

FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.



Universidad de Alcalá

**MECANISMOS NEURALES DE
ADAPTACIÓN A LA LUZ Y OSCURIDAD.
ESTUDIO COMPARATIVO EN RATONES
CONTROLES Y MODELOS DE
DEGENERACIÓN RETINIANA.**

TESIS DOCTORAL.

JAVIER VICENTE TEJEDOR.

Madrid, 2009.

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.



**MECANISMOS NEURALES DE
ADAPTACIÓN A LA LUZ Y OSCURIDAD.
ESTUDIO COMPARATIVO EN RATONES
CONTROLES Y MODELOS DE
DEGENERACIÓN RETINIANA.**

TESIS DOCTORAL.

JAVIER VICENTE TEJEDOR.

Madrid, 2009.

D^a. María Luisa Díez Marqués, Directora del Departamento de Fisiología de la
Universidad de Alcalá

CERTIFICA

que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título "*Mecanismos neurales de adaptación a la luz y oscuridad. Estudio comparativo en ratones controles y modelos de degeneración retiniana*", ha sido realizada por D. **Javier Vicente Tejedor**, bajo la dirección del Profesor D. Pedro de la Villa en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá, y que el Consejo de Departamento de Fisiología, reunido en sesión ordinaria con fecha de 26 de octubre de 2009 aprobó su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 9 de Noviembre del año 2009.



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

CERTIFICA

que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título "*Mecanismos neurales de adaptación a la luz y oscuridad. Estudio comparativo en ratones controles y modelos de degeneración retiniana*", que presenta D. **Javier Vicente Tejedor** 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 9 de Noviembre del año 2009.

*A mis padres, por entenderme sin tener que decir.
A Ana por ser ese presente y ese futuro tan indispensable.*

*“Un buen científico es aquel que
puede unir su imaginación con la
realidad mediante el puente de la ciencia”
A. Berardin.*

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN FINANCIADOS.

- Neurodegeneraciones retinianas: Caracterización molecular, celular y electrofisiológica de su progresión y de la posible atenuación del proceso degenerativo por proinsulina. *Dirección General de Investigación. MICYT. SAF-04-5870-C02-01. DESDE: 20/10/05, HASTA: 19/10/09.*
- Prevención de la ceguera en un modelo animal de distrofia retiniana de curso temporal lento. *Universidad de Alcalá – Comunidad Autónoma de Madrid. CCG06-UAH BIO-0711. DESDE: 01/01/07, HASTA: 31/12/07.*
- Mecanismos de regulación fisiológica de la muerte celular programada y su extrapolación a terapia de enfermedades neurodegenerativas. *Dirección General de Investigación. MICYT. SAF-07-66175-C02-02. DESDE: 01/01/08, HASTA: 31/12/10.*
- Patología ocular del envejecimiento, calidad visual y calidad de vida. *Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)- RETICS.RD07/0062/0008. DESDE: 01/01/2008, HASTA: 31/12/2011.*

ARTÍCULOS (EN PREPARACIÓN)

Vicente-Tejedor, J.; Forns, N.; de la Villa, P.

“Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: functional role in light adaptation”
Visual Neuroscience, en preparación. Factor de impacto (IP): 2,149.

Vicente-Tejedor, J. y de la Villa, P.

“Functional role of the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in circadian activity”
Journal of Neuroscience, en prelación. Factor de impacto (IP): 8,502.

Vicente-Tejedor, J.; Gómez-Vicente, V.; de la Villa, P.

“Adaptational mechanisms mediated by protein kinase C in the mouse retina during the circadian rhythm: a quantitative analyses”
Journal of Neurochemistry, en preparación. Factor de Impacto (IP): 4,969.

COMUNICACIÓN A CONGRESOS

Vicente-Tejedor, J.; Forns, N.; de la Villa, P.

“Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: functional role uin light adaptation”
Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SCEF). Valladolid, Julio 2007.

Forns, N.; **Vicente-Tejedor, J.;** Germáin, F.; de la Villa, P.

“Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles: papel funcional en la adaptación a la luz”
Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias (SENC). Valencia, Octubre 2007.

Barhoum, R.; **Vicente-Tejedor, J.;** Germáin, F.; de la Villa, P.

“Glutamate mediated responses in bipolar cells of the rd10 mouse”
Associatin for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, Mayo 2007. Investigative Ophthalmology and Visual Science 47: E-4485, www.iovs.org (2007).

Marchena, M.; **Vicente-Tejedor, J.;** Lara, J.; Aijon, J.; Barhoum, R.; de la Villa, P.; Velasco, A.

“The retina of PCD Mouse as model photoreceptors degeneration Structural and functional study”
Associatin for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, Mayo 2007. Investigative Ophthalmology and Visual Science 47: E-3716, www.iovs.org (2007).

de la Villa, P.; Ramírez, L.; **Vicente-Tejedor, J.**

“Expression and activation of protein kinase C in rod bipolar cells depends of the Circadian Rhythm”

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, Mayo 2008. Investigative Ophthalmology and Visual Science 48: E-1668, www.iovs.org (2008).

Vicente-Tejedor, J.; Forns, N.; Germáin, F.; de la Villa, P

“Funtional Role of Intrinsically Photosensitive retinal Ganglion Cells in Light Adaptation”

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, Mayo 2008. Investigative Ophthalmology and Visual Science 48: E-1674, www.iovs.org (2008).

Vicente-Tejedor, J.; Ramírez, L.; Gómez-Vicente, V.; de la Villa, P.; Turton, M.; Hughes, S.; Hardlford, S.; Foster, R.

“the differential circadian retinal protein expression under the control of light in C57BL6/j and Rd10 mice”

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, Mayo 2009. Investigative Ophthalmology and Visual Science 49: E-1271, www.iovs.org (2009).

Vicente-Tejedor, J.; Ramírez, L.; de la Villa, P.

“Papel funcional de las células ganglionares fotosensibles en la actividad circadiana y en los mecanismos retinianos de adaptación lumínica”

Sociedad Española de Neurociencias (SENC). Tarragona, Septiembre 2009.

PREMIOS

- 1º Premio del "I Concurso de ideas para la creación de empresas de base tecnológica. Universidad de Alcalá". Pedro de la Villa, Rima Barhoum, Nuria Forns, **Javier Vicente**. Título del Proyecto: Evaluación No Invasiva del Sistema Visual en Animales de Laboratorio (ENISVAL). Octubre 2006.
- Premio “American for Research in Vision and Ophthalmology – International Travel Grant” al trabajo presentado en ARVO 2009. Título: “The differential circadian retinal protein expression under the control of light in C57BL6/j and Rd10 mice”

ESTANCIAS EN OTROS CENTROS DE INVESTIGACION

- Centro: Departamento de Biología Celular y Patología, Facultad de Medicina, *Universidad de Salamanca*. Salamanca, España. 2007. Innovación en técnicas de marcaje inmunohistoquímico. Estancia breve: 8 semanas.
- Centro: Circadian and Visual Neuroscience Group Nuffield Lab of Ophthalmology. *University of Oxford*. Oxford. Inglaterra. 2008. Aprendizaje de diversas Técnicas Moleculares y Genéticas. Estancia breve: 16 semanas.

El autor de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de una beca de investigación predoctoral BES-2005-8339, asociada al Proyecto de Investigación SAF2004-5870-C02-01 durante los años 2005, 2006 y 2007, y de un contrato de investigación asociado al proyecto SAF-07-66175-C02-02 durante los años 2007, 2008 y 2009.

La retina es una porción del Sistema Nervioso Central (SNC) formada por una red de neuronas especializadas que procesan diferentes aspectos de las señales visuales. En esta compleja red neuronal, los estímulos luminosos desencadenan respuestas eléctricas y químicas que activan diferentes vías paralelas en la transmisión de la información hacia las distintas áreas del SNC. La clásica vía visual “formadora de imágenes” se inicia con el proceso de transformación de la energía lumínica en energía eléctrica a nivel de los fotorreceptores clásicos, conos y bastones. Sin embargo, existe una segunda vía, en la que estos fotorreceptores clásicos no parecen estar involucrados, que ha sido definida como la vía “no formadora de imágenes”, en la que las células con papel más relevante son las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs), células portadoras de melanopsina. Las proyecciones centrípetas de esta vía “no formadora de imágenes” son regiones del SNC relacionadas con los ritmos circadianos y reflejo pupilar entre otros. A pesar de ello, no está claro si estos nuevos fotorreceptores también juegan un papel modulador en la visión clásica “formadora de imágenes”.

En la presente Tesis Doctoral planteamos el papel de las ipRGCs en la adaptación lumínica atendiendo a las relaciones inter-retinianas de estas células con diferentes tipos celulares. Estudiamos la implicación que tienen las ipRGC sobre la expresión circadiana de ciertas proteínas retinianas. Asimismo, hemos inter-relacionado los mecanismos moleculares con la modulación que ejercen dichas células sobre la respuesta funcional de la retina, analizada mediante la técnica electrorretinográfica. Por último, hemos estudiado el mecanismo de compensación que desarrollan las ipRGCs ante desincronizaciones del ritmo circadiano con la fase del ciclo de 24 horas. Por tanto, en la presente Tesis Doctoral analizamos ciertos aspectos estructurales, funcionales y conductuales relacionados con el papel que juegan las ipRGCs en diferentes escenarios lumínicos.

Los estudios celulares y moleculares (inmunocitoquímica y Western blot) nos han permitido comprobar la existencia de una ritmicidad en la expresión proteica de la Proteína Kinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos ($PKC\alpha$) y que ésta podría estar modulada por la melanopsina. Asimismo, el estudio de otras proteínas (NKCC1, TH) nos ha indicado que la expresión circadiana de las proteínas, con esos patrones rítmicos, puede darse con al menos la presencia de un único tipo de célula fotosensible en la retina. A través de los estudios electrorretinográficos hemos comprobado el papel modulador de las células portadoras de melanopsina sobre la sensibilidad lumínica en condiciones fotópicas. Los cambios en la amplitud de las respuestas del ERG vienen determinados por la presencia activa o no de las ipRGCs, por lo que la sensibilidad de la retina depende de la iluminación recibida y no del ritmo circadiano. El análisis de los procesos de resincronización de la actividad del animal con el ciclo luz/oscuridad, ha aportado datos acerca del papel modulador de las ipRGCs en los reajustes de los ritmos circadianos del animal. Los desajustes horarios producidos por un acortamiento de fase son más difíciles de resincronizar que aquellos producidos por alargamiento de fase. El hecho de que los animales con degeneración retiniana presenten idénticos tiempos de resincronización que el animal sano nos permite concluir que las ipRGCs son necesarias y suficientes para llevar a cabo el proceso de resincronización de la actividad circadiana con el ciclo luz/oscuridad.

The retina is a portion of the Central Nervous System (CNS) which contains a set of specialized neurons that are organized in an intricate neural network. Such network organization allows discriminating and encoding the many different light signals from the visual world. The light that reaches the retina is transduced in a series of electrical and chemical responses that activate different parallel pathways that transmit the coded signals towards the different areas of the CNS. The classical “image-forming” pathway starts with the transduction of light energy into electric energy by rods and cones photoreceptors. Nevertheless, there exists a second pathway in which these classic photoreceptors do not seem to be involved. This route is termed as the “non-image forming” pathway and the cells responsible for the phototransduction machinery are the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs), which express melanopsin. The central projections of the “no-image forming” pathway are directed to the CNS areas related to non-visual functions such as circadian rhythms and pupillary reflex, among others. By now, it remains unclear whether these new photosensitive cells play any modulatory role in the classical “image-forming” vision.

