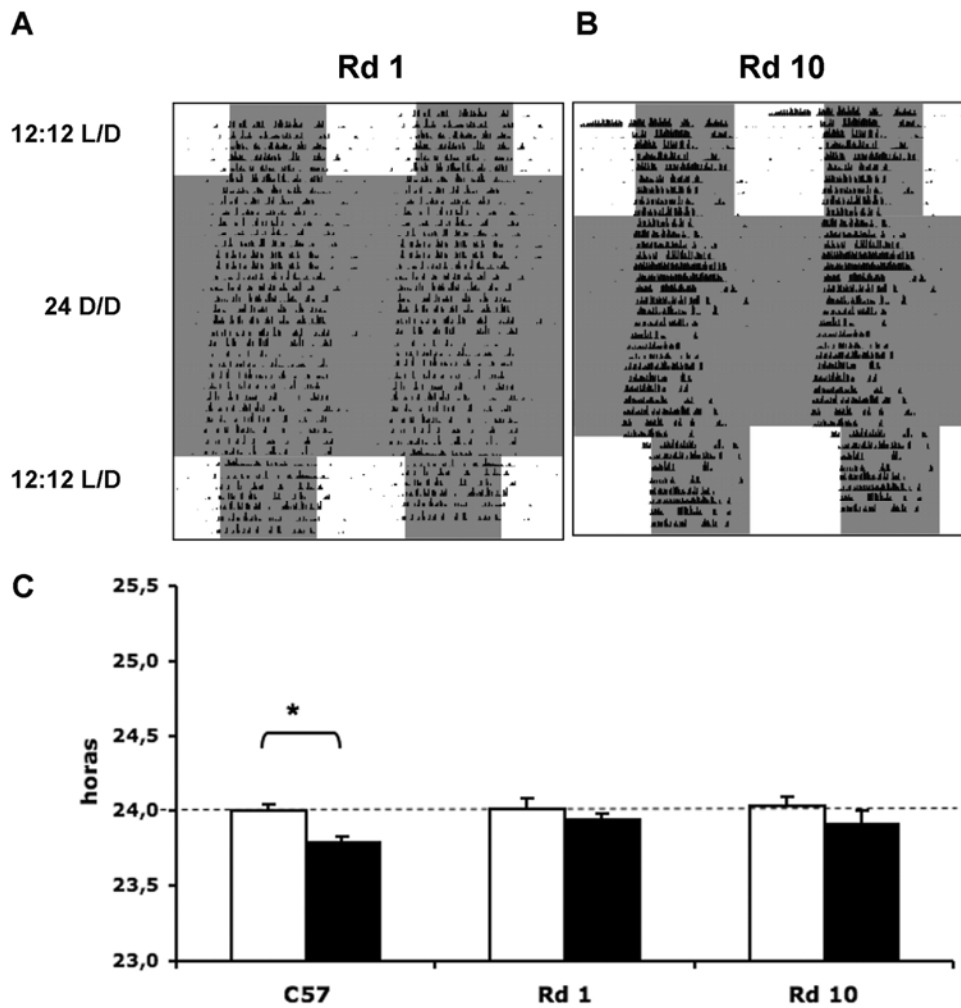
Gracias a la puesta a punto del test de actividad circadiana, se ha conseguido documentar la función de las ipRGC, tanto en ratones controles sanos como en ratones que sufren degeneración retiniana. También se ha intentado demostrar hasta qué punto la proinsulina pudiera afectar la funcionalidad de las ipRGC en los modelos de degeneración. Se diseñaron tres tipos de estudios. Inicialmente se estudió la actividad circadiana en ratones rd1 y rd10 en un intento de evaluar hasta qué punto la pérdida de fotorreceptores puede afectar al ritmo endógeno circadiano de actividad/reposo. Estos



mismos experimentos fueron también realizados en ratones hProIns. En un segundo estudio se evaluó si los cambios de fase en los ciclos luz/oscuridad afectan a los ratones con degeneración retiniana. Un tercer estudio permitió documentar la sensibilidad lumínica de los ratones con degeneración retiniana. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados de la aplicación de los mismos test a animales controles C57 (véase material y métodos, **figura 25 y 26**).

### ***Evaluación del ritmo endógeno de actividad circadiana en ratones rd***

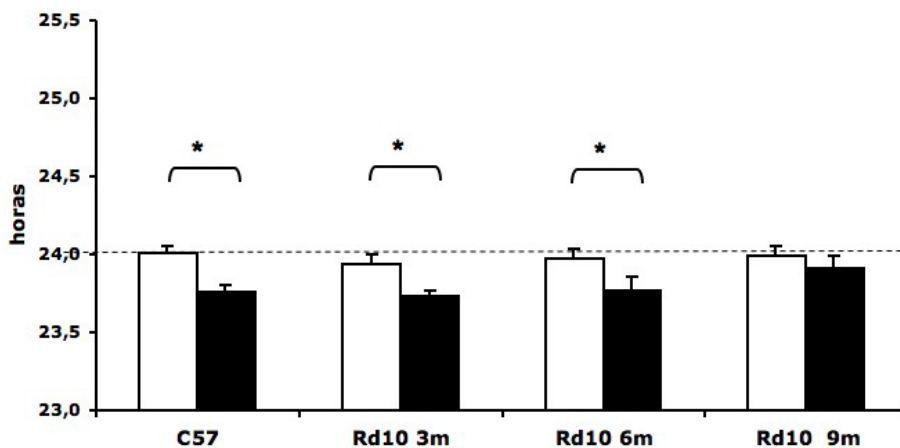
Se evaluó la actividad circadiana de ratones rd1 y rd10 de nueve meses de edad. A dicha edad, el ratón rd1 carece de fotorreceptores clásicos (conos y bastones) y su retina parece sufrir un proceso de desorganización/reorganización avanzado (Marc *et al.*, 2003). Cuando el ratón rd1 de nueve meses se somete a test de actividad circadiana, los resultados muestran que su ritmo de actividad/reposo parece acoplarse al ritmo oscuridad/luz impuesto (**figura 38A**). No obstante, el análisis de los actogramas permite afirmar que su ritmo endógeno, observado en condiciones de oscuridad continua, disminuye su periodo endógeno en menor medida que los controles sanos de la misma edad. El ratón rd10 de 9 meses parece comportarse de forma similar al ratón rd1 de igual edad; se acopla perfectamente al ritmo inducido por la luz, pero su ritmo endógeno parece más largo que el ritmo endógeno del ratón C57 (**figura 38B**). En la **figura 38C** se muestran las diferencias entre los ritmos endógenos y los ritmos inducidos en los ratones controles C57, rd1 y rd10. Los valores muestran diferencias significativas en ratones controles y no significativas en ratones con degeneración retiniana.



**Figura 38: Actitud circadiana en animales distróficos rd1 y rd10.**

**A, B.** Actogramas de ratones rd1 (**A**) y rd10 (**B**) de 9 meses de edad correspondientes a experimentos de actividad circadiana realizados durante 37 días consecutivos de registro. Cada animal fue mantenido inicialmente en condiciones de luz y oscuridad [12:12 L/D] durante los primeros días, seguidos de otros días de oscuridad constante [24 D/D]; a continuación se volvió a mantener a los animales en ritmos luz/oscuridad. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fueron sometidos los animales de experimentación. Durante los periodos de oscuridad los animales distróficos muestran una actividad circadiana con un ritmo endógeno de menos de 24 horas. **C.** Representación gráfica de los valores medios (media  $\pm$  ESM) del ritmo circadiano de los experimentos mostrados en **A** y **B**. Como comparación se muestran los datos correspondientes a controles sanos mostrados en la figura 25B. Al igual que en los animales sanos, durante los periodos de oscuridad continua los animales distróficos muestran un ritmo circadiano de actividad endógena de un periodo menor que durante la fase de luz/oscuridad, aunque la diferencia no es significativa en el caso de los ratones distróficos.

Debido los resultados obtenidos en el experimento anterior, y teniendo en cuenta el carácter temporal-dependiente de la degeneración de la retina de los ratones rd, quisimos profundizar en la caracterización del ritmo endógeno por parte de los ratones rd10 en diferentes fases de su degeneración. De esta forma, repetimos la evaluación del ritmo endógeno en ratones rd10 de 3 meses y 6 meses de edad postnatal. En estas edades, los ratones rd10 ya han perdido todos sus fotorreceptores (Barhoum, 2006), aunque la retina interna aun no ha tenido tiempo de sufrir la remodelación masiva característica de los ratones rd de edades avanzadas. La **figura 39** muestra que los ratones rd10 de 3 y 6 meses se sincronizan perfectamente con el ritmo marcado por la luz en situaciones lumínicas de luz/oscuridad, y que además tienen un ritmo endógeno significativamente menor que el ritmo inducido por la luz, al igual que el ratón C57, y contrariamente al ratón rd10 de 9 meses (análisis estadístico realizado mediante “*Unpaired Test*” y el posterior *Test* de Welch).