In the present Doctoral Thesis we raise the modulatory role of the ipRGCs on retinal molecules involved in light adaptation processes, due to the cell contacts that ipRGC make with other retinal cellular types. All experiments were carried out in mice; wild type animals and mouse models of photoreceptor dysfunction have been used. We initially studied the influence of ipRGCs on the circadian expression of certain cell specific proteins such as the protein kinase C alpha (PKC α), the sodium – potassium – chloride co-transporter (NKCC) and tyrosine hydroxylase (TH) by the use of immunohistochemical technique and western blotting. Secondly, we tried to test the putative modulatory effect of ipRGC on the retinal functional response, analyzed by means of electroretinographic recording (ERG). Finally, we focused on the role played by the ipRGC on the resynchronization of circadian rhythms after changes in light/dark phases of the 24 hours cycle. In summary, we analyzed a series of molecular, functional and behavioural aspect of the light adaptation process that may be modulated by the ipRGCs in the mouse retina.

The molecular studies allowed us to demonstrate the existence of a circadian rhythm of the PKC α expression, which may be modulated by the melanopsin containing cells. Likewise, the study of NKCC1 and TH showed us that the circadian expression of these proteins needs the presence of, at least, one type of photosensitive cell in the retina. Across the ERG studies we have verified the modulatory role of melanopsin containing cells on the retinal sensitivity. In this sense, retinal light sensitivity is shown to be related to the active presence of the ipRGCs; it depends on the light received by the retina, but is independent of the circadian rhythm. Behavioural experiments allowed us to demonstrate that the resynchronization of the circadian activity after changes in light/dark phases of the 24 hours cycle is dependent solely on the ipRGC activity. The hourly disruption produced by a phase shortening is resynchronized slower than those produced by phase stretching. These experiments, carried out in wild type and dystrophic animals, allowed us to conclude that the ipRGCs are necessary and sufficient for the processes of resynchronization of the circadian activity with the light/dark cycle.

ÍNDICE

<i>Resumen del Curriculum vitae</i>	<i>i</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Summary</i>	<i>v</i>
INDICE	vii
<i>Índice de Figuras, Tablas y Láminas</i>	<i>xv</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>xxi</i>

INTRODUCCIÓN	1
<i>Paseo evolutivo</i>	4
1) BIOLOGÍA CELULAR DE LA RETINA	8
1.1- <i>UBICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA RETINA</i>	10
1.2- <i>TIPOS CELULARES</i>	13
1.2.1. <i>Epitelio pigmentario</i>	13
1.2.2. <i>Tipos Neuronales</i>	15
1.2.2.1. <i>Fotorreceptores</i>	17
1.2.2.2. <i>Células Bipolares</i>	21
1.2.2.3. <i>Células Horizontales</i>	22
1.2.2.4. <i>Células Amacrinas</i>	23
1.2.2.5. <i>Células Ganglionares</i>	24
1.2.3. <i>Tipos no Neuronales</i>	30
1.3- <i>RED VASCULAR</i>	33
2) FISIOLOGÍA DE LA RETINA	32
2.1- <i>VIA VISUAL</i>	35
2.1.1. <i>Adaptación a la luz y a la oscuridad</i>	33
2.1.2. <i>Fototransducción</i>	38
2.1.3. <i>Transmisión de la información a través de la retina</i>	42

2.1.3.1. Vía Centrípetas	43
2.1.3.2. Vía Transversal	45
2.2- <i>VIA NO VISUAL</i>	46
<i>La fototranscripción de las células ganglionares</i>	49
2.3- <i>PROTEÍNAS EN LA FISIOLÓGIA DE LA RETINA</i>	51
2.3.1. <i>Proteína Kinasa C</i>	51
2.3.2. <i>Cotransportador Cloro</i>	53
2.3.3. <i>Melanopsina</i>	54
2.3.4. <i>Tirosina Hidroxilasa</i>	55
2.3.5. <i>Calbindina</i>	55
3) ELECTORRETINOGRAMA	57
3.1- <i>ELEMENTOS DEL ERG</i>	58
3.1.1. <i>Tipos de ERG</i>	58
3.1.2. <i>Orígenes de las Respuestas</i>	60
3.1.3. <i>Estandarización de las respuestas del ERG</i>	63
4) DEGENERACIONES RETINIANAS	65
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	73
1.1- <i>MODELOS ANIMALES</i>	73
1.2- <i>CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS RATONES</i>	76
1.3- <i>RITMOS LUZ/OSCURIDAD Y RITMOS BIOLÓGICOS</i>	76
2) TÉCNICAS MOLECULARES	79
2.1- <i>MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO</i>	79
2.1.1. <i>Fijación, encastrado y corte</i>	79
2.1.2. <i>Protocolo de Inmunotinción</i>	80
2.1.3. <i>Obtención de imágenes y Análisis de la inmunoreactividad</i>	83
<i>Análisis cuantitativo del grado de inmunofluorescencia</i>	84
2.1.4. <i>Inmunocitoquímica en tejidos con marcaje retrógado</i>	85

2.2- DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS- POLIACRILAMIDA MEDIANTE WESTERN BLOT	85
2.2.1. Obtención de las muestras	86
2.2.2. Fraccionamiento celular	87
2.2.3. Cuantificación proteica	90
2.2.4. Revelado de la proteína	90
2.2.5. Transferencia	92
2.2.6. Incubaciones	92
2.2.7. Revelado	93
2.2.8. Densitometría	94
3) REGISTRO ELECTORRETINOGRÁFICO	96
3.1- FUENTES DE ILUMINACIÓN	96
3.2- PREPARACIÓN DEL ANIMAL	97
3.3- TÉCNICA DE REGISTRO	99
4) ACTIVIDAD CIRCADIANA	101
<i>Protocolos de actuación</i>	102
RESULTADOS	109
CAPÍTULO 1: Estudio Molecular	113
1.1- MELANOPSINA	113
1.2- PROTEÍNA KINASA C α (PKC α)	116
1.2.1. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón control	118
1.2.2. Western blot para PKC α en el ratón control	122
1.2.3. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón distrófico Rd10	124
1.2.4. Western blot para PKC α en el ratón distrófico Rd10	126
1.2.5. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón Knock Out Opn4	128
1.2.6. Western blot para PKC α en el ratón Knock Out para Opn4	130
1.3- COTRANSPORTADORES Na ²⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ (NKCC1)	132
1.3.1. Inmunorreactividad de NKCC1	133
1.3.2. Western blot de NKCC1	134
1.4- TIROSINA HIDROXILASA	136

1.4.1. <i>Inmunorreactividad a TH</i>	136
1.4.2. <i>Western blot de TH</i>	137
ICONOGRAFÍA: Láminas	139
CAPÍTULO 2: Electrorretinografía	171
1.1- <i>ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS EN EL ESTUDIO FUNCIONAL FOTÓPICO DE LA RETINA, EN DIFERENTES CONDICIONES LUMÍNICAS DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD</i>	171
Registro electrorretinográfico estándar	174
1.1.1. <i>Registro en condiciones lumínicas naturales</i>	177
1.1.2. <i>Registro en condiciones lumínicas subjetivas</i>	179
1.1.3. <i>Registros en condiciones lumínicas naturales, con cambios en la intensidad de la luz expuesta</i>	182
1.2- <i>ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS ANTE UN ESTÍMULO BREVE E INTENSO, CON DIFERENCIAS EN LAS CONDICIONES LUMÍNICAS DE INICIO Y FIN DE CADA EXPERIMENTO</i>	185
Registro electrorretinográfico estándar	187
1.2.1. <i>Análisis de la Onda b</i>	189
1.2.2. <i>Análisis de la Onda a</i>	194
CAPÍTULO 3: Actividad Circadiana	199
1.1- <i>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN RATONES CONTROL ANTE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS.</i>	201
1.1.1. <i>Protocolos de Acortamiento</i>	201
1.1.2. <i>Protocolos de Alargamiento</i>	203
1.2- <i>ANÁLISIS DE LA REACCIÓN ANTE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS EN RATONES CON DEGENERACIÓN RETINIANA (Rd10)</i>	205
1.2.1. <i>Protocolos de Acortamiento</i>	205
1.2.2. <i>Protocolos de Alargamiento</i>	206

DISCUSIÓN	209
CAPÍTULO 1: Estudio Molecular	211
CAPÍTULO 2: Electrorretinografía	221
CAPÍTULO 2: Actividad Circadiana	229
CONCLUSIONES	233
<i>Bibliografía</i>	237
<i>Agradecimientos</i>	265

Listado de Figuras y Tablas

FIGURAS

Figura 1. Evolución del órgano visual	6
Figura 2. Tipos de células fotosensibles	8
Figura 3. Partes del ojo	11
Figura 4. Capas de la retina	13
Figura 5. Tipos Celulares	16
Figura 6. Espectros de absorción de los distintos pigmentos fotoexcitables	18
Figura 7. Esquema de fotorreceptores en humanos	20
Figura 8. Tipos de células Bipolares	21
Figura 9. Tipos de células ganglionares melanopsínicas en función de la arborización de sus dendritas	27
Figura 10. Árbol filogenético de los organismos con simetría bilateral	29
Figura 11. Tipo y localización de células gliales	32
Figura 12. Venas y arterias intrínsecas de la retina	33
Figura 13. Sensibilidad lumínica de conos y bastones	36
Figura 14. Adaptación de la retina a las condiciones lumínicas	37
Figura 15. Bastón y rodopsina	39
Figura 16. Transducción fotoeléctrica	41
Figura 17. Generación de las vías ON-OFF de procesamiento sensorial	44
Figura 18. Proyecciones de las células ganglionares de la vía no visual	48
Figura 19. Ondas de un electroretinograma en un registro fotópico	61
Figura 20. Esquema de los cinco registros de un electroretinograma estándar en condiciones fisiológicas	64
Figura 21. Capas nucleares de los diferentes modelos animales	74
Figura 22. Ritmos y ciclos naturales	78
Figura 23. Protocolo de análisis de la inmunorreactividad	84
Figura 24. Esquema del proceso de extracción de muestras para Western blot	87
Figura 25. Fuentes de Iluminación	97
Figura 26. Esquema de la disposición de los electrodos	99
Figura 27. Componentes del equipo de registro	100
Figura 28. Representación de los escenarios de los cambios de fase del ciclo luz/oscuridad	102
Figura 29. Jaulas de actividad y representación de un Actograma	104
Figura 30. Actogramas de la actividad registrados durante dos protocolos diferentes	105
Figura 31. Representación del análisis de la actividad circadiana	107
Figura 32. Colocalización de melanopsina y DTMR a nivel de la Capa Ganglionar en un ratón control	114
Figura 33. Marcaje inmunocitoquímico de células bipolares de bastón	118
Figura 34. Representación gráfica de la inmunorreactividad en soma y terminal axónica de PKC α en animales control	119
Figura 35. Comparación de la inmunorreactividad entre soma y terminal axónica de PKC α en animales control	121
Figura 36. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en animales control	122
Figura 37. Análisis del tanto por ciento de Translocación de PKC α	123

Figura 38. Representación gráfica de la inmunorreactividad en soma y terminal axónica de PKC α en Rd10	124
Figura 39. Comparación de la inmunorreactividad entre soma y terminal axónica de PKC α en Rd10	125
Figura 40. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en Rd10	126
Figura 41. Análisis del tanto por ciento de Translocación de PKC α en Rd10	127
Figura 42. Comparación de la inmunorreactividad entre soma y terminal axónica de PKC α en Opn4KO	129
Figura 43. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en Opn4KO	130
Figura 44. Análisis por Western blot de la presencia de NKCC1 en citosol y membrana de ratón control a diferentes periodos del ritmo circadiano	135
Figura 45. Cuantificación de TH en el modelo animal control	137
Figura 46. Cuantificación de TH en el modelo animal Rd10	138
Figura 47. Cuantificación de TH en el modelo animal Opn4 KO	138
Figura 48. Nomenclatura en el ciclo diurno de 24 horas	172
Figura 49. Condiciones lumínicas y tipos de células fotosensibles	173
Figura 50. Esquema de las respuestas electrorretinográficas ante estímulos de intensidad creciente	175
Figura 51. Representación gráfica del análisis de las amplitudes	176
Figura 52. Respuestas electrorretinográficas fotópicas ante estímulos de intensidad creciente	177
Figura 53. Resultados del análisis electrorretinográfico a tiempos ZT08 y ZT20	178
Figura 54. Resultados del análisis electrorretinográfico a tiempos CT08 y CT20	179
Figura 55. Análisis comparativo de las respuestas de los cuatro grupos experimentales	181
Figura 56. Resultados del análisis electrorretinográfico a tiempos ZT08', ZT20', CT20 y CT08 con fase de luz de baja intensidad lumínica	182
Figura 57. Análisis comparativo de las respuestas de los cuatro grupos experimentales	183
Figura 58. Análisis comparativo de los resultados obtenidos	184
Figura 59. Grupos Experimentales	187
Figura 60. Estimación de las amplitudes de la <i>onda a</i> y <i>onda b</i>	188
Figura 61. Esquema de los grupos de estudio y registros electrorretinográficos realizados	189
Figura 62. Resultados de la <i>onda b</i> en los experimentos del grupo ZT20 0_200	190
Figura 63. Resultados de la <i>onda b</i> en los experimentos del grupo ZT08 200_20	191
Figura 64. Resultados de la <i>onda b</i> en los experimentos del grupo ZT08 20_200	192
Figura 65. Resultados de la <i>onda b</i> en los experimentos del grupo ZT08 20_20	193
Figura 66. Resultados de la <i>onda a</i> en los experimentos del grupo ZT20 0_200	195

Figura 67. Resultados de la <i>onda a</i> en los experimentos del grupo ZT08 200_20	196
Figura 68. Resultados de la <i>onda a</i> en los experimentos del grupo ZT08 20_200	197
Figura 69. Resultados de la <i>onda a</i> en los experimentos del grupo ZT08 20_20	198
Figura 70. Análisis cuantitativo de la resincronización inducida por desfase horario	200
Figura 71. Resincronización circadiana ante el <i>Acortamiento</i> de las fases de luz y oscuridad en animales control	202
Figura 72. Resincronización circadiana ante el <i>Alargamiento</i> de las fases de luz y oscuridad en ratones control	204
Figura 73. Resincronización circadiana ante el <i>Acortamiento</i> de las fases de luz y oscuridad en ratones Rd10	206
Figura 74. Resincronización circadiana ante el <i>Alargamiento</i> de las fases de luz y oscuridad en ratones Rd10	207
Figura 75. Comparación de la constante de tiempo τ para los dos modelos animales en cada protocolo de experimentación	208
Figura 76. Análisis de la <i>onda a</i> en los diferentes grupos entre los registros a 10 y 50 minutos	227
Figura 77. Análisis de la <i>onda b</i> en los diferentes grupos entre los registros a 10 y 50 minutos	228

TABLAS

Tabla I - Relación de proteínas utilizadas y tipos celulares	80
Tabla II - Relación de anticuerpos primarios utilizados	81
Tabla III - Relación de anticuerpos secundarios utilizados	81
Tabla IV - Intercaladores de ADN	82
Tabla V - Tampón Hipotónico	88
Tabla VI - Composición de RIPA	89
Tabla VII - Composición gel Estancado	91
Tabla VIII - Composición gel Resolutor	91
Tabla IX - Composición tampón de carga	92
Tabla X - Relación de anticuerpos en la incubación de Membranas de Western blot	93
Tabla XI - Resumen de la relación estadística de los grupos a nivel del soma	120
Tabla XII - Resumen de la relación estadística de los grupos a nivel de la terminal	120

LÁMINAS

Lámina 1. Tipos celulares	141
Lámina 2. Ejemplos de confluencia positiva y no confluencia entre melanopsina y Brn3a en C57BL6J (<i>wt</i>) y Rd10	143
Lámina 3. Doble tinción de células de la capa ganglionar (CG) con DTMR y α -Melanopsina	145
Lámina 4. Tipos de ipRGCs en base a la arborización de sus procesos dendríticos	147
Lámina 5. Tipos de ipRGCs en base a la arborización de sus procesos dendríticos (II)	149
Lámina 6. Colocalización del marcaje positivo de Melanopsina con TH y PKC	151
Lámina 7. Expresión de PKC en células bipolares de ratones C57BL6J	153
Lámina 8. Expresión de PKC en células bipolares de ratones Rd10	155
Lámina 9. Expresión de PKC en células bipolares de ratones Opn4 KO	157
Lámina 10. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en soma de células horizontales	159
Lámina 11. Expresión de NKCC1 en células horizontales en retina de ratones control	161
Lámina 12. Expresión de NKCC1 en células horizontales en retina de ratones Rd10	163
Lámina 13. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en ZT06 para C57, Rd10 y Opn4KO	165
Lámina 14. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en ZT18 para C57, Rd10 y Opn4KO	167
Lámina 15. Expresión de NKCC1 a diferentes edades en retinas de Rd10	169

Lista de Abreviaturas

- AII:** amacrinas tipo II
AANAT: enzima arylalkylamina N-acetiltransferasa
Ac: anticuerpo
AchT: transferasa de acetil colina
AD: amacrinas dopaminérgicas
ADN: ácido desoxirribonucleico
ATP: adenosín trifosfato
BSA: albúmina sérica bovina (bovine serum albumine)
Ca²⁺: calcio
cd/m²: unidad de luminancia, candela partido metro cuadrado
CFNO: capa de fibras del nervio óptico
CG: capa ganglionar
CNE: capa nuclear externa
CNI: capa nuclear interna
Cono L: cono con sensibilidad de onda larga (Long)
Cono M: cono con sensibilidad de onda media (Medium)
Cono S: cono con sensibilidad de onda corta, (Short)
CPE: capa plexiforme externa
CPI: capa plexiforme interna
CS: colículo superior
CT: circadian time
DAG: diacil glicerol
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
DMAE: degeneración macular asociada a la edad
DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina
DTMR: dextrano tetrametil rodamina (dextran tetramethylrhodamine)
EP: epitelio pigmentario
EPR65: proteína 65 del epitelio pigmentario de la retina
ERG: electroretinograma
GABA: ácido gamma-aminobutírico (γ -aminobutiric acid)
GDP: guanosín difosfato
Glut: glutamato
GMPC: guanosín monofosfato cíclico
Gq: proteína G, tipo Gq
Gt: proteína G, tipo transducina
GTP: guanosín trifosfato
Hsp: proteína de choque térmico (hot shock protein)
IgG: inmunoglobulina G
IPr: yoduro de propidio
IP₃: inositol trifosfato
IPDE: enzima inhibidora de la fosfodiesterasa
ipRGC: célula ganglionar intrínsecamente fotosensible (intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells)
IR: inmunorreactividad
ISCEV: Sociedad Internacional para la Clínica Electrofisiológica de la Visión (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision).
K⁺: potasio
KCC: cotransportador potasio-cloro
KDa: kilodalton

- KO:** Knock out
- LED:** diodo emisor de luz (light emission diode)
- Lrat:** Lecitin-retinol acil transferasa
- LW:** opsina de conos L (Long Wave opsin)
- Lys:** aminoácido lisina
- M1:** células melanopsínicas tipo 1
- M2:** células melanopsínicas tipo 2
- M3:** células melanopsínicas tipo 3
- mjERG:** electroretinograma multifocal
- mGluR6:** receptor metabotrópico para el glutamato tipo 6
- MLE:** membrana limitante externa
- MLI:** membrana limitante interna
- MRII:** metarrodopsina II
- MW:** opsina de conos M (Medium Wave opsin)
- Na⁺:** sodio
- NGLd:** núcleo geniculado lateral dorsal
- NKCC:** cotransportador sodio-potasio-cloro
- NO:** nervio óptico
- NOP:** núcleo de la oliva pretectal
- NSC:** núcleo supraquiasmático
- OP:** potencial oscilatorio
- PA:** potencial de acción
- PBS:** tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)
- PDE:** fosfodiesterasa
- PDE-GMPc:** fosfodiesterasa dependiente de GMPc.
- PFA:** paraformaldehído
- PIP₂:** fosfatidil-inositol fosfato
- PKC:** proteína quinasa C
- PKM:** proteína quinasa M
- PLC:** fosfolipasa C
- pX:** edad postnatal. X=número de días de desarrollo postnatal
- Rd:** degeneración de bastones (rod degeneration)
- RP:** retinosis pigmentaria
- RPE65:** ver EPR65
- rpm:** revoluciones por minuto
- Rx:** retina homeobox, factor de transcripción
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- SF:** segmento externo de los fotorreceptores
- SNC:** sistema nervioso central
- STR:** respuesta umbral escotópica (scotopic threshold response)
- SW:** opsina de conos S (Short Wave opsin). Tipo 1, SW₁ y tipo 2, SW₂
- TBS:** tampón Tris salino (Tris Buffer Saline)
- TH:** enzima tirosina hidroxilasa
- WB:** Western blot
- wt:** wild type
- ZT:** zeitgeber time

INTRODUCCIÓN

La capacidad de observar y conocer el entorno es una virtud de gran importancia para los seres vivos. Es quizá por ello que el ser humano se ha sentido siempre maravillado con el sentido de la vista. No en vano, la tremenda complejidad organizativa de los diferentes elementos para proveernos de vista, lo ha situado en primera línea de importancia dentro de los sistemas sensoriales.