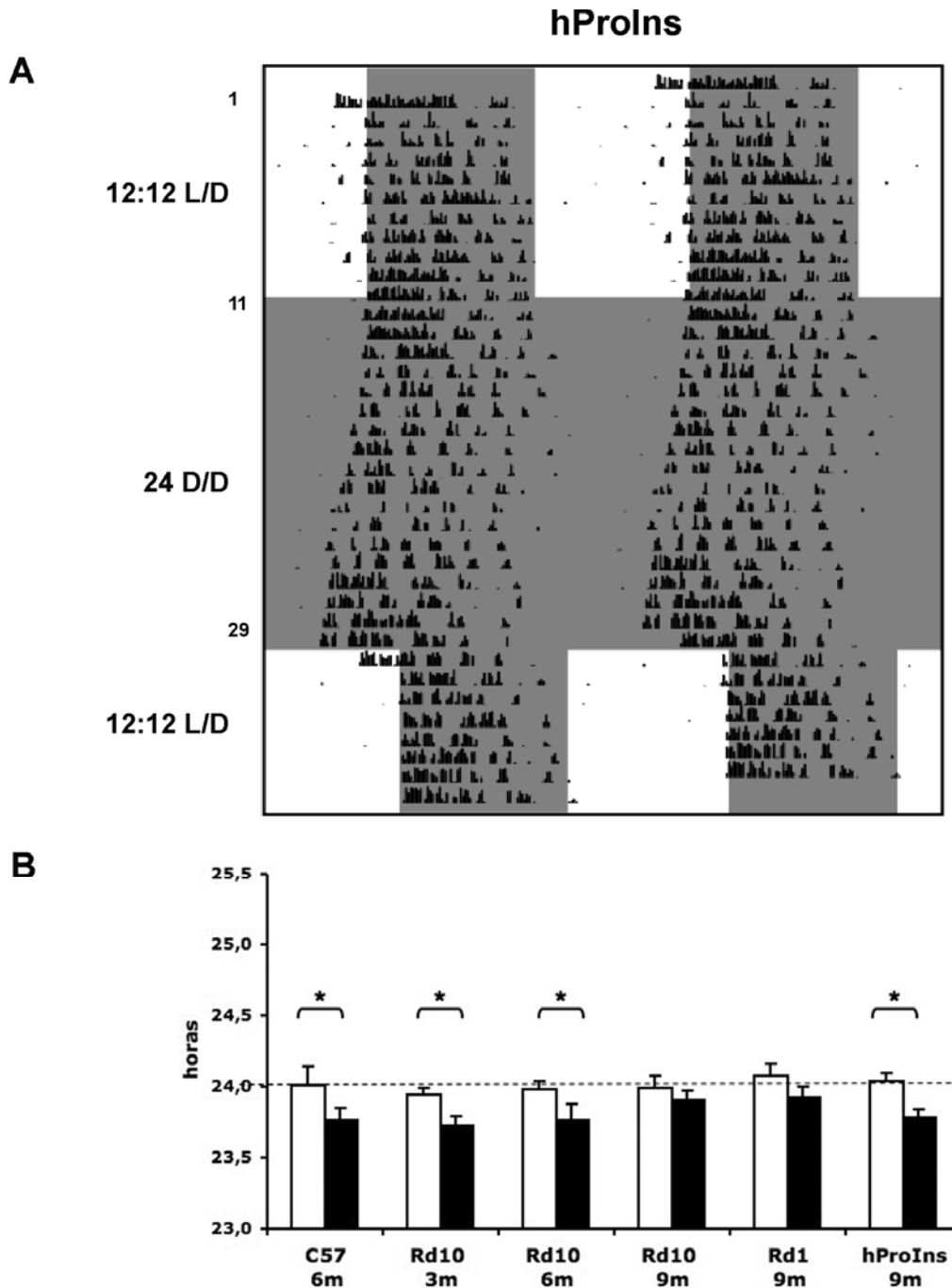
**Figura 39: Actividad circadiana en animales distróficos rd10 de diferentes edades.**

Representación gráfica de los valores medios (media  $\pm$  ESM) del ritmo circadiano de actogramas realizados en ratones rd 10 de 3 (Rd10 3m) y 6 (Rd10 6m) meses de edad. Como comparación se muestran también los datos correspondientes a controles sanos mostrados en la figura 25B (C57) y los datos correspondientes a animales rd 10 de 9 meses de edad (Rd10 9m) mostrados en la figura 38C. Al igual que en los animales sanos, durante los periodos de oscuridad continua los animales distróficos muestran un ritmo circadiano de actividad endógena de una duración menor que durante la fase de luz/oscuridad, que en el caso de los ratones rd 10 de 3 y 6 meses, es significativamente menor que el ritmo inducido. El análisis estadístico se realizó mediante “*Unpaired Test*” y el posterior *Test* de Welch (GraphPad Instat).

Para completar el estudio del ritmo endógeno en ratones con degeneración retiniana, se realizó el experimento de actividad circadiana en ratones hProIns de 9 meses de edad (**figura 40A**). Los resultados muestran un actograma muy similar al del ratón control y rd10 de mediana edad (3 y 6 meses), hasta el punto que el análisis estadístico permite observar diferencias significativas entre su ritmo inducido y su ritmo endógeno (**figura 40B**), tal como ocurre en los ratones C57 y rd10 de 3 y 6 meses.

En esencia, tanto los ratones control como los ratones distróficos son capaces de sincronizar sus ritmos de actividad con el ritmo lumínico a los que son sometidos. Esto implica, a nuestro juicio, una función intacta por parte de las ipRGC, incluso en retinas que han sufrido un proceso degenerativo generalizado como la del ratón rd1 a los 9 meses de edad. Por otro lado, el ritmo endógeno de los ratones si parece estar afectado por la degeneración de la retina, y según los resultados, esta afección es dependiente de la edad, al igual que la degeneración/remodelación de la retina de los ratones rd.

Por último, la afectación del ritmo endógeno en ratones rd10 de edad avanzada (9 meses) parece atenuarse o desaparecer en ratones hProIns de la misma edad. A nuestro juicio, esto demuestra una acción neuroprotectora de la proinsulina, ya que los ratones hProIns de 9 meses, que tienen un *background* de rd10, se comportan como los ratones rd10 de menor edad (3 o 6 meses). Como en el caso del *test* optomotor, la proinsulina parece retrasar funcionalmente la degeneración retiniana en los ratones hProIns.



**Figura 40: Actividad circadiana en animales transgénicos hProIns.**

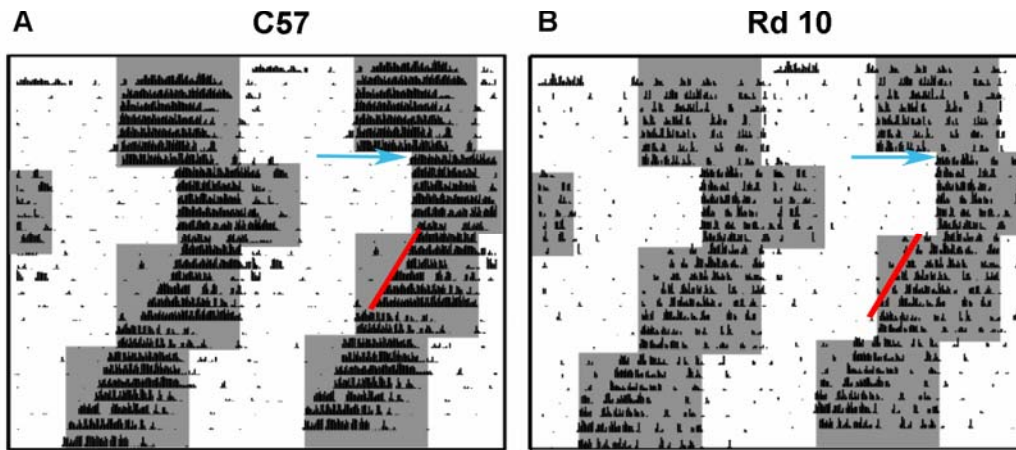
**A.** Actograma de ratón hProIns correspondiente a un experimento de actividad circadiana realizado durante 37 días consecutivos de registro. Los animales fueron mantenidos inicialmente en condiciones de luz y oscuridad [12:12 L/D] durante los primeros 11 días, seguidos de 18 días de oscuridad constante [24 D/D]; a continuación se volvió a ritmos luz/oscuridad otros 8 días. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fue sometido el animal de experimentación. Durante los periodos de oscuridad los animales transgénicos muestran una actividad circadiana con un ritmo endógeno de menos de 24 horas. **B.** Representación gráfica de los valores medios (media  $\pm$  ESM) del ritmo circadiano del experimento mostrado en A. Se muestran como comparación los datos de la figura 38B y 39B obtenidos en animales controles sanos, rd1 y rd10 de distintas edades. Al igual que en los animales sanos y los animales rd10 de 3 y 6 meses, durante los periodos de oscuridad continua los animales transgénicos muestran un ritmo circadiano de actividad endógena de una duración significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que durante la fase de luz/oscuridad. Análisis estadístico realizado mediante "Unpaired Test" y Test de Welch (GraphPad Instat).

### ***Evaluación del efecto del cambio de fase sobre la actividad circadiana en ratones rd***

Se diseñó un grupo de experimentos con el fin de estudiar la capacidad de adaptación de los animales que sufren degeneración retiniana a nuevas fases de los ritmos luz/oscuridad. Los resultados obtenidos en ratones rd10 de dos meses de edad fueron comparados con los obtenidos en ratones control.

Los primeros experimentos realizados en ratones controles C57 permitieron observar que en condiciones controles, los ratones tardan solamente un día en adaptarse a un cambio de fase (6 horas de desfase) del ritmo luz/oscuridad, si ese cambio se produce por un alargamiento de la fase de luz. Este fenómeno es conocido como *masking effect* (definido como la supresión inmediata de la actividad motora por efecto de la luz). Por el contrario, cuando el cambio de fase se produce por acortamiento de la fase de luz, los ratones controles tardan alrededor de 6 días en adaptarse a la nueva fase (**figura 40A**).

Al igual que en los animales C57, los ratones rd10 tardan sólo un día en adaptarse a un cambio de fase por alargamiento de la fase de luz (mantienen el *masking effect*), e igual que los ratones C57, tarda 6 días a adaptarse a un cambio de fase cuando se produce un acortamiento de la fase de luz. (**figura 40B**).



**Figura 41: Actividad circadiana en animales controles sanos y distróficos sometidos a cambios de fase.**

**A, B.** Actogramas de ratones C57 (**A**) y rd10 (**B**) de 2 meses de edad correspondientes experimentos de actividad circadiana realizados durante 28 días consecutivos de registro. Cada animal fue mantenido en condiciones de luz y oscuridad durante todo el experimento, variando semanalmente la fase de comienzo del periodo de oscuridad. Se muestran las fases de luz (fondo blanco) y oscuridad (fondo gris) a las que fueron sometidos los animales de experimentación. Se aprecia que un desfase de 6 horas por el retraso en el comienzo de la fase de oscuridad induce una adaptación inmediata de los animales al nuevo ritmo luz/oscuridad ("*masking effect*", flecha azul). Por el contrario, un desfase de 6 horas en el avance en el comienzo de la fase de oscuridad induce una adaptación paulatina (6 días) de los animales al nuevo ritmo luz/oscuridad (línea roja).

### ***Estudio de la sensibilidad a la luminosidad***

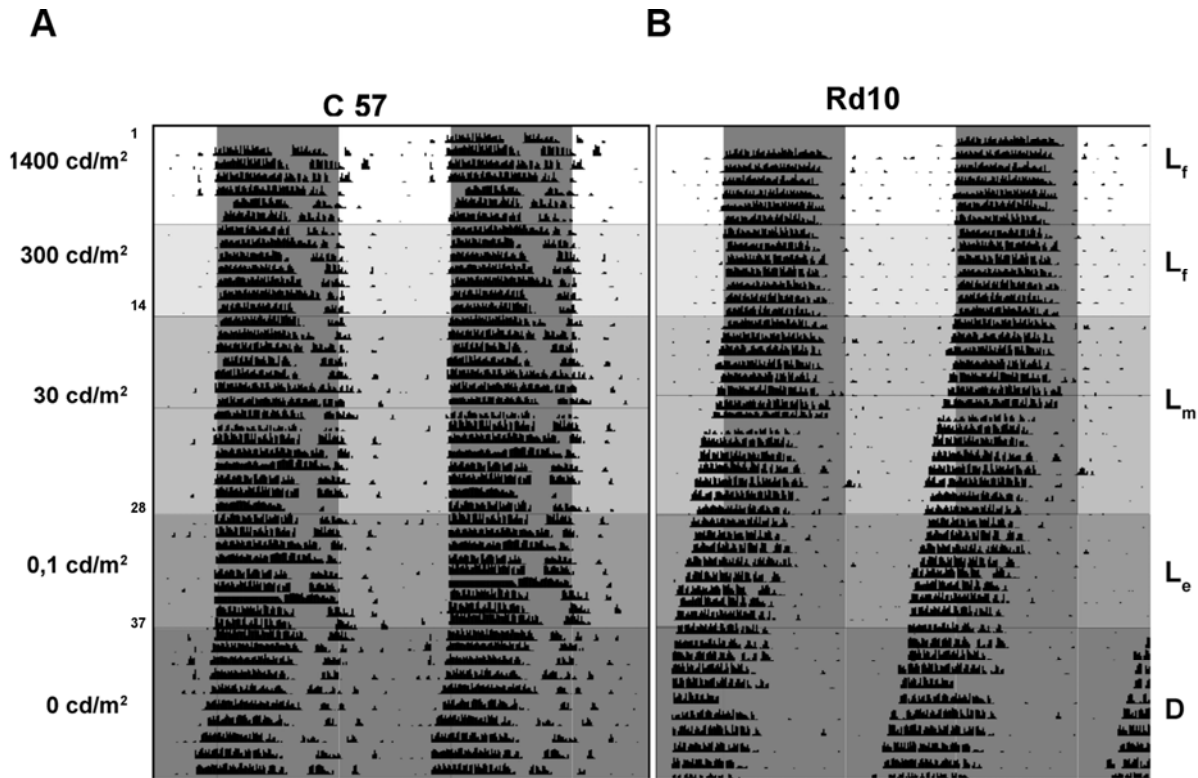
Se diseñó un tercer tipo de experimentos de actividad circadiana con el fin de ilustrar hasta que punto la ausencia de fotorreceptores en los ratones rd determina un cambio en la sensibilidad a los ritmos luz/oscuridad a que se ven sometidos los animales. Con ello, se pretendía asimismo ilustrar cual es el grado de participación de los fotorreceptores clásicos y de la vía visual en la regulación del ritmo circadiano. Teniendo en cuenta que las ipRGC son sólo intrínsecamente fotosensibles en condiciones fotópicas pero reciben información de la retina externa, se ideó un experimento en el que los ratones eran sometidos a ritmos luz/oscuridad en los que se

modificaba la intensidad lumínica de la fase de luz. Los experimentos realizados permitieron observar que los animales C57 mantiene el ritmo circadiano en todas las condiciones de intensidad lumínica a las que es sometido (**figura 41A**), tanto si es en condiciones fotópicas, mesópicas o escotópicas. Estos resultados demuestran que a pesar de que las ipRGC son intrínsecamente sensibles a la luz, el input que les llega de conos y bastones, es suficiente como para mantener su ritmo de actividad circadiana ajustado a las fases de luz/oscuridad. Como se ha visto en la introducción, las ipRGC son solo intrínsecamente sensibles en condiciones fotópicas, por lo que es necesaria la implicación de los fotorreceptores clásicos en la vía no visual de la retina para la correcta sincronización del núcleo supraquiasmático en condiciones mesópicas y escotópicas. En condiciones de total oscuridad, como se ha visto anteriormente, el SCN pasa a tener un ritmo endógeno menor de 24 horas.

Por otro lado, los ratones rd10 de más de dos meses de edad son capaces de sincronizar su actividad circadiana con los ritmos luz/oscuridad solo en condiciones fotópicas. Cuando estos animales son sometidos a ritmos luz/oscuridad de baja intensidad lumínica durante las fases de luz (condiciones mesópicas y escotópicas), los animales se comportan como si estuvieran en oscuridad absoluta (**figura 41B**). En la **figura 42** se muestran las diferencias en los ritmos de actividad circadiana de los ratones C57 y rd10 en distintas condiciones de luminosidad. El ratón C57 presenta un periodo de actividad circadiana que se ajusta a 24 horas en todas las condiciones lumínicas (fotópica, mesópica y escotópica), y pasa a ser menor de 24 horas tan solo cuando es mantenido en oscuridad absoluta. Por el contrario, el ratón rd10 muestra un periodo de actividad circadiana de 24 horas solo cuando las condiciones lumínicas son fotópicas;

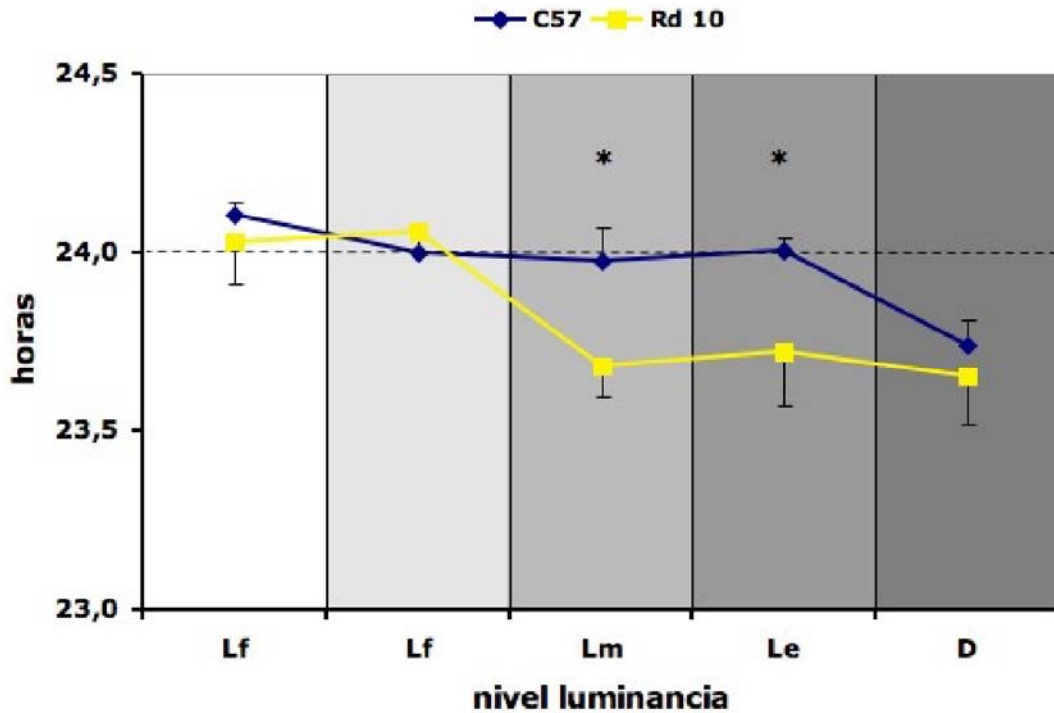


para las demás condiciones lumínicas el ratón se comporta como si estuviera en oscuridad absoluta.



**Figura 42: Contribución de fotorreceptores clásicos (conos y bastones) a la sincronización de la actividad circadiana con la luminosidad ambiental.**

**A, B.** Actogramas de ratones C57 (**A**) y rd10 (**B**) de má, correspondientes a experimentos de actividad circadiana realizados durante 50 días consecutivos de registro. Cada animal fue mantenido en condiciones de luz y oscuridad [12:12 L/D] durante los primeros 39 días, disminuyendo periódicamente (~7 días) la intensidad lumínica de las fases de luz (se indica junto a cada período la intensidad lumínica en  $\text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Los últimos 11 días de registro los animales fueron mantenidos en oscuridad constante. Se muestran las fases de luz (escala de grises) y oscuridad (gris intenso) a las que fueron sometidos los animales de experimentación. Se indica en la columna de la derecha las condiciones lumínicas de adaptación ( $L_F$ =condiciones fotópicas,  $L_M$ =condiciones mesópicas,  $L_S$ =condiciones escotópicas). Se aprecia que los animales C57 (**A**) son capaces de sincronizar su actividad circadiana incluso en condiciones escotópicas, mientras que los animales distróficos (**B**) solo muestran sincronización de su actividad circadiana durante el periodo de condiciones fotópicas.



**Figura 43: Sincronización de la actividad circadiana con la luminosidad ambiental.**

Representación gráfica de los valores medios (media  $\pm$  ESM) del ritmo circadiano de los experimentos mostrados en la figura 41A y B. La línea azul representa la progresión de los valores medios del ritmo circadiano del ratón C57 de dos meses en situaciones lumínicas fotópica (Lf), mesópica (Lm), y escótópica (Le), y por último en oscuridad (D). El C57 mantiene un ritmo inducido cercano a 24 horas en todas las situaciones lumínicas, y pasa a tener un ritmo endógeno menor a 24 horas cuando es sometido a total oscuridad. La línea amarilla representa la progresión de los valores medios del ritmo circadiano del ratón rd10 de dos meses en las mismas condiciones lumínicas (Lf, Lm, Le, y D). Los animales rd10 mantienen un ritmo inducido sólo en situaciones lumínicas fotópicas (Lf); en todos los otros casos pasan a tener un ritmo endógeno menor a 24 horas. Se muestran diferencias significativas entre el ritmo inducido del ratón C57 y el ritmo endógeno del ratón Rd10 en Lm y Le (\* $P < 0,05$ ). Análisis estadístico realizado mediante "Unpaired Test" y Test de Welch (GraphPad Instat).