En la evolución de la civilización humana hay numerosos ejemplos de la importancia adquirida por los ojos, como elemento más destacado de este sentido. Existen representaciones de divinidades y héroes del periodo neolítico, las cuales se destacaban por unos ojos de gran tamaño o eran iluminados por ellos. En la civilización egipcia el ojo adquiere un papel aún mayor como divinidad, pero también como fuente de cura y protección. En su mitología destaca el pasaje de las encarnizadas luchas entre Horus, hijo de Osiris, y Seth, tío del primero y asesino del segundo; en estas luchas la pérdida de un ojo deja a Horus mutilado, pero con la participación de Thot, le es reemplazado por el *Udyat* que significa “el que está completo”. Esta representación del ojo, *udyat*, fue utilizado como amuleto de gran poder y además fue la base de un sistema representativo de fracciones en medidas agrarias y de volumen. En Grecia era la mirada lo que distinguía a los hombres de los humanizados dioses. Ya en el siglo XVI el cristianismo incorpora, como representación de la divinidad, el ojo flotando en un cielo nebuloso.

En verdad, el ojo, la mirada, la visión, nos ha atraído y sorprendido grandemente. Sir Charles Darwin, en “El Origen de las Especies”, presenta como una dificultad para comprender su teoría de la selección natural el largo y enrevesado camino que ha debido de recorrer la evolución para formar un órgano tan complejo, desde elementos fotosensibles, en principio, más simples (Darwin, 1859).

Para comprender como se ha podido desarrollar la evolución de este órgano hay que basarse en la evolución acontecida sobre los elementos fotosensibles que lo configuran. La presencia de este elemento confería capacidad de ubicación del organismo en un entorno. En la naturaleza existe un amplio abanico de complejidad en cuanto a estructuras captadoras de luz, desde las estructuras más simples, en organismos

unicelulares, pasando por los pequeños avances en los invertebrados menos evolutivamente avanzados, a los niveles más complejos en los vertebrados.

Paseo evolutivo.

La primera referencia evolutiva que aparece, de elemento fotosensible, se da en un organismo eucariota unicelular antecesor del moderno *Euglena* (del griego: “organismo con verdadero ojo”). En él, la organela sensible a la luz se encuentra asociada al flagelo y es el desencadenante del mecanismo para el movimiento de éste. Esta pequeña contribución resultó una ventaja evolutiva de gran calado.

Los siguientes avances surgieron con la aparición de organismos pluricelulares. En ellos es posible una especialización de distintas células para mejorar la nueva función. Los organismos del filum cnidaria (como las medusas, dentro de la clase hydrozoa) o los moluscos como el gasterópodo *Patella* presentan estructuras sensoriales muy primitivas, denominadas **ocelos fotorreceptores**.

La forma más primitiva de estructura fotosensible son los ocelos organizados en una mancha. Esta mancha consiste en un tegumento que entremezcla células fotorreceptoras con células pigmentadas. Un pequeño avance, a formas más complejas, es la modificación en la localización de las distintas células de esa mancha. Con ello se focaliza mejor la incisión de los rayos. Esta nueva disposición configura algo semejante a una copa. En este modelo, las células pigmentarias son las que forman las paredes de la copa y en su interior se disponen los fotorreceptores. Este modelo de ojo permite básicamente y simplemente tener conciencia de la luz, lo que permite determinar un fotoperiodo, seguir un ritmo circadiano y localizar posibles peligros por detección de sombras (no detección de luz) ([Barnes y Ruppert, 1996](#)).

Un modelo intermedio lo presentan algunos anélidos en los que los fotorreceptores forman las paredes junto a pigmento y células de soporte. Pero también aparecen especies con grandes ojos abultados, que presentan capacidad de formación de imágenes. En la mayor parte de los gasterópodos la foseta o copa se ha cerrado y se han desarrollado hasta convertirse en ojos vesiculares dotados de una lente.

La gran diversidad animal ha requerido una mayor especialización de este órgano visual y una mayor complejidad de sus circuitos nerviosos, tanto para el predador como para la presa. Un avance de gran importancia reside en la acotación de la sensibilidad lumínica a un área muy pequeña, es decir, que uno o unos pocos fotorreceptores sean capaces de determinar la intensidad lumínica de una pequeña porción del campo visual. Al integrarse como puntos de diferente intensidad y proyectarse así a las zonas correspondientes del cerebro, las diferencias configuran una imagen. Esto se traduce en un progresivo aumento del número de células fotosensibles a lo largo de la evolución; a más células captadoras de luz más rayos son recogidos y transferidos como información sensorial.

Ojos de mayor complejidad aparecen perfectamente formados en los artrópodos, son los **ojos compuestos**. Insectos y crustáceos presentan unidades cilíndricas largas, denominadas **ommatidios** (son ojos simples). El recubrimiento externo de los ommatidios es una córnea translúcida que funciona como una lente. Y por detrás del mismo aparece también un cono cristalino que actúa como segunda lente. El elemento receptor de la luz está por debajo del ommatidio y recibe el nombre de **retínula**. Las superficies internas fotosensibles (**rabdómeros**) llevan numerosas microvellosidades. La estructura evoluciona por la posibilidad de especializar células a cometidos diferentes ([Barnes y Ruppert, 1996](#)).

En última instancia aparece el órgano visual más especializado del que muchos vertebrados son poseedores. El ojo, en esta configuración, ha sido comparado con las cámaras fotográficas por compartir elementos que realizan la misma función: el cristalino como lente, la pupila como diafragma o la retina como película. La imagen, al contrario que en el ojo compuesto de artrópodos, es única al contar con el trabajo colectivo de diferentes células con una marcada especialización.

Este modelo de órgano visual no es único de vertebrados, también se encuentra presente en algunos invertebrados como los cefalópodos; estando incluso más perfeccionado en estos últimos (**Figura 1**).

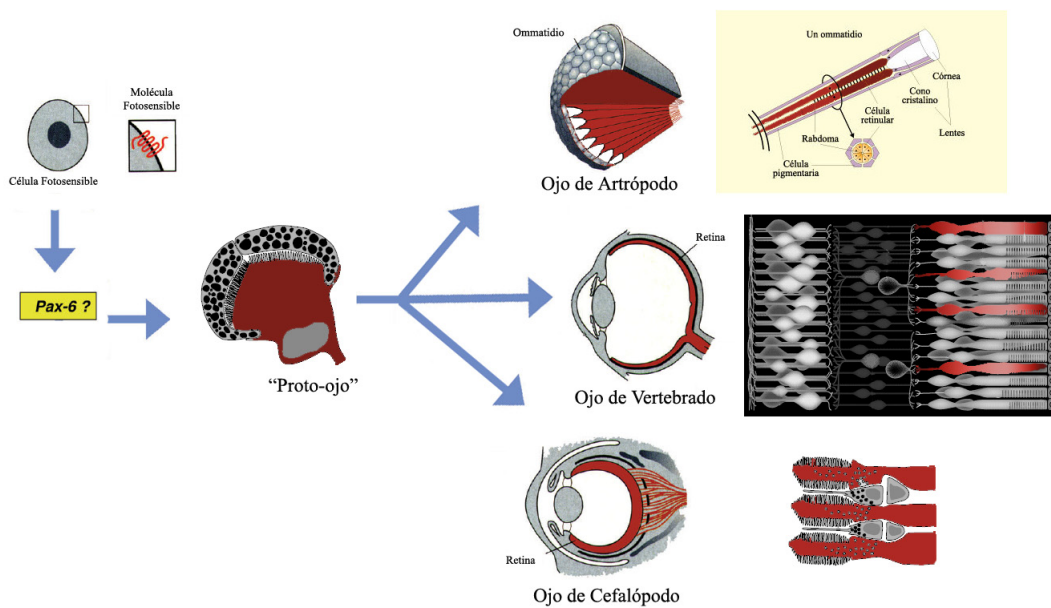


Fig1. Evolución del órgano visual. Los primeros organismos celulares con capacidad de transformar las vibraciones electromagnéticas de la luz en energía útil debieron de estar sometidos a diferentes factores, para la obtención de células especializadas en dicha función. En los organismos, ahora, pluricelulares la siguiente mejora tendría como objetivo un aumento en la eficacia; se agrupaban así las células con capacidad fotosensible en órganos visuales. Éstos fueron perfeccionando su estructura a lo largo de la evolución, presentando formas prácticamente tan definitivas como el ojo de algunos vertebrados o incluso invertebrados (cefalópodos). Modificado de *Gehring, 2004*.

La variedad de formas, más o menos complejas, de los órganos visuales de las diferentes superfamilias animales, requiere de una explicación acerca de su desarrollo evolutivo. Dos corrientes opuestas pretenden ofrecer una solución a dicha cuestión: o bien mediante una aparición independiente en la evolución ([Salvini-Plawen y Mayr, 1977](#)) o, por el contrario, por la aparición desde un origen común con la existencia de un “proto-ojo” ([Gehring e Ikeo, 1999](#); [Pichaud et al, 2001](#)). La primera teoría se sustenta en los dos diferentes procesos de desarrollo que presentan los ojos de invertebrados y vertebrados. A parte de una formación de imágenes diferente, los ojos de estos dos grupos, son derivados de distintas capas embrionarias: neuroectodermo en vertebrados y ectodermo en invertebrados. Además, la importancia del *homeobox*, que contiene el gen *rx*, en la proliferación celular es primordial en la formación de los ojos de vertebrados pero no en los invertebrados. Por otro lado, encontramos que el gen *pax6* en el ratón, homólogo del gen *eyeless* de *Drosophilla*, no es requerido en el inicio del desarrollo del

“ojo vertebrado” (Bailey et al, 2004). Con todo esto existe la posibilidad de que iniciales interacciones para la formación del “ojo invertebrado” sean disparadas por *pax6*, mientras que para la formación del “ojo vertebrado” el causante sea *rx*.

No obstante, existen trabajos que muestran un papel de genes ortólogos* en el desarrollo del “ojo vertebrado” que participan también en el desarrollo del “ojo invertebrado” (Hill et al, 1991; Quiring et al, 1994). Esto junto a trabajos que muestran la aparición de ojos ectópicos generados mediante sobreexpresión de *Pax6* y *eyeless* en *Drosophilla*, conducen a la idea de que *Pax6* es un importantísimo controlador del desarrollo del ojo (Gehring e Ikeo, 1999). *Pax6*, junto a otros factores de transcripción, se consideran esenciales para el normal desarrollo del ojo (Chow y Lang, 2001). Ambos ojos son generados por un repertorio de equivalentes acciones de genes en áreas similares del embrión (Bailey et al, 2004).

El último punto de análisis hace referencia a los diferentes grupos de células sensibles al estímulo luminoso. Los científicos conocen la existencia de dos tipos de células: *células fotosensibles rabdoméricas* y *células fotosensibles ciliadas* (Figura 2). Las primeras eran relacionadas exclusivamente a los invertebrados y su mecanismo de acción se encuentra asociado a una proteína Gq, la cual produce aumento de diacilglicerol (DAG) y Calcio al escindir fosfatidil-inositol (PIP2) por activación de una fosfolipasa (PLC) (Hardie y Ranghu, 2001; Minke y Parnas, 2006). Las segundas se relacionaban con organismos vertebrados; su cascada de activación implica también a una proteína G (Gt), sin embargo, su acción activa una fosfodiesterasa (PDE) (Arshavsky et al, 2002). Para ambos tipos celulares, la cantidad de energía lumínica traducida a energía luminosa será mayor ante mayor número de pigmentos fotosensibles expuestos. En ambos casos el aumento de la concentración de fotopigmento se alcanza por el aumento de superficie, con alguna diferencia: las células rabdoméricas aumentan los plegamientos de la superficie apical de la célula mientras que las ciliadas pliegan la membrana ciliar (Eakin, 1968; 1982). Las diferencias alcanzan también la maquinaria metabólica, existen factores de transcripción que son absolutamente necesarios para el desarrollo de las células ciliadas y no aparecen involucradas en el mismo mecanismo de células rabdoméricas. Es el caso del factor de transcripción *Rx*, *retina homeobox* (Mathers et al, 1997; Loosli et al, 2001; Davis et al, 2003).

*genes ortólogos = aquellos pertenecientes a dos especies diferentes, que son semejantes entre sí por tener un antepasado común.

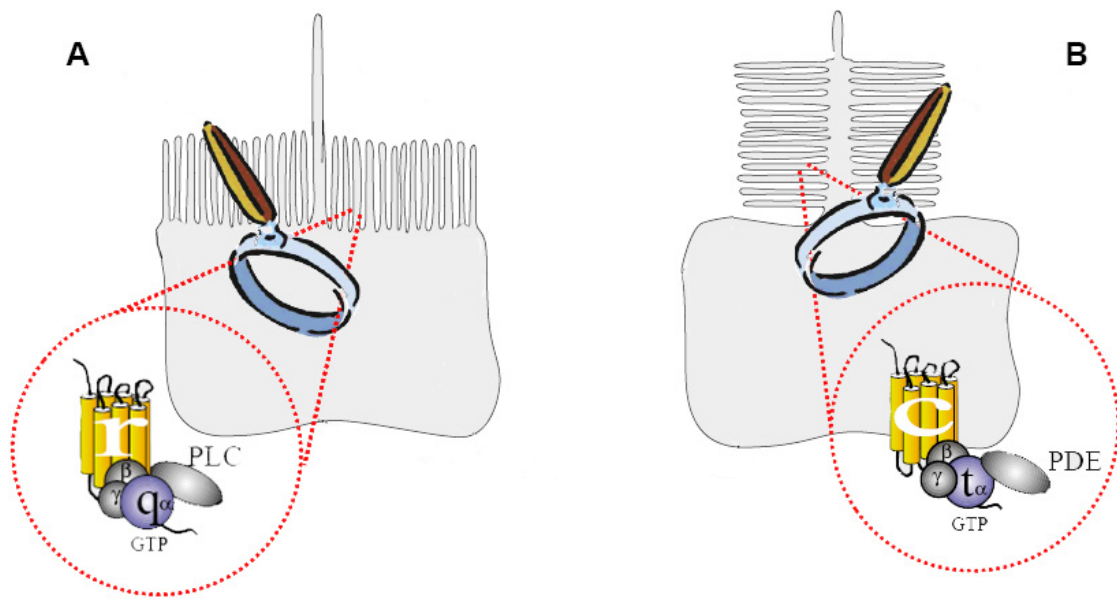


Fig2. Tipos de células fotosensibles. A- Esquema de célula rabdomérica con numerosos plegamientos en su superficie apical. La maquinaria fotoestimulable se localiza en la membrana de estas microvellosidades. La cascada incluye la activación de la Fosfolipasa C (PLC). B- Esquema de una célula ciliada. El cilio presenta numerosos plegamientos, e igual que en el modelo celular anterior, en la membrana plasmática de esos pliegues se encuentra la maquinaria fotosensible. La cascada de activación, en este caso, afecta a una Fosfodiesterasa (PDE). (r=Proteína heptahelicoidal u opsina de células rabdoméricas; c=opsina de células ciliadas). Modificado de *Arendt, 2003*.

Esta evidencia apoya la alternativa explicación de una evolución dependiente, o bien de *Pax6* o bien de *Rx*. Sin embargo, recientes publicaciones han mostrado la coexistencia de células de ambos tipos en cefalocordados ([Koyanagi et al, 2005](#)). Por tanto, la existencia de los dos tipos de células fotosensibles no permite la división en dos grupos evolutivos diferentes. Falta discernir si esto apunta más a una homología* que a una analogía evolutiva, no por la dificultad de la aparición de dos células con la misma función desde orígenes distintos, sino por la presencia de ambas en el mismo órgano.

Ante el supuesto de la existencia de un ojo ancestral surge la siguiente pregunta a responder: ¿cuál es el tipo de célula fotosensible en el “proto-ojo”? Trabajos en *Protostomos* y *Deuterostomos* apuntan, como más probable, la célula rabdomérica para ser dicha célula fotosensible. ([Ardent, 2003](#)).

Las investigaciones en diferentes *phylums* han mostrado la relación evolutiva entre estas células. En 2004 el Dr. Detlev Arendt y su grupo publicaron los estudios realizados en el poliqueto *Platynereis*, en los cuales hallaron la existencia de células fotosensibles ciliadas en el cerebro de este anélido junto con la presencia de células rabdoméricas, como elementos fotosensibles de los ojos (Arendt et al, 2004). Análisis comparativos entre ambos tipos de fotorreceptores señalan la divergencia evolutiva de estas células, con distintas opsinas, desde el más antiguo antecesor común de todos los organismos con simetría bilateral, *Urbilateria* (Arendt, 2001; Plachetzki et al, 2005).

Conocemos entonces la existencia de ambos tipos celulares en muchos invertebrados, pero ¿qué podemos decir de las retinas de los vertebrados? En éstas se conocen profundamente dos tipos de células fotosensibles ciliadas: conos y bastones. Sin embargo, investigaciones realizadas en el género *Xenopus* por el Dr. Ignacio Provencio, mostraron la presencia, en vertebrados, de una célula con capacidad fotosensible de origen rabdomérico (Provencio et al, 1998b). Estas células tenían dicha capacidad por la presencia de un pigmento diferente a las opsinas de conos y bastones; su nombre es *Melanopsina*. Trabajos continuistas con esta investigación asombraron por el descubrimiento y localización de un nuevo tipo de célula fotosensible en la retina de mamíferos. El desarrollo de un anticuerpo específico para esta opsina permitió determinar que dicho fotopigmento se hallaba localizado en un subtipo de célula ganglionar e investigaciones electrofisiológicas aportaron datos sobre su fotosensibilidad (Berson et al, 2002; Hattar et al, 2002).

El gen de la melanopsina recibe el nombre de *opn4* y la comparación entre la opsina encontrada en *Xenopus* y la posteriormente caracterizada en mamíferos ha puesto de manifiesto diferencias de secuencia entre ambas; hasta el punto de usar diferentes nombres para cada uno de los genes: *opn4x* al gen que codifica para la primera, y *opn4m* para el gen de la segunda. Ambos genes están presentes en vertebrados no mamíferos; sin embargo, sólo *opn4m* está presente en el taxón al que pertenecemos (Bellingham et al, 2006; Hankins et al, 2007).

1) **BIOLOGÍA CELULAR DE LA RETINA.**

1.1- UBICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA RETINA.

En el trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral se ha utilizado el mamífero *Mus musculus*, como modelo experimental. Por tanto centraremos la definición de las partes y elementos del ojo en esta especie animal.

Estudios realizados en la última década han dado a conocer una serie de fenómenos secuenciales que incluyen «interacciones inductivas y movimiento morfógeno de células desde regiones distantes del embrión. Se conoce la participación de diferentes tejidos en estos procesos: epidermis cefálica, neuroectodermo y mesénquima». (Cibis et al, 2008)

En los mamíferos la porción fotosensible del ojo, la **retina**, se desarrolla a partir de una evaginación e invaginación del diencéfalo. Por tanto el origen embriológico de esta porción es el sistema nervioso central (neuroectodermo); pero queda apartado de éste y por tanto accesible. Esta accesibilidad le ha conferido un gran protagonismo, como tejido elegido, en investigaciones de la estructura y los mecanismos de interrelación neural. Desde hace más de 120 años que la ciencia comenzó sus estudios a nivel de la retina, el premio nobel D. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) hizo un exhaustivo y detallado estudio de los diferentes tipos celulares que conformaban la retina; con él se dio a conocer una intrincada red neuronal que aún hoy sigue sorprendiendo.

En los ojos de mamíferos encontramos tres capas concéntricas. La *capa externa* está formada por delante por la **córnea** y por detrás por la **esclerótica**. La *capa media* es la **úvea**, formada por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. Por último, la *capa interna* que es la capa fotosensible, la **retina (Figura 3)**. Además podemos dividir el ojo en tres compartimentos (Cibis et al, 2008):

- *Cámara Anterior*: Espacio entre el iris y la córnea. Contiene el humor acuoso.

- *Cámara Posterior*: Más pequeña y también contiene humor acuoso. Se encuentra en el espacio existente entre el iris y el cristalino.
- *Cavidad Vítrea*: Contiene el gel vítreo. El espacio abarca desde la parte posterior del cristalino hasta la retina.

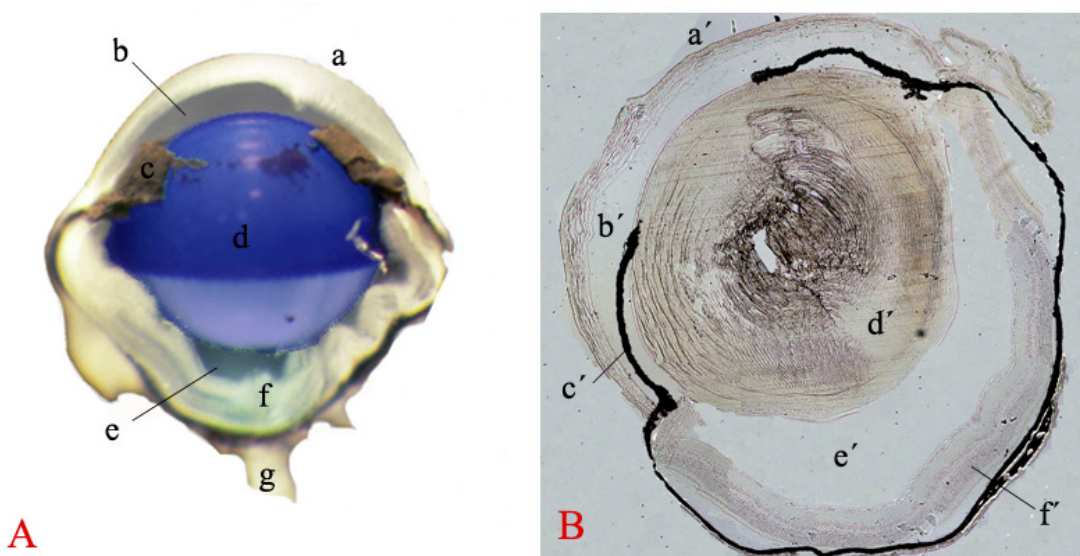


Fig3. Partes del ojo A- Esquema tridimensional de un ojo congelado de ratón. B- Imagen de microscopio de campo claro de una sección transversal del ojo de un ratón sano. (a-a'=córnea; b-b'=camara anterior; c-c'=iris; d-d'=cristalino; e-e'=cavidad vítrea; f-f'=retina; g=nervio óptico)

La retina presenta una estructura laminar; es una estructura fina y transparente que se forma a partir de las capas interna y externa del cáliz óptico. Podemos distinguir hasta diez capas en su configuración, de las cuales tres consisten en cuerpos neuronales separadas por dos capas de sinapsis. Esta disposición básica se mantiene en todos los vertebrados, los cuales presentan los mismos tipos de neuronas y mecanismos de conexión sináptica muy similares (Cajal, 1904) (Figura 4).