## **DISCUSIÓN**



Se resumen a continuación los resultados originales obtenidos en los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral:

1. Los ratones rd1 y rd10 de nueve meses de edad mantienen la misma densidad de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) que los animales controles sanos de la misma edad, a pesar de los profundos cambios estructurales sufridos en las retinas distróficas. Por tanto, parece que el número de ipRGC se mantiene constante tras la degeneración retiniana, si bien las dendritas de las ipRGC sufren cambios morfológicos notables, adentrándose de manera masiva a la capa nuclear interna de la retina.
2. Las células amacrinas dopaminérgicas (DA) de los ratones rd1 y rd10 mantienen sus dendritas estratificadas en la parte más externa de la capa plexiforme interna, tal y como se encuentran en los ratones controles sanos, a pesar de los cambios morfológicos sufridos por las dendritas de las ipRGC.
3. Los ratones transgénicos hProIns parecen sufrir cambios morfológicos en sus prolongaciones dendríticas de forma menos acusada que los ratones rd10 de la misma edad.
4. Los ratones rd1, debido al que sufren un proceso de degeneración retiniana precoz, no llegan a desarrollar el reflejo optoquinético, como se deduce de su respuesta nula al test optomotor para las edades evaluadas (25 – 55 días de edad).

5. Los ratones rd10 de curso degenerativo más lento, mantienen sus respuestas al test optomotor hasta los 35 días de edad. Para edades más avanzadas se produce una disminución paulatina de la respuesta, siendo a los 55 días de edad la respuesta del test optomotor similar a la del ratón rd1.
  
6. Los ratones hProIns presentan una respuesta optoquinética equiparable a la de los ratones rd10 a edades tempranas (<35 días de edad), si bien para edades más avanzadas (~55 días de edad) todavía son capaces de mantener las respuestas optomotoras. Estos resultados apoyan el hecho de que los ratones hProIns mantienen una función retiniana significativamente mejor que los ratones rd10 de la misma edad.
  
7. Los ratones rd10 con degeneración retiniana avanzada, así como ocurre en los ratones rd1, son capaces de sincronizar sus ritmos biológicos con el ritmo circadiano marcado por las condiciones lumínicas exteriores.
  
8. Con el avance del proceso degenerativo retiniano en los ratones rd10 se produce un alargamiento del periodo del ritmo circadiano endógeno (en ausencia de estímulos lumínicos). El ritmo circadiano endógeno de los ratones rd10 con degeneración retiniana avanzada, así como en los ratones rd1, es significativamente mayor que el de los ratones controles sanos de la misma edad.

9. El ritmo circadiano endógeno en los ratones hProIns de avanzada edad es significativamente más corto que en ratones rd10, y más parecido al de los ratones controles sanos.
  
10. La capacidad de adaptación de los ratones rd10 con degeneración avanzada a los cambios de fase de los ritmos luz/oscuridad es similar a la de los ratones controles sanos de la misma edad.
  
11. La actividad motora inducida por la luz ambiental en ratones rd10 con degeneración avanzada precisa intensidades lumínicas  $\geq 300 \text{ cd/m}^2$  (condiciones fotópicas de gran luminosidad). Si la intensidad de luz ambiente es menor de dicho valor, los ratones rd10 pasan a mostrar una actividad motora ajustada a su ritmo circadiano endógeno. Los ratones controles sanos mantienen actividad motora inducida por la luz ambiental incluso para intensidades lumínicas  $< 0,1 \text{ cd/m}^2$  (condiciones escotópicas) y sólo pasan a tener un ritmo endógeno de actividad motora en oscuridad absoluta.

### *Células Ganglionares Intrínsecamente Fotosensibles*

El primer objetivo de la presente tesis fue caracterizar morfológicamente las ipRGC de ratones con distrofias retinianas, como son los modelos rd1 y rd10, así como de ratones con sobreexpresión del factor neuroprotector de la proinsulina (*hProIns*). Para conseguir tal objetivo se utilizó la técnica de inmunohistoquímica y tinción con anticuerpo primario policlonal contra la melanopsina. Para el desarrollo de esta fase del trabajo se



ha utilizado un anticuerpo policlonal comercial (Affinity Bioreagents, Golden, USA). Trabajos previos de otros grupos de investigación (Provencio *et al.*, 2000; Provencio *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2005) han podido documentar la estructura de las ipRGC utilizando anticuerpos policlonales de fabricación propia. Los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos en el presente trabajo mediante el anticuerpo, a pesar de mostrar un cierto marcaje inespecífico de fondo, ilustran con precisión la morfología de las ipRGC y de sus prolongaciones dendríticas. Como ya se ha comentado, las ipRGC tienen unas prolongaciones escasas las cuales abarcan una gran amplitud en la retina (200-300  $\mu\text{m}$ , Hattar *et al.*, 2002), por lo que las secciones histológicas de 15  $\mu\text{m}$  de espesor no pueden contener la totalidad de las prolongaciones celulares. Por esta razón es prácticamente imposible obtener una ipRGC con todas sus dendritas dentro de un mismo corte sagital. Lo que sí que se puede obtener con los cortes sagitales es el cuerpo celular de la ipRGC, con algunas dendritas principales emergiendo del soma y sus procesos terminales.

Los marcajes inmunocitoquímicos de las ipRCG en ratones control han permitido observar una estratificación mayoritaria de los procesos dendríticos en la porción más externa de la IPL. Sin embargo, los ratones que sufren una degeneración retiniana, tanto los rd10 como los rd1, presentan unos procesos dendríticos finos que, emergiendo de las dendritas trasversales ubicadas en la región más externa de la capa plexiforme interna, se adentran a la capa nuclear interna. En cierto modo, parece como si las dendritas de las ipRCG, que dejan de recibir el *input* procedente de las vías de conos y bastones, desarrollasen conos de crecimiento y emitiesen procesos en busca de la "información no

recibida". La emisión de procesos celulares ante la degeneración es un fenómeno característico de otros tejidos nerviosos que han sufrido una lesión (Germain *et al.*, 2003, 2004). En este sentido, ya ha sido descrito que una vez definidos los procesos nerviosos en la fase de desarrollo pre y postnatal, haya poca generación de nuevas células nerviosas. Sin embargo, el sistema nervioso es menos rígido en cuanto a sus procesos celulares y conexiones sinápticas (Shepherd, 1994). Existen numerosos casos bien documentados donde tejidos nerviosos en proceso de degeneración reaccionan a la adversidad mediante cambios morfológicos y sinápticos. Liu y Chambers (1958) observaron que años después de haber lesionado unilateralmente el tracto piramidal a nivel de la médula espinal, se producía un mayor crecimiento dendrítico en el tracto lesionado que en el contrario. Asimismo, Raisman (1969) observó un crecimiento anormal de las dendritas del hipocampo cuando dejan de recibir su *input* del cerebro anterior; de la misma forma, un crecimiento de las fibras del cerebro anterior ocurría al cortar el *input* procedente del hipocampo. Igualmente, Caviness y Rakic (1978) describieron brotes dendríticos anormales en las células de Purkinje del cerebelo por falta del *input* de las células granulares. En retina, también se ha descrito crecimiento aberrante de las dendritas de células ganglionares en ratones criados en completa oscuridad (Wingate y Thomson, 1994), o los ya citados por sección del nervio óptico (Germain *et al.*, 2003, 2004). Todos esos precedentes dan a entender que los procesos dendríticos que aparecen en las ipRGC después de la degeneración (figuras 27, 28, 30) no son más que una reacción normal de éstas células a la falta de *input* por parte de la retina externa, al haber desaparecido las células fotorreceptoras (conos y bastones). Es interesante observar que tanto en una degeneración más aguda (rd1) como en aquella de

curso temporal más lento (rd10) se observan las mismas alteraciones estructurales, incluso en edades tempranas de desarrollo del proceso neurodegenerativo. Nuestros resultados, aportan pues una nueva idea: a la remodelación retiniana que sufren las retinas de modelos animales de *retinosis pigmentaria*, y que ya ha sido revisada exhaustivamente por Marc y colaboradores (Marc *et al.*, 2003), cabría añadir el crecimiento de brotes dendríticos en las ipRCGs, como signo de afectación de la vía no visual en los modelos animales de degeneración hereditaria de la retina.

Como ya ha sido documentado en trabajos anteriores, los ratones transgénicos con sobre-expresión de proinsulina, los ratones hProIns, muestran una atenuación o enlentecimiento en la degeneración de fotorreceptores clásicos (Barhoum, 2006; Corrochano, 2006). Nuestros resultados sugieren que las ipRGC de estos ratones hProIns también emiten procesos dendríticos al igual que los ratones rd10, si bien dichos procesos son más escasos a edades tempranas del desarrollo (figura 28), y más finos que los de sus homólogos rd10 en edades más avanzadas (figura 28). Parece como si el efecto neuroprotector o antiapoptótico de la proinsulina en la retina, ya demostrado anteriormente (De Pablo, 1995; Díaz *et al.*, 1999; Corrochano, 2006; Barhoum, 2006), también ejerciese un efecto sobre los brotes dendríticos de las ipRCG, al ser los brotes dendríticos de las ipRGC menos obvios en los ratones hProIns que en los ratones rd10. En este sentido, cabría pensar que la información recibida por las ipRGC procedente de las vías de los fotorreceptores clásicos en los ratones transgénicos es funcional durante más tiempo que en el caso de los rd10, y por ello, la emisión de procesos dendríticos y crecimiento de los mismos están menos desarrollados en los ratones transgénicos.