Epitelio pigmentario de la retina (EP), recubre a la retina interna, o retina neurosensorial. El EP es de configuración relativamente sencilla pero participa en numerosos e importantes procesos: metabolismo de la Vitamina A (papel en la fototransducción), mantenimientos de la barrera hemodinámica externa, fagocitosis, reducción de la dispersión de la luz, intercambio calórico, transporte activo, formación de la membrana basal.

Segmentos externos de los fotorreceptores (SF), constituida por los segmentos externos de las células fotorreceptoras de la retina.

Membrana limitante externa (MLE), está constituida por procesos de células de Müller unidos entre sí a través de uniones especializadas.

Capa nuclear externa (CNE), donde se localizan los somas de las células fotorreceptoras.

Capa plexiforme externa (CPE), constituida por los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.

Capa nuclear interna (CNI), compuesta por los somas de células bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas, así como por los cuerpos de las células de Müller.

Capa plexiforme interna (CPI), formada por los axones de las células bipolares, así como por las dendritas de las células ganglionares, amacrinas e interplexiformes. Se encuentra subdividida funcionalmente, a su vez, en dos subláminas: sublámina *on* o sublámina *a*, la más externa y sublámina *off* o sublámina *b*, la más interna.

Capa de las células ganglionares (CG), donde se ubican los somas de las células ganglionares. Encontramos también somas de células amacrinas desplazadas.

Capa de fibras del nervio óptico (CFNO), constituida por los axones de las células ganglionares, los cuales abandonan la retina por la denominada cabeza del nervio óptico formando el propio nervio óptico (NO).

Membrana limitante interna (MLI), se localiza interiormente a la CFNO y está formada por los pies de las células de Müller.

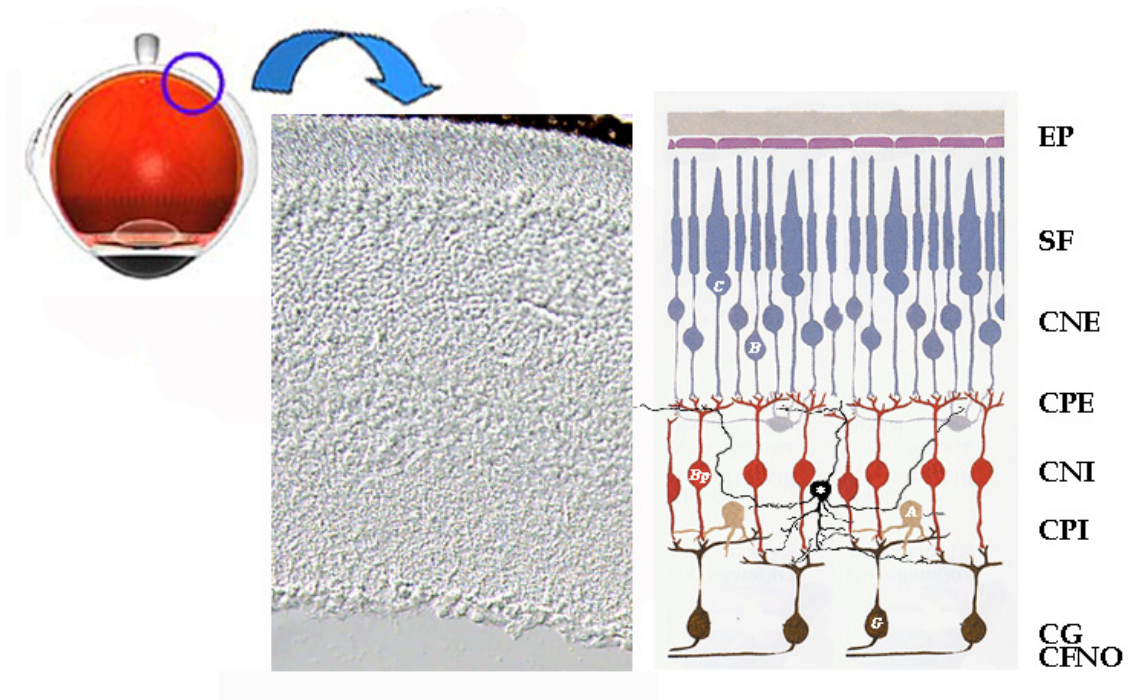


Fig4. Capas de la retina. Imagen de campo claro de una porción del tejido fotosensible del ojo. A su derecha esquema de la distribución de las capas que configuran este tejido. EP=Epitelio Pigmentario; SF=Segmentos de fotorreceptores; CNE=Capa Nuclear Externa; CPE=Capa Plexiforme Externa; CNI=Capa Nuclear Interna; CG=Capa Ganglionar; CFNO=Capas de Fibras del Nervio Óptico. (C=cono, B=bastón, Bp=bipolares, A=amacrinas, G=ganglionares, *=interplexiforme). Modificado de *Netter, 2005*.

1.2- TIPOS CELULARES.

1.2.1. Epitelio pigmentario.

Las células que lo forman son cúbicas o rectangulares y presentan polarización, disponiendo la cara basal hacia la capa externa del ojo. Los plegamientos de esta cara proporcionan una gran superficie de unión a la capa interna de la membrana de Bruch. Por contra, la cara apical presenta prolongaciones que engranan con los segmentos externos de los fotorreceptores. Esta estrecha relación con las células fotosensibles permite el desarrollo de las múltiples funciones que realiza, como son el almacenamiento, transporte y reconversión del retinol; fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptores, que en algunas especies sigue un ritmo circadiano sincronizado con las fluctuaciones diarias de la luz ambiental.

El epitelio pigmentario (EP) contiene una concentración elevada de vitamina A (*trans*-retinol). Este compuesto isoprenoide desempeña un papel clave en la visión. En el proceso visual el EP genera 11-*cis*-retinaldehído para la regeneración de rodopsina, a partir de acúmulos de todo-*trans*-retinol. La vitamina A puede ser adquirida ([Mathews y van Holde, 1998](#); [Cibis et al, 2008](#)):

- Mediante la liberación del todo-*trans*-retinal, tras la transducción fotoeléctrica llevada a cabo por el complejo opsina-cromóforo, y su regreso mediante el proceso de regeneración del ciclo visual (convertido por deshidrogenasas a retinol).
- Desde la circulación. Ingerida por el alimento como propia vitamina o biosintetizada a partir de la ingestión de β -carotenos.
- Por la fagocitosis de los discos desprendidos de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Las células que configuran este epitelio se encuentran firmemente asociadas entre sí por complejos de unión tipo *zónula occludens* y *zónula adhaerens*. Necesarias para la estabilidad funcional pero sobre todo importante en el mantenimiento de la barrera hematorretiniana.

Este epitelio desempeña también la función de absorber la luz que ha atravesado la retina, evitando así, una formación de la imagen borrosa por una excitación errónea, de “rebote”, de esa luz. El citoplasma de estas células se encuentra repleto de múltiples gránulos pigmentados, denominados **melanosomas**, que le permiten realizar esta función. Sin embargo, la estructura y contenido en melanosomas no es igual en todas partes del globo. Acompañando a la desigual estructura de la retina, el EP presenta también importantes diferencias regionales. En la zona de mayor agudeza visual de la retina, la fovea (ver más adelante), las células de este epitelio son más alta y finas y contienen más y mayores melanosomas. Mientras en la periferia las células con más bajas, anchas y menos pigmentadas ([Cibis et al, 2008](#)).

1.2.2. Tipos Neuronales.

En la retina podemos distinguir hasta 55 tipos de células distintas ([Masland, 2001a](#)). Todas ellas reunidas en seis grupos fundamentales (**Figura 5**):

Fotorreceptores: Los conos y los bastones, encargados de la transformación de la energía lumínica en energía eléctrica.

Células Bipolares: En una retina típica de mamífero hay entre 9 y 11 tipos diferentes de estas células. De ellos sólo uno se relaciona con la transmisión de la información desde el bastón. Reciben la información de los fotorreceptores y la transmiten verticalmente a otros tipos celulares, encargados de la salida de la información a centros del Sistema Nervioso Central.

Células Horizontales: Los modelos existentes de estas células dependen de la especie animal analizada. Son interneuronas encargadas de ciertos ajustes en el procesamiento de la imagen. Realizan sinápsis con fotorreceptores y células bipolares. Se localizan a nivel de la CPE.

Células Amacrinas: La diversidad de este grupo es enorme, se han podido diferenciar hasta 29 tipos distintos. Junto a las inmediatamente anteriores, forman la vía horizontal del procesamiento de la imagen. Los somas se encuentran formando parte de la CNI y sus conexiones se realizan por sus procesos a nivel de la CPI, en su lámina más distal (escleral).

Células Interplexiformes: Son células cuyo soma se encuentra, al igual que el de amacrinas, a nivel de la CNI. Sin embargo, sus proyecciones son más extensas alcanzando la CPE a nivel de las células horizontales. ([Gallego, 1971](#))

Células Ganglionares: Los axones de estas células se agrupan formando el nervio óptico y abandonan el ojo a través de la hendidura o cabeza del mismo. Existen de 10 a 15 tipos diferentes de células ganglionares. Las ramificaciones de sus árboles dendríticos y la realización de una diferente función han permitido su clasificación en grupos diferentes ([Guyton y Hall, 2006](#)).

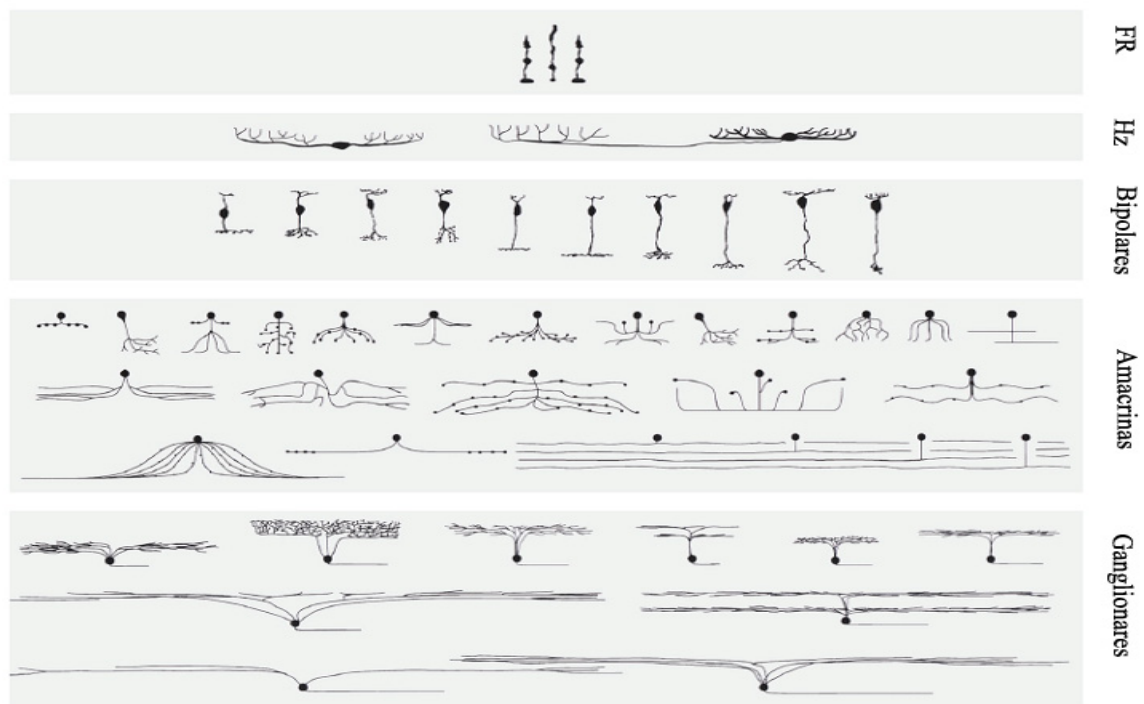


Fig5. Tipos Celulares. División de cada grupo celular de la retina en varios subtipos. FR= fotorreceptores; Hz= células horizontales. Modificado de *Masland, 2001b*.

Las distintas clases celulares están bien conservadas en número y función en los diferentes mamíferos. La retina no es una capa completamente homogénea, existen diferenciaciones de organización a lo largo de la misma.

Debido a que los fotorreceptores se encuentran en la porción más escleral de la retina, la luz ha de atravesar el resto de capas para poder estimularlos. Con esta orientación, otro de los obstáculos es el conjunto de axones de las células ganglionares que forman el nervio óptico (NO). La salida del NO deja una zona en la cúpula del ojo sin células fotosensitivas y por tanto sin capacidad de “ver”. De la misma manera, en los humanos y otros primates existe una zona en la retina denominada *mácula* que contiene un área central de máxima sensibilidad denominada *fóvea*. Además de estas diferencias, nos encontramos con zonas dentro de la retina muy diferentes al contrastar las partes más periféricas con las más centrales. ([Hubel, 1999](#); [Guyton y Hall, 2006](#); [Cibis et al, 2008](#)).

1.2.2.1. Fotorreceptores.

Estas células siguen los mismos principios estructurales en todos los vertebrados. Tradicionalmente se han descrito dos tipos de células: los bastones y los conos. Los primeros se encargan de la visión nocturna; los conos de la visión diurna. El número de bastones distribuidos por la retina es superior al de conos pero el punto de mayor agudeza visual, la fovea, está formado casi exclusivamente por conos. Mientras los conos pierden densidad a medida que nos alejamos del centro, los bastones se hacen más numerosos.

Como ya se ha mencionado, 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 un 2,8% del total de fotorreceptores (~ 437.000 células/mm²) son conos (Carter-Dawson y LaVail, 1979; Jeon *et al.*, 1998). Existe gran variación en el número de conos dentro de los vertebrados. Así, encontramos animales de hábitos nocturnos, como ciertas aves, donde sólo existen bastones; esto también ocurre en algunos mamíferos, como en el toro (Tarrés *et al.*, 1986; Kahle, 2003). Por el contrario, otros organismos presentan tapizada su retina casi exclusivamente por conos, como es el caso de la ardilla (West, 1976).

La existencia de un pigmento visual fotosensible confiere a la célula la capacidad de producir un mensaje eléctrico a partir de un estímulo luminoso (véase VIA VISUAL). Existen diferencias, también a este nivel, entre ambos fotorreceptores.

En el caso de los bastones el pigmento se conoce como **rodopsina**, la cual presenta una máxima sensibilidad para estímulos lumínicos de una longitud de onda de ~ 498 nm. La visión en color que depende de los conos se debe a la presencia de al menos dos clases de pigmentos espectrales. La mayoría de los mamíferos son **dicromáticos**, es decir, presentan una *visión divariante*, por la presencia de un cono sensible a una longitud de onda media (cono **M**) y otro cono sensible a la longitud de onda corta (cono **S**). La visión del color se debe a la comparación de la información de este **cono S** con la transcrita por el **cono M**, es el caso del ratón. Este mecanismo se complica en los primates ya que poseemos una *visión trivariante* (Hofer *et al.*, 2005) por

la especialización, a partir de la mutación de unos pocos aminoácidos, de la opsina sensible a longitudes de onda largas (cono de alta resolución M) dando lugar a dos nuevas opsinas muy relacionadas que presentan ligeras diferencias en el punto de máxima absorción. Así, los humanos contamos con tres tipos de conos: el **cono rojo** o **L** (máxima sensibilidad a los ~558 nm); el **cono verde** o **M** (máxima sensibilidad a los ~531 nm) y el **cono azul** o **S** (máxima sensibilidad a los ~420 nm) (Masland, 2001a; Kahle, 2003; Guyton y Hall, 2006; Cibis et al, 2008). La sensibilidad cromática de los conos ha podido ser evaluada por distintas técnicas (Figura 6).

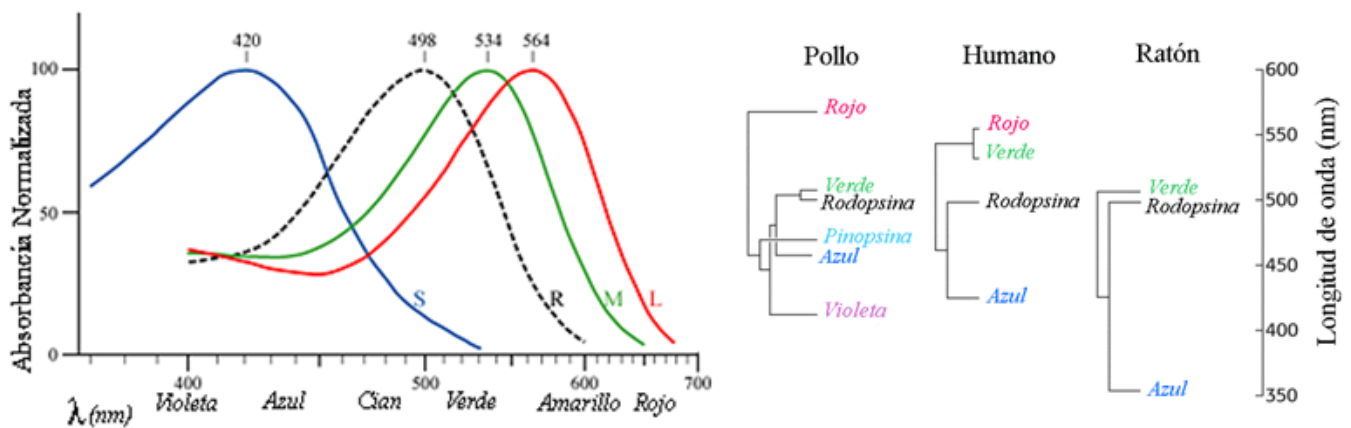


Fig6. Espectros de absorción de los distintos pigmentos fotoexcitables. Diferencias en las curvas de sensibilidad de los cuatro tipos de células fotosensibles. R=línea discontinua y negra, máximo de excitación para los bastones; M= línea verde, máximo de excitación para conos tipo M; L=línea roja, máximo para conos L; S=línea azul, máximo para conos S. A la derecha, pigmentos presentes en diferentes especies y la relación con su máximo de excitación en nanómetros. Modificado de www.natiomaster.com

La primera opsina secuenciada fue la rodopsina bovina en 1982. Desde entonces más de 1000 opsinas han sido identificadas. La gran familia de las opsinas se puede dividir en 7 subfamilias en base al tipo de proteína G acoplada a cada Receptor-dependiente de proteína G. Destacamos, por el interés de esta trabajo, la **subfamilia visual y no-visual de vertebrados** (acoplada a transducina) y la **subfamilia opsina/melanopsina** (acoplada a Gq). La primera subfamilia puede ser dividida en rodopsinas y opsinas de cono, y estas últimas opsinas a su vez en cuatro subgrupos

(opsinas LW, SW₁, SW₂, MW), relacionados con los anteriormente mencionados tipos de conos (Collin et al, 2003; Terakita, 2005; Bowmaker, 2008).

Desde un punto de vista puramente estructural, podemos decir que los conos y bastones están formados por:

Segmento Externo: Se introduce en un nicho formado por las células epiteliales; sin embargo no aparecen uniones estrechas u otras conexiones intercelulares entre este segmento y las células del EP. La forma del segmento externo varía en bastones y conos, siendo una forma cilíndrica para el primero y una forma conoidal para el segundo. Aquí se acumulan los múltiples discos laminares, plegamientos de la membrana del segmento externo, con apariencia similar a una pila de monedas (**Figura 7**). En cada cono o bastón llega a haber hasta 1000 discos. En estos discos se disponen las moléculas fotosensibles, *cromóforos*, cuya estructura química corresponde a un derivado de la vitamina A, el *retinal*. El cromóforo está asociado a una proteína heptahelicoidal, la *opsina*. Por tanto el segmento externo es la parte fotosensible del receptor. En la base del segmento externo se dispone un cilio conector excéntricamente situado (Kahle, 2003; Guyton y Hall, 2006; Cibis et al, 2008).

Segmento Interno: se encuentra subdividido en dos elementos adicionales: uno *elipsoide* externo que contiene gran número de mitocondrias y un *miioide* interno con una gran cantidad de glucógeno. En este último también encontramos gran parte de la maquinaria celular, como los ribosomas para la traducción de las opsinas.

Cuerpo celular principal: se presenta a continuación del segmento interno a través de un estrechamiento que será el axón. En el nacimiento de este axón se sitúa el núcleo celular. La disposición de estos núcleos marca también una diferencia entre conos y bastones. La CNE está formada por estos núcleos, sin embargo, mientras los conos se disponen en una hilera sencilla, los núcleos de los bastones forman varios estratos.

Cuerpo sináptico: es la porción más interna del fotorreceptor y tiene forma de botón; a través de él, el fotorreceptor establece conexiones sinápticas con otros tipos celulares. En el bastón, el botón sináptico se denomina **esférula** y está formada por una invaginación que alberga dos prolongaciones de células horizontales y una o más dendritas de células bipolares. En el cono hablamos de **pedículo** para referirnos a la terminal sináptica y en sus múltiples invaginaciones encontramos por término general dos procesos de horizontales y una única prolongación de célula bipolar. A la estructura histológica formada por la terminal axónica de los fotorreceptores y las prolongaciones dendríticas de las células bipolares y horizontales se la conoce como **tríada**.