De la misma manera en que las ipRGC pueden realizar su labor funcional en ausencia de fotorreceptores clásicos, la mayoría de las respuestas no visuales no se ven alteradas en ratones deficientes en melanopsina (Panda *et al.*, 2003). Las respuestas no visuales son completamente abolidas cuando los ratones deficientes en melanopsina pierden también sus fotorreceptores clásicos (Panda *et al.*, 2003), sugiriendo la contribución de los fotorreceptores clásicos a las respuestas no visuales de la retina. A través de sus dendritas, las ipRGC reciben información de las células amacrinas y de las células bipolares, como intermediarios de la información lumínica detectada en los fotorreceptores. Se ha descrito que las células amacrinas son capaces de modular las señales procedentes de los bastones y los conos mediante señales inhibitorias (GABA y glicina) sobre las dendritas y/o cuerpos celulares de las ipRGC (Berson *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 2006; Odermatt y Lagnado, 2007). También se ha descrito que las ipRGC reciben un *input* de las células bipolares de tipo *on* en la capa plexiforme interna (Berson *et al.*, 2002), así como de las células bipolares de tipo *off* (Wong *et al.*, 2007). Evidentemente, el tipo de información que reciba la ipRGC, ya sea de tipo *on* o de tipo *off*, dependerá de la posición de las conexiones sinápticas entre las células bipolares y las dendritas de las ipRGC. En este sentido, recientemente se ha descrito (Sekaran *et al.*, 2005) que pudieran existir en retina de ratón tres tipos de ipRGCs: Células de tipo I, aquellas que disponen sus dendritas en la región más externa de la IPL (región *off*); células de tipo II, aquellas que disponen sus dendritas en la región más interna de la IPL (región *on*); células de tipo III, aquellas que disponen sus dendritas en ambas subláminas (regiones *on* y *off*). Nuestros resultados nos han permitido estudiar tan solo las células de tipo I de la citada clasificación, motivo por el cual no podemos extraer conclusiones sobre los diferentes

cambios estructurales experimentados por los distintos subtipos de ipRGC. Serán necesarios nuevos experimentos, probablemente con anticuerpos más específicos para otros subtipos de ipRGC para poder documentar hasta que punto el proceso de degeneración de fotorreceptores afecta a los distintos subtipos de ipRGC.

Se ha descrito que las ipRGC que disponen sus dendritas estratificándose en la porción más externa de la IPL reciben un *input* sináptico de las células amacrinas dopaminérgicas (DA). Las DA han sido estudiadas estructural y funcionalmente desde hace años, dado el relevante papel que dichas células parecen tener en la fisiología de la retina (Dowling and Ehinger, 1975; Eglén *et al.*, 2003; Witkovsky, 2004; Sakamoto *et al.*, 2005; Viney *et al.*, 2007; Vugler *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). En este sentido, las DA parecen estar involucradas en la modulación neural de los mecanismos de adaptación a la luz y a la oscuridad (Bauer *et al.*, 1980; Mangel and Dowling, 1985; Umino *et al.*, 1991; Weiler *et al.*, 1997; Nir *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2002a, b; Ribelayga *et al.*, 2004). Respecto a la interrelación funcional de las DA con las ipRGC, se ha descrito un efecto modulador de los niveles de mRNA de melanopsina por parte de las DA (Sakamoto *et al.*, 2005). El hecho de que las ipRGC y las DA dispongan sus procesos dendríticos estratificándose al mismo nivel de la IPL (figuras 29 y 30) permite pensar que quizá el papel funcional de las DA en los procesos asociados a la actividad circadiana podría ser debido a la comunicación sináptica que establece con las ipRGC. Esto implicaría una conexión dendro-dendrítica entre las células ipRGC y DA, conexión no descrita hasta la fecha por ningún autor desde una aproximación micro-estructural. Recientemente, estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio han permitido

documentar la participación de las ipRGC en la sensibilidad de los fotorreceptores clásicos (Forns *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007), posiblemente mediada por las células dopaminérgicas y la información lumínica que reciben de las ipRGC. En este sentido, es importante resaltar la escasa afectación estructural que presentan las DA en las retinas distróficas de los ratones rd1 y rd10 (figuras 29 y 30). Como ya se ha comentado, en distintas regiones del SNC, se ha documentado que las neuronas que no reciben el *input* "esperado" o no establecen las conexiones funcionales "esperadas" tienden a desarrollar procesos dendríticos (Germain *et al.*, 2003, 2004). El hecho que las DA no modifiquen su arborización dendrítica y que sus procesos mantengan su estratificación original (en la porción más externa de la plexiforme interna), nos induce a pensar que éstas células sí están recibiendo el *input* esperado y sí están estableciendo las conexiones sinápticas normales, y que justificaría el que no sufran modificaciones estructurales en los ratones rd10.

### *Test Optomotor*

Como ya ha sido comentado anteriormente, el *test* optomotor es una prueba de comportamiento visual diseñada para la evaluación de la vía visual, ya que ilustra el funcionamiento de dicha vía de una manera integral; en este sentido el *test* optomotor muestra el estado funcional de los centros de relevo participantes en el reflejo optoquinético (vía visual de la retina, NOT, núcleo del nervio oculomotor III, y músculos extraoculares). El reflejo optoquinético representa una respuesta innata e involuntaria del sistema visual, para el cual no es necesario ningún entrenamiento previo del animal (Prusky *et al.*, 2004). Sin embargo, ha sido discutido si el *test*

optomotor está realmente analizando el reflejo optoquinético, ya que éste último da lugar a unos movimientos oculares extremadamente pequeños, sólo detectables con sensores que permitan mostrar el movimiento de la pupila. El *test* optomotor contabiliza los movimientos de cabeza que causa el movimiento de la imagen (*head tracking movement*), y éstos parecen tener un control paralelo al del reflejo optoquinético. Ambos movimientos son independientes de la corteza visual primaria y sólo dependientes de núcleos subcorticales (Prusky *et al.*, 2004; Douglas *et al.*, 2005). Se podrían deducir que o bien los movimientos de cabeza del reflejo optomotor acompañan al reflejo optoquinético, o son movimientos independientes que utilizan vías paralelas. No obstante, el *test* optomotor ya ha sido utilizado como método válido para analizar la función visual de ratones con degeneración retiniana (Thaung *et al.*, 2001), motivo, entre otros, que nos llevó a utilizarlo para la consecución de uno de los objetivos propuestos.

Un problema, más general, de los experimentos de comportamiento es que puede haber otros factores que afecten los resultados (Wahlsten, 2001; Wahlsten *et al.*, 2003), como puede ser la subjetividad de los recuentos realizados; por ello, es importante seguir siempre protocolos estandarizados. Como ya se ha comentado, el equipamiento para la realización del *test* optomotor no es comercial, sino que fue puesto a punto en el propio laboratorio, hecho que hace difícil comparar los resultados propios con los obtenidos en otros trabajos que han utilizado otros *sets* experimentales (Prusky *et al.*, 2004). Con el fin de evitar errores de análisis, procedimos a realizar los experimentos comparando los resultados obtenidos en animales con degeneración retiniana con otros de un grupo

control sometido a similares protocolos experimentales. Por ello, en nuestro trabajo se comparan resultados propios, procedentes de distintos grupos experimentales, en los que se ha seguido una metodología común. Para la realización de los experimentos se utilizaron cuatro animales por grupo experimental, número que aunque parezca bajo, ha permitido analizar los resultados y obtener diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Por otra parte, la realización del *test* optomotor podría dar lugar a diferencias subjetivas a la hora de realizar los recuentos (diferencias debidas al error humano); el hecho de que los giros de cabeza del ratón en el *test* optomotor sean contabilizados a criterio del observador genera un margen de error. Quizá ello justifica que incluso en animales que conocemos su alto grado de degeneración visual, sigan contándose un número de giros de cabeza distinto de cero.

Los ratones rd1 a los 20 días ya no muestran fotorreceptores (su retina carece de capa nuclear externa), por lo que a los 25 días de edad su sistema vía visual es incapaz de reaccionar a ningún estímulo lumínico; los resultados del *test* optomotor en estos ratones muestran una ausencia de respuesta (figura 33). Los ratones rd10 (figura 34), por lo contrario, muestran una respuesta positiva al *test* optomotor hasta los 45 días de edad, y aunque esta respuesta es sensiblemente menor que la que muestran los ratones control (figura 35), es también, en la mayoría de los casos, significativamente mayor a la respuesta que muestran los ratones rd1. La ausencia de respuesta optomоторa a los 55 días de edad, en los ratones rd10, al igual que en los ratones los rd1, tiene como explicación la ausencia de fotorreceptores.



Los ratones hProIns mantienen una respuesta al *test* optomotor parecido a los ratones rd10 en edades tempranas (25, 35, y 45 días), pero muestran una mejora significativa en la respuesta optomora en edades más avanzadas (55 días)(figura 37). Esta mejoría en la capacidad de respuesta optomora podría ser consecuencia del efecto neuroprotector de la proinsulina, la cual atenúa durante unos días el proceso neurodegenerativo de los fotorreceptores y permite una mejor respuesta al test optomotor. Los resultados obtenidos en los animales hProIns concuerdan con los datos previos sobre estudios estructurales (Corrochano, 2006) y funcionales (Barhoum, 2006) del efecto neuroprotector de la proinsulina sobre la degeneración de los fotorreceptores. Por último, si bien los datos obtenidos, y el análisis estadístico de los mismos, permiten concluir sobre el posible efecto neuroprotector de la proinsulina sobre la enfermedad herodegenerativa de la retina, sería deseable conocer cuál es el estado funcional de la vía visual a edades más avanzadas. Estos experimentos quedan emplazados para un futuro, en el que deseemos conocer en qué momento dejan de responder al test optomotor los ratones hProIns.

### *Actividad Circadiana*

El análisis de la actividad circadiana es un *test* de conducta visual extraordinariamente objetivo y da una noción muy clara del funcionamiento de la vía no visual de la retina. Este *test* ha sido utilizado por numerosos grupos de investigación para evaluar el funcionamiento de núcleo supraquiasmático y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles que a él proyectan (Berson *et al.*, 2002; Berson, 2003;

Doyle *et al.*, 2002a; Forns *et al.*, 2007; Freedman *et al.*, 1999; Hattar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2005; Provencio y Foster, 1995; Provencio *et al.*, 1998b; Vicente *et al.*, 2007).

Como ya ha sido mencionado, nuestros resultados muestran que los ratones rd1, rd10 y hProIns de edad avanzada son perfectamente capaces de sincronizar sus ritmos biológicos con el ritmo de luz/oscuridad 12:12 cuando la intensidad de la fase de luz es de gran luminosidad ( $\sim 1400 \text{ cd/m}^2$ ). Estos resultados podríamos considerarlos como "esperables" si tenemos en cuenta que en los modelos animales de rd y en los pacientes afectados de *retinosis pigmentaria* se produce la degeneración de los fotorreceptores clásicos, mientras que las ipRGC son capaces de seguir funcionando adecuadamente. En este sentido, el correcto funcionamiento de las ipRGC en condiciones de ausencia de respuesta de fotorreceptores ya ha sido documentado con anterioridad (Provencio *et al.*, 1998b; Panda *et al.*, 2003; Freedman *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2003; Semo *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros experimentos muestran una variación en el ritmo endógeno de los ratones con degeneración retiniana respecto a los ratones control. El ritmo endógeno de los ratones control es de 23,78 ( $0,049 \pm \text{ESM}$ ) horas, mientras que el de un ratón rd1 o rd10 con degeneración avanzada es de 23,94 horas ( $0,040 \pm \text{ESM}$ ) (figura 38). Esta diferencia, estadísticamente significativa, parece indicar que la degeneración retiniana afecta de alguna manera a la regulación endógena del ritmo de la actividad del ratón por parte del núcleo supraquiasmático (SCN). Estos resultados coinciden con recientes publicaciones (Álvarez *et al.*, 2004, 2006) que defienden la afectación de los genes reloj ("*clock genes*") del SCN debida la degeneración de la retina. Aunque el mecanismo no está plenamente descrito, los cambios que tienen lugar

en una retina en degeneración parecen manifestarse también en el SCN mediante un cambio en la regulación de sus genes reloj. Por otra parte, nuestros resultados muestran que dicho cambio parece ocurrir tan sólo cuando el proceso neurodegenerativo está en un estadio avanzado, ya que en ratones rd10 de edad media (3 y 6 meses), los ritmos endógenos del SCN siguen siendo significativamente menores que los ritmos inducidos (figura 39). Asimismo, los resultados en experimentos de actividad circadiana hechos en ratones hProIns de edad avanzada, muestran una diferencia significativa entre su ritmo endógeno y su ritmo inducido, con valores muy parecidos a los obtenidos con ratones control (figura 40). Una vez más, la proinsulina parece ejercer cierto efecto neuroprotector ante la degeneración retiniana.

Paralelamente, los ratones rd10 de dos meses de edad son capaces de responder correctamente al cambio de fase del ritmo circadiano con la misma eficacia que lo hacen los ratones control (figura 41). Ambos tipos de ratón parecen efectuar una sincronización inmediata con las condiciones lumínicas cuando la fase de luz se “alarga”, (mantienen el efecto “*masking*”), y si embargo ambos tipos de ratón tardan alrededor de 6 días a adaptarse a la nueva fase de luz cuando esta se “acorta”. Como se ha comentado anteriormente, las células amacrinas dopaminérgicas parecen ser las responsables del efecto *masking* (Doi *et al.*, 2006), por lo que parece que las DA no quedarían afectadas ni morfológica (ya discutido más arriba) ni funcionalmente en ratones rd10, y que además no necesitarían la información de los fotorreceptores clásicos para ejercer su función. Estos resultados fortalecen la hipótesis ya discutida de que las DA reciben un *input* de las ipRGC, y que esto supone una comunicación dendo-

dendrítica de ipRGC a DA. Si bien estos resultados nos parecen de gran originalidad en el contexto de los más recientes estudios de la fisiología de la retina, no consideramos procedente sacar todavía unas conclusiones definitivas y estimamos que sería necesario llevar a cabo nuevos experimentos de registro electrofisiológico o de estudio a microscopía electrónica para concluir sobre la comunicación funcional desde las ipRGC a las DA.

Respecto a los experimentos de cambio de luminancia, los ratones rd10 de dos meses de edad no son capaces de sincronizar su ritmo biológico con las condiciones lumínicas luz/oscuridad 12:12 cuando la fase de luz tiene una intensidad menor a 300 cd/m<sup>2</sup>, mientras que los ratones C57 son capaces de sincronizar su ritmo de actividad motora con la luminosidad ambiental incluso en condiciones escotópicas. Estos resultados concuerdan con la idea de que existe una "colaboración" entre los fotorreceptores clásicos y las ipRGC ( Berson *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2006; Odermatt y Lagnado, 2007). Como las ipRGC son menos sensibles a la luz que los conos y los bastones, éstas sólo son capaces de inducir una sincronización de la actividad motora con la luminosidad ambiental en condiciones fotópicas. La intensidad lumínica de las condiciones mesópicas y escotópicas no es detectada por las ipRGC, pero los ratones controles, al mantener sus bastones y conos en la retina, son capaces de estimular a las ipRGC, las cuales mantienen informado al núcleo supraquiasmático del grado de luminosidad recibido por el animal. En cambio, las ipRGC de los animales rd10 de más de dos meses de edad, al no tener ni conos ni bastones en su retina, no detectan los niveles lumínicos mesópicos y escotópicos, con lo que no transmiten

información alguna al núcleo supraquiasmático y éste pasa a regular su actividad motora por los marcapasos endógenos (actividad circadiana endógena), como si el animal estuviera sometido a total oscuridad. Los resultados de la figura 43 muestran diferencias significativas entre los ritmos inducidos entre ratones control sanos y ratones rd10 en situaciones lumínicas mesópicas y escotópicas. Es de suponer que si los ratones rd10 fueran de mayor edad ( $\geq 9$  meses), esta diferencia significativa no existiría, puesto que su ritmo endógeno sería más largo debido el cambio de regulación de los genes reloj del SCN.

## **CONCLUSIONES**



1. La degeneración de fotorreceptores, conos y bastones, de la retina en los modelos muridos de retinosis pigmentaria se acompaña de un proceso de remodelación de la retina interna que afecta a la vía no visual, y se manifiesta como cambios en los procesos dendríticos de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles.
2. La degeneración de los fotorreceptores en los modelos muridos de retinosis pigmentaria va acompañada de una pérdida funcional de la vía responsable del reflejo optoquinético. El curso temporal de la pérdida de fotorreceptores en los modelos animales de degeneración retiniana es paralelo a la disminución de la respuesta del animal al *test* optomotor. La proinsulina parece ejercer un efecto neuroprotector sobre los fotorreceptores en degeneración, dado que los animales con sobre-expresión de proinsulina mantienen sus respuestas al *test* optomotor para edades en que los animales distróficos no proinsulínicos ya muestran una respuesta abolida.
3. La degeneración de los fotorreceptores en los modelos muridos de retinosis pigmentaria no afecta a las ipRGC en su función intrínseca de sincronización de la actividad circadiana con las condiciones lumínicas. Por el contrario, el ritmo endógeno de los ratones distróficos de edad avanzada sufre variaciones significativas respecto al control sano. Las variaciones en el ritmo endógeno no tienen lugar en ratones distróficos proinsulínicos. Nuevamente la proinsulina parece ejercer un papel neuroprotector, esta vez sobre las variaciones del ritmo endógeno de los ratones con distrofia retiniana.





## **BIBLIOGRAFÍA**



- Ahnelt PK, Kolb H (2000) The mammalian photoreceptor mosaic: adaptive design. *Progress in Retinal and Eye Research* **19**, 711-777
- Alarcón C, Moralies AV, Pimentel B, Serna J, de Pablo F (1998) (Pro)insulin and insulin-like growth factor I complementary expression and roles in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* **121**, 13-17
- Alsina C, Serna J, Pérez –Villamil B, De Pablo F (1998) Synthesis and differentially regulated processing of proinsulin in developing chick pancreas, liver and neuroretina. *FEBS Letters* **436**, 361-366
- Álvarez-López C, Cernuda-Cernuda R, Alcorta E, Álvarez-Viejo M, García-Fernández JM (2004) Altered endogenous activation of CREB in the suprachiasmatic nucleus of mice with retinal degeneration. *Brain Research* **1024**, 137-145
- Álvarez-López C, Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM (2006) The mPer1 clock gene expression in the rd mouse suprachiasmatic nucleus is affected by the retinal degeneration. *Brain Research* **1087**, 134-141
- Andréasson S (2006) Developments in molecular genetics and electrophysiology in inherited retinal disorders. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* **84**, 161-168
- Arendt D (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *International Journal of Developmental Biology* **47**, 563-571
- Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteyn AW, Wittbrodt J (2004) Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* **306**, 869-871
- Baehr W, Frederick JM (2000) Inherited retina disease: vertebrate animal models. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Reference Ltd., London
- Baiyles E, Nave B, Soos M, Orr S, Hayard A, Siddle K (1997) Insulin receptor/IGFI receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptors species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochemical Journal* **327**, 209-215
- Balkema GW, Mangini NJ, Pinto LH, Vanable JW Jr (1984) Visually evoked eye movements in mouse mutants and inbred strains. *Visual Science* **25**, 795-800
- Barhoum R (2006) Caracterización estructural y electrofisiológica de la degeneración retiniana en ratones rd. *Tesis Doctoral*. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

- Baskin DG, Schwartz MW, Sipols AJ, D'Alessio DA, Goldstein BL, White MF (1994) Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* **134**, 1952-1955
- Bauer B, Ehinger B, Alberg L (1980) [3H]- dopamine release from the rabbit retina. *Albrecht Von Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **215**, 71-78
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1996) Neuroscience. Exploring the brain. Williams & Wilkins. Baltimore. USA
- Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE (2003) Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *Journal of Comparative Neurology* **460**, 380-393
- Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neuroscience* **26**, 314-321
- Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that see the circadian clock. *Science* **295**, 1070-1073
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Dryja TP (1991) Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin gene defect (pro23-to-his). *Archives of Ophthalmology* **109**, 92-101
- Borg-Graham LJ, Grzywacz NM (1992) A model of the directional selectivity circuit in retina: transformations by neurons singly and in concert. *Single Neuron Computation*. McKenna T et al., Academic Press
- Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* **347**, 677-680
- Cajal SR (1904) *Histología del Sistema Nervioso*. Nicolás Moya. Madrid
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology* **188**, 245-262
- Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J (1993) Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms* **8**, S73-81
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002) Retinal degeneration mutants in mouse. *Vision Research* **42**, 517-525
- Chang-Jin J, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of Neuroscience* **18**, 8936-8946

- Corrochano, S (2006) El proceso de degeneración retiniana en ratones Rd y su atenuación por proinsulina. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense. Madrid
- Cotlier E, Weinreb R (2006) Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Survey of Ophthalmology* **51**, 232-258
- Cudeiro J (2005) Visión: I. La retina y el tálamo. *Maestría en Neurociencias y Biología del Comportamiento*. Viguera Editores. Barcelona
- D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR (2002) Mutant mouse models of insulin like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* **36**, 209-220
- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD (2005) Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* **433**, 749-754
- De la Rosa E, Bondy CA, Hernández-Sánchez C, Wu X, Zhou J, López-Carranza A, Scavo LM, De Pablo F (1994) Insulin and insulin like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *European Journal of Neuroscience* **6**, 1801-1810
- De la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A (1995) L-Glutamate induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *The Journal of Neuroscience* **15**, 3571-3582.
- De Pablo F, De la Rosa E (1995) The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends in Neuroscience* **18**, 143-150
- Detwiler SR (1933) Experiments upon the segmentation of spinal nerves in salamander embryos. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **19**, 22-29
- Díaz B, Pimentel B, de Pablo F, de la Rosa EJ (1999) Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *European Journal of Neuroscience* **11**, 1624-1632
- Díaz B, Serna J, De Pablo F, De la Rosa E (2000) In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**, 1641-1649
- Doi M, Yujnovsky I, Hirayama J, Malerba M, Tirota E, Sassone-Corsi P, Borrelli E (2006) Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice. *Nature Neuroscience* **9**, 732-734

- Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW, Prusky GT (2005) Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Visual Neuroscience* **22**, 677-684
- Dowling JE (1987) The retina: An approachable part of the brain. *Harvard University Press*, Cambridge, MA, USA.
- Dowling JE, Ehinger B (1975) Synaptic organization of the amine- containing interplexiform cells of the goldfish and Cebus monkey retinas. *Science* **188**, 270 - 273
- Doyle SE, Grac MS, McIvor W, Menaker M (2002a) Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Visual Neuroscience* **19**, 593-601
- Doyle SE, McIvor WE, Menaker M (2002b) Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *Journal of Neurochemistry* **83**, 211-219
- Drager UC, Hubel DH (1975) Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature* **253**, 203-204
- Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, Nisbett G (1985) The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behavior and Evolution* **26**, 10-48
- Eglen SJ, Raven MA, Tamrazian E, Reese BE (2003) Dopaminergic amacrine cells in the inner nuclear layer and ganglion cell layer comprise a single functional retinal mosaic. *Journal of Comparative Neurology* **466**, 343-355
- Enroth-Cugell C y Robson JG (1966) The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. *Journal of Physiology* **187**, 517-552
- Escudero P (2005) Actividad Circadiana 2.1. *Trabajo de fin de Carrera Ingeniería Técnica en Telecomunicación*. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares
- Fahrenkrug J, Nielsen HS, and Hannibal J (2004) Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport* **15**, 781-784
- Famiglietti EV Jr, Kaneko A, Tachibana M (1977) Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science* **198**, 1267-1269.
- Forns N, Vicente J, Germain F, De la Villa P (2007) Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles. Papel funcional en la adaptación a la luz. *XII Congreso de la SENEC*, Ponencias y Comunicaciones, 162
- Foster RG, Hankins MW (2007) Circadian vision. *Current Biology* **17**, R746-751

- Frade JM, Martí E, Bovolenta P, Rodríguez-Peña MA, Pérez-García D, Rohrer H, Edgar D, Rodríguez-Tebar A (1996) Insulin like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the  $\alpha$  6 integrin subunit. *Development* **122**, 2497-2506
- Frasson M, Picaud S, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sabel J (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **40**, 2727-2734
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, and Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* **284**, 502-504
- Fu Y, Zhong H, Wang MH, Luo DG, Liao HW, Maeda H, Hattar S, Frishman LJ, Yau KW (2005) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **102**, 10339-10344
- Gallego A (1971) Células interplexiformes de la retina de gato. *Archivos de la Sociedad Española de Neurociencias* **3**, 299-304
- García JM (2005) Cronobiología: los ritmos biológicos y sus fundamentos neuronales. *Maestría en Neurociencia y Biología del Comportamiento*. Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.
- García-de Lacoba M, Alarcón C, De la Rosa E, De Pablo (1999) Insulin/Insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology* **140**, 233-243
- Giménez-Almenara G (1997) Conceptos y Fundamentos de la Oftalmología. *Publicaciones de la Universidad de Córdoba y Obra Social y Cultura Caja Sur*. Córdoba, España
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature Neuroscience* **4**, 1165
- Gooley JJ, Lu J, Fisher D, Saper CB (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *Journal of Neuroscience* **23**, 7093-7106
- Gunter C, Dhand R (2002) Human biology by proxy. *Nature* **420**, 509
- Gutiérrez SM (1995) Retinosis Pigmentaria: Clasificación y Tratamiento. *Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo*. Asociación Asturaina de Retinosis Pigmentaria. España



- Hannibal J and Fahrenkrug J (2004a) Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* **15**, 2317-2320
- Hannibal J y Fahrenkrug J (2004b) Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganlion cells. *Cell Tissue Research* **306**, 99-113
- Hannibal J, Fahrenkrug J (2002) Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Annals of Medicine* **34**, 401-407
- Hannibal J, Hindersson P Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J (2002) The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retynohypothalamic tract. *Journal of Neuroscience* **22**, RC191
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 955-957
- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thomson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* **424**, 76-81
- Haverkamp S y Wässle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse Retina. *The Journal of Comparative Neurology* **424**, 1-23
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA* **75**, 5737-5741
- Hawes NL, Smith RS, Chang B, Davisson M, Heckenlively JR, John SWM (1999) Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes. *Molecular Vision* **5**, 22
- Hawkes C, Kar S (2004) The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Research Reviews* **44**, 117-140
- He S, Masland RH (1997) Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells. *Nature* **398**, 378-382
- Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, De la Rosa E, De Pablo F (1995) Autocrine/paracrine role of insulin related growth factors in neurogenesis: Local

expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 9834-9838

Hernández-Sánchez C, Mansilla A, De la Rosa E, De Pablo F (2006) Proinsulin in development: New roles for an ancient prohormone. *Diabetología* **49**, 1142-1150

Hernández-Sánchez C, Rubio E, Serna J, De la Rosa E, De Pablo F (2002). Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes* **51**, 770-777

Isenmann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival and regeneration. *Progress in Retinal Eye Research* **22**, 483-543

Isoldi MC, Rollag MD, Castrucci AM, Provencio I (2005) Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **102**, 1217-1221

Istillarte MJ (2007) Análisis estructural y funcional de la retina de ratón sometida a sección quirúrgica del nervio óptico. Efecto protector de proinsulina. *Tesis Doctoral*. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.

JAX Mice Data Sheet. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>

Jellali A, Meziane H, Ougazzal A, Rousseau S, Romand R, Auwerx J, Sahel J, Chambon P, Picaud S (2005) The optomotor response: A robust first-line visual screening method for mice. *Vision Research* **45**, 1439-1446

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2001) Principios de Neurociencia. McGraw Hill/Interamericana. Madrid, España.

Kaneko A (1971) Electrical connections between horizontal cells in the Dogfish retina. *Journal of Physiology* **213**, 95-105

Kashani AA (1993) The triplex hypothesis of vision. *Annals of Ophthalmology* **25**, 125-132

Keeler C (1966) Retinal degeneration in the mouse is rodless retina. *Journal of Heredity* **57**, 47-50

Keeler CE, Sutcliffe E, Chaffee EL (1928) Normal and rodless retinae of the house mouse with respect to the electromotive force generated through stimulation by light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **14**, 477-484

- Kramer SG, Potts AM, Mangall Y (1971) Dopamine: A retinal neurotransmitter II. Autoradiographic localization of H<sup>3</sup>-dopamine in the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **10**, 617-624
- LaVail MM, Yasummura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **39**, 592-602
- Le Roith D, Merner H, Beiter-Johnson D, Roberts CT (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin like growth factor I receptor. *Endocrine Reviews* **16**, 143-163
- Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA (2006) Berne y Levi: Fisiología. Elsevier Mosby. Madrid, España
- Lolley RN, Rong H, Craft CM (1994) Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. *Investigation in Ophthalmology and Visual Science* **35**, 358-362
- Lucas RJ, Douglas RH, and Foster RG (2001) Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nature Neuroscience* **4**, 621-626
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, and Yau KW (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knock out mice. *Science* **299**, 245-247
- MacNeil MA y Masland, RH (1998) Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* **20**, 971-982
- Mangel SC, Dowling JE (1985) Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine. *Science* **229**, 1107-1109
- Mangini NJ, Venable JW Jr, Williams MA and Pinto LH (1985) The optokinetic nystagmus and ocular pigmentation of hypopigmented mouse mutants. *Journal of Comparative Neurology* **241**, 191-209
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E (2003) Neural remodeling in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **22**, 607-655
- Masland RH (1986) The functional architecture of the retina. *Scientific American* **255**, 102-111
- Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience* **4**, 877-886

- McGee Sanftner LH, Abel H, Hayswirth WW, Flannery JG (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa, *Molecular Therapy* **4**, 622-629
- McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP (1995) Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **92**, 3249-3253
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) Recessive mutations on the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* **4**, 130-134
- Menon ST, Han M, Sakmar TP (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiological Reviews* **81**, 1659-1688
- Milam AH, Li ZY, Fariss RN (1999) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research* **18**, 175-205
- Mills SL & Massey SC (1995) Differential properties of two gap junctional pathways made by All amacrine cells. *Nature* **377**, 734-737.
- Moore RY y Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **146**, 1-14
- Moore RY, Speh JC, Card JP (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *The Journal of Comparative Neurology* **352**, 351-366
- Morales A, Serna J, Alarcón C, De la Rosa E, De Pablo F (1997) Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology* **138**, 3967-3975
- Morin LP, Blanchard, JH, Provencio, I. (2003) Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology* **465**, 401-416
- Moris G, Vega JA (2003) Neurotrophic factors: basis for their clinical application. *Neurology* **18**, 18-28
- Mrosovsky N, Hattar S (2003) Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiology International* **20**, 989-999

- Nakae J, Kido Y, Accili D (2001) Distinct and overlapping functions of Insulin and IGF-I receptors. *Endocrine Reviews* **22**, 818-835
- Nelson R, Famiglietti EV Jr, Kolb H (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *The Journal of Neurophysiology* **41**, 472-483.
- Nir I, Haque R, Iuvone PM (2000) Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Research* **870**, 118-125
- Odermatt B, Lagnado L (2007) Retinal circuits: tracing new connections. *Current Biology* **17**, R607-609
- Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, Mukai S, Cowley GS, Berson EL, Dryja TP (1992) Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* **9**, 815-830
- Oyster CW (1999) *The Human Eye, Structure and Function*. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* **307**, 600-604
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* **301**, 525-527
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, Degrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* **301**, 525-527
- Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A (2002) Insulin/Insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the Insulin receptor isoform involved. *Journal of Biological Chemistry* **27**, 39684-39695
- Paxinos G, Franklin BJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney
- Peichl L (2005) Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle. *The anatomical Record* **287**, 1001-1012
- Peichl L, Kunzle H, Vogel P (2000) Photoreceptor types and distributions in the retinae of insectivores. *Visual Neuroscience* **17**, 937-948

- Pérez-León JA, Warren EJ, Allen CN, Robinson DW, Brown RL (2006) Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock. *European Journal of Neuroscience* **24**, 1117-1123
- Pérez-Villamil B, De la Rosa E, Morales AV, De Pablo F (1994) Developmentally regulated preproinsulin gene in gastrulation and neurulation. *Endocrinology* **135**, 2342-2350
- Phelan JK, Bok D (2000) A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Molecular Vision* **6**, 116-124
- Pickard GE, Smeraski CA, Tomlinson CC, Banfield BW, Kaufman J, Wilcox CL, Enquist LW, Sollars PJ (2002) Intravitreal injection of the attenuated pseudorabies virus PRV Bartha results in infection of the hamster suprachiasmatic nucleus only by retrograde transsynaptic transport via autonomic circuits. *Journal of Neuroscience* **22**, 2701-2710
- Pinto LH, Enroth-Cugell C (2000) Tests of the mouse visual system. *Mammalian Genome* **11**, 531-536
- Pittler SJ, Keeler CE, Sidman RL, Baehr W (1993) PCR analysis of DNA from 70-year-old sections of rodless retina demonstrates identity with the mouse rd defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 9616-9619
- Plachetzki DC, Serb JM, Oakley TH (2005) New insights into the evolutionary history of photoreceptor cells. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 465-467
- Politi LE, Rotstein NP, Salvador G, Giusto N, Insua MF (2001) Insulin-like growth factor I is a potential trophic factor for amacrine cells. *Journal of Neurochemistry* **76**, 1199-1211
- Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R (1994) Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **91**, 974-978
- Provencio I y Foster RG (1995) Circadian rhythms in mice can be regulated by photoreceptors with cone-like characteristics. *Brain Research* **694**, 183-190
- Provencio I, Cooper HM, Foster RG (1998b) Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *The Journal of Comparative Neurology* **395**, 417-439
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998a) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **95**, 340-345

- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience* **20**, 600-605
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM (2002) Anatomy: Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* **415**, 493
- Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM (2004) Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **45**, 4611-4616
- Reiter C, Gardner T (2003) Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina, possible implications for diabetic retinopathy. *Progress in Retina and Eye Research* **22**, 545-562
- Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC (2004) A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *Journal of Physiology* **554**, 467-482
- Riu E, Mas A, Ferré T, Pujol A, Gros L, Otaequi P, Montoliu L, Bosch F (2002) Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes* **51**, 704-711
- Rodieck RW (1998) The first steps in seeing. Sinauer Associates. Massachusetts, USA
- Rollag MD, Berson DM, Provencio I (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms* **18**, 227-234
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* **298**, 2211-2213
- Russo VC, Gluckman P, Feldman EL, Werther GA (2005) The insulin like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocrine Reviews* **10**, 1210-1224
- Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Pozdeyev NV, Iuvone PM, Tosini G (2005) Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *European Journal of Neuroscience* **22**, 3129-3136
- Sauve Y, [retina.umh.es/webvision/](http://retina.umh.es/webvision/)
- Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, Hankins MW (2003) Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Current Biology* **13**, 1290-1298

- Sekaran S, Lupi D, Jones SL, Sheely CJ, Hattar S, Yau KS, Lucas RJ, Foster RG, and Hankins MW (2005) Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Current Biology* **15**, 1099-1107
- Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffrey G, Foster RG (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *European Journal of Neuroscience* **17**, 1793-1801
- Shepherd GM (1994) *Neurobiology*. Oxford University Press. New York. USA
- Shutoh F, Katoh A, Kitazawa H, Aiba A, Itohara S, Nagai S (2002) Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in mGluR1 knockout mice. *Neuroscience Research* **42**, 141-145
- Suckow MA, Danneman P, Brayton C (2001) *The laboratory Mouse*. CRC Press. New York, EEUU
- Sung CH, Makino C, Baylor D, Nathans J (1994) A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *Journal of Neuroscience* **14**, 5818-5833
- Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman SD, O'Rourke PJ, Stabila PF, Bell WJ, Dean BJ, Kauper KA, Budz VA, Tsiaras WG, Acland GM, Pearce-Kelling S, Laties AM, Aguirre GD (2002) Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **43**, 3292-3298
- Taylor WR, Wässle H (1995) Receptive field properties starburst cholinergic amacrine cells in the rabbit retina. *European Journal of Neuroscience* **7**, 2308-2321
- Thaung C, Arnold K, Jackson IJ, Coffey PJ (2001) Presence of visual head tracking differentiates normal sighted from retinal degenerate mice. *Neuroscience Letters* **325**, 21-24
- Tu DC, Zhang D, Demas J, Slutsky EB, Provencio I, Holy TE, Van Gelder RN (2005) Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* **48**, 987-999
- Umino O, Lee Y, Dowling JE (1991) Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina. *Visual Neuroscience* **7**, 451-458.
- Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ (2006) Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-



mediated cell death in the embryonic mouse retina. *Journal of Neurochemistry* **99**, 524-536

- Ventura I (2004) Actividad Circadiana 1.0. *Trabajo de fin de Carrera Ingeniería Técnica de Telecomunicación*. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares
- Vicente J, Forns N, De la Villa P (2007) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: functional role in light adaptation. *XXXIV SECF Congress, Acta Physiologica 2007* **190**, Supplement 655, Abstract number: O34
- Viney TJ, Balint K, Hillier D, Siegert S, Boldogkoi Z, Enquist LW, Meister M, Cepko CL, Roska B (2007) The local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transynaptic viral tracing. *Current Biology* **17**, 981-988
- Vugler AA, Redgrave P, Semo M, Lawrence J, Greenwood J, Coffey PJ (2007) Dopamine neurons form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Experimental Neurology* **205**, 26-35
- Wahlsten D (2001) Standardizing tests of mouse behavior: Reasons, recommendations, and reality. *Physiology and Behavior* **73**, 695-704
- Wahlsten D, Rustay NR, Metten P, Crabbe JC (2003) In search of a better mouse test. *Trends in Neurosciences* **26**, 132-136
- Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW (2003) Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *European Journal of Neuroscience* **17**, 1727-1735
- Wässle H & Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Review* **71**, 447-480.
- Weiler R, Baldrige WH, Mangel SC, Dowling JE (1997) Modulation of endogenous dopamine release in the fish retina by light and prolonged darkness. *Visual Neuroscience* **14**, 351-356
- Weleber R, Gregory-Evans K (2001) Retinitis pigmentosa and allied disorders. In: Ogden TE, Hinton DR (Eds) *Retina: Basic Science, Inherited Disease and Tumors* Mosby, St Louis, 362-460
- Wingate RJ, Thomson ID (1994) Targeting and activity-related dendritic modification in mammalian retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience* **14**, 6621-6637
- Witkovsky P (2004) Dopamine and retinal function. *Documenta Ophthalmologica* **108**, 17-40

- Wong KY, Dunn FA, Graham DM, Berson DM (2007) Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *Journal of Physiology* **582**, 279-296
- Yokoyama R, Yokoyama R (2000) Comparative molecular biology of visual pigments. In Molecular Mechanisms in Visual Transduction. Stavenga DG, De Grip WJ, Pugh EN ed. *Elsevier Science Publishing Co. Inc.* New York 257-296
- Yokoyama S (2000) Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Progress in Retina and Eye Research* **19**, 385-419
- Zhang DQ, Zhou TR, McMahon DG (2007) Functional heterogeneity of retinal dopaminergic neurons underlying their multiple roles in vision. *The Journal of Neuroscience* **27**, 692-699
- Zuker CS (1996) The biology of vision of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **93**, 571-576



El presente trabajo investiga los aspectos menos explorados del sistema visual de ratones que sufren una degeneración retiniana, a la vez que profundiza en el estudio del posible efecto neuroprotector de la proinsulina. En la retina de los vertebrados existen dos sistemas de fotorrecepción: los bastones y los conos, y ambos forman parte de la vía visual de la retina desempeñando funciones de percepción visual. Recientemente, se ha descrito un tercer tipo de célula fotosensible en la retina, las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), encargadas de regular funciones no visuales, como por ejemplo el ritmo circadiano. Esta Tesis Doctoral plantea, mediante experimentos de conducta animal, el estudio funcional de las dos vías de la retina, la visual y la no visual, de forma comparativa entre ratones que sufren degeneración retiniana y ratones controles sanos. Asimismo, mediante tinciones inmunohistoquímicas, se estudia la morfología de las ipRGC en retinas con diferentes niveles de degeneración. Por último, la Tesis profundiza sobre el posible efecto neuroprotector de la proinsulina en la retina del ratón distrófico. Los resultados muestran cambios en los procesos dendríticos de las ipRGC de los ratones distróficos y una pérdida funcional de su vía visual. Por el contrario, la degeneración no afecta la función intrínseca de las ipRGC, aunque sí modifica la regulación endógena del ritmo circadiano del ratón distrófico. La proinsulina parece disminuir en todos los casos estudiados los efectos de la degeneración retiniana.