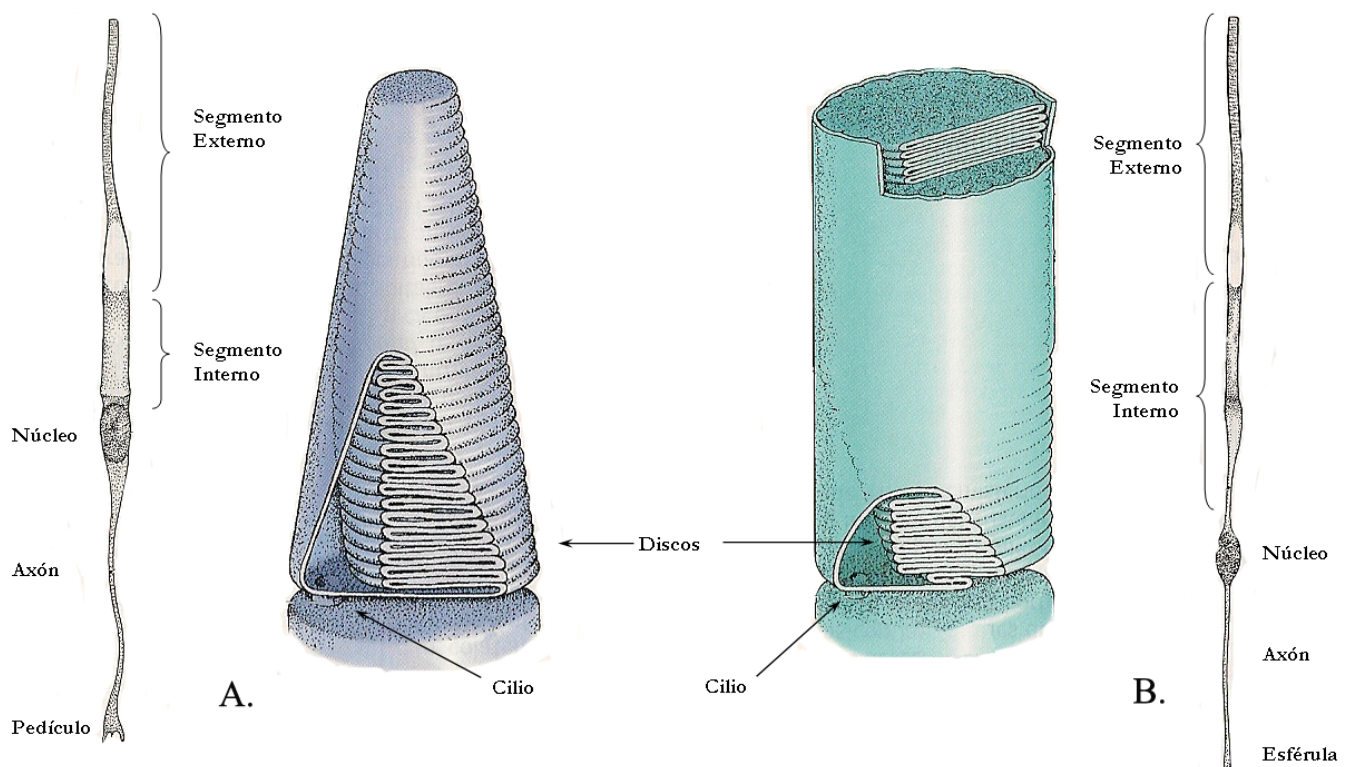


Fig7. Esquema de fotorreceptores en humanos. A- Cono: partes que lo conforman y detalle del segmento externo con los múltiples pliegues formando los discos, en color violeta. B- Bastón: esquema de su estructura y detalle del segmento externo, en forma de cilindro, también con sus cientos de pliegues (color verde). Modificado de Kahle, 2003.

1.2.2.2. Células Bipolares.

Es uno de los tipos celulares más abundante de la CNI. En la retina de ratón se ha estimado que ronda el 40% del total de las células ubicadas en dicha capa, compartiendo porcentaje con el número de amacrinas (Jeon et al, 1998; Haverkamp y Wässle, 2000). Las células bipolares se extienden desde la CPE hasta distintos niveles en la CPI. Son células con un árbol dendrítico frondoso, que interacciona con los pies de los fotorreceptores, y un axón que varía en longitud para establecer sinápsis con distintos tipos de células, tanto anatómica como funcionalmente.

Las diferentes sinapsis a nivel dendrítico y axonal y la variación anatómica derivada de ello, han servido para clasificar a las células bipolares. En base a los fotorreceptores con quién se asocian para recibir la información a transmitir, Cajal describió dos tipos básicos de células bipolares: **bipolares de bastón** y **bipolares de cono** (Cajal, 1893).

En la retina de ratones se han descrito hasta 9 tipos de bipolares de cono (Ghosh et al, 2004); otros trabajos apuntan únicamente a 5 tipos con subdivisiones de alguno de éstos (Haverkamp, 2003; Pignatelli y Strettoi, 2004). Las diferencias en la clasificación de las bipolares de cono que muestran estos trabajos, pueden deberse al uso de diferentes técnicas (inyección intracelular y marcaje mediante “Gene gun”, inmunohistoquímica, etc). Podemos destacar la peculiaridad que, de todos los tipos de células bipolares, sólo uno es el encargado de transmitir la información procedente de los bastones; mientras que el resto lo hace en la vía de los conos (**Figura 8**).

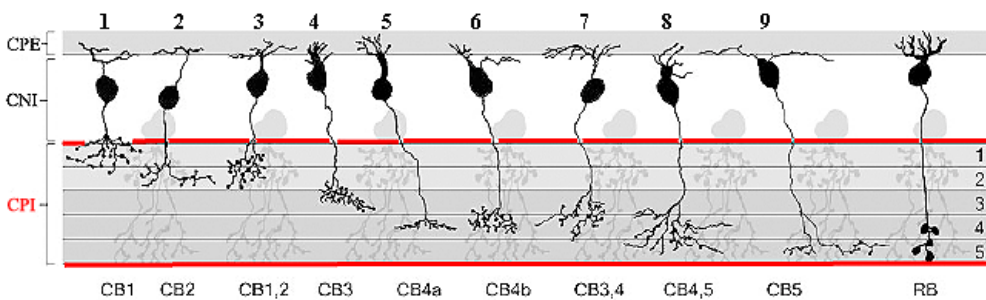


Fig8. Tipos de células Bipolares. Arborización a nivel de la CPE y procesos axónicos que sinaptan en las diferentes subláminas de la CPI. En segundo plano relación de bipolares y amacrinas. Modificado de Pignatelli et al, 2004 y Ghosh et al, 2004.

Las células bipolares reciben la información de los fotorreceptores y muchas de ellas la transmiten directamente a las células ganglionares. La información lumínica es transmitida de conos a células bipolares de cono (*ON* u *OFF*, véase *Vía Centripeta*) y de éstas directamente a células ganglionares. Sin embargo, las bipolares de bastón conducen el estímulo eléctrico a las ganglionares a través de un tipo de célula amacrina (AII).

1.2.2.3. Células Horizontales.

Son interneuronas, que al igual que las células bipolares, establecen conexiones con los fotorreceptores. En la retina de los vertebrados existen dos grandes grupos de células horizontales: las células horizontales de *axón corto* (Cajal, 1893) y las células horizontales *sin axón* (Gallego, 1964; 1986). Como ya describiera Cajal, las células horizontales tienen su soma localizado en la CNI; sus dendritas se disponen hacia la CPE, donde establecen conexiones sinápticas. El axón arboriza en su extremo y proyecta sobre la misma capa. Cada célula horizontal puede abarcar una región de hasta 700 a 1000 fotorreceptores (Rodieck, 1998; Pan y Massey, 2007). Las células horizontales también establecen conexiones eléctricas del tipo de “gap junctions” con otras células horizontales vecinas (Kaneko, 1971; Vaney, 1993; 1994; Cook y Becker, 1995; Lu y McMahon, 1996; McMahon y Mattson, 1996; Baldrige et al, 1998; Vaney et al, 1998; Zhang y McMahon, 2001).

En los primates existen tres tipos de células horizontales, atendiendo a criterios morfológicos, en preparaciones realizadas siguiendo el método de Golgi (Kolb et al, 1994): HI, HII y HIII. En retina de ratón sólo hay un tipo de célula horizontal, equivalente a uno de los tipos de célula horizontal de los primates, denominado **tipo B portador de axón**.

Las células horizontales de ratón constituyen aproximadamente el 3% de las células de la capa nuclear interna (Haverkamp y Wässle, 2000). Las conexiones de las células horizontales con los fotorreceptores muestran cierta especificidad: las dendritas que parten del soma celular establecen conexiones con los **pedículos**, mientras que las

ramificaciones de sus prolongaciones axónicas hacen conexión exclusivamente con las **esférulas**.

1.2.2.4. Células Amacrinas.

Presentan sus somas en la Capa Nuclear Interna (CNI) y proyectan sus procesos a la Capa Plexiforme Interna (CPI), aunque se han descrito células amacrinas desplazadas, cuyos somas están localizados a nivel de la Capa Ganglionar (CG) (Jeon et al, 1998).

Existen varios tipos en función de su tamaño, morfología y función (véase **Figura 5**). Se pueden clasificar atendiendo al tamaño del árbol dendrítico, las características de las ramificaciones y, principalmente, por la estratificación de sus dendritas en la CPI. Cajal, describía cuatro clases distintas de células amacrinas (monoestratificadas, biestratificadas, difusas y dislocadas) (Cajal, 1904), sin embargo, nuevos criterios de clasificación exponen mayor número de tipos. En base al neurotransmisor que liberan, existen: *colinérgicas*, *glicinérgicas*, *dopaminérgicas*, *GABAérgicas*, *indolaminérgicas*...(Masland y Tauchi, 1986; Masland, 2001a; Haverkamp y Wässle, 2000).

Al igual que las células horizontales, las células amacrinas, son células de asociación lateral, que regulan la actividad eléctrica de sus células postsinápticas, bipolares y ganglionares.

En la retina de ratón, las células amacrinas constituyen el 41% de todas las células de la capa nuclear interna (Jeon et al, 1998; Haverkamp y Wässle, 2000). En los diferentes subtipos podemos hablar de porcentajes según la clasificación: las células amacrinas glicinérgicas y gabaérgicas constituyen casi el 50% del total de la población (Haverkamp y Wässle, 2000). Las **amacrinas AII**, las cuales participan en la vía de los bastones, 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*.

Otros tipos de células amacrinas de interés, ampliamente estudiados, son:

- Las **amacrinas *starburst***, marcadas con anticuerpos contra la transferasa de la acetil-colina (AChT); se distinguen dos poblaciones muy similares, una con el soma localizado en la CNI y otras con sus cuerpos celulares a nivel de la CG. (Jeon et al, 1998). Estas amacrinas parecen potenciar la respuesta de las células ganglionares a estímulos en movimiento (Borg-Graham y Grzywacz, 1992; Taylor y Wässle, 1995; He et al, 1997, Gavrikov et al, 2006).
- Las **amacrinas *dopaminérgicas***, sintetizan y liberan dopamina. Este neurotransmisor se sabe que regula procesos de adaptación de la retina a la luz. En este sentido, se ha descrito que la dopamina presenta ciclos de regulación endógena (Bauer et al, 1980; Voigt y Wässle, 1987; Manglapus et al, 1999; Nir et al, 2000; Doyle et al, 2002; Sakamoto et al, 2005; Vugler et al, 2007a; Mills et al, 2007; Zhang et al, 2007; 2008; Pozdeyev et al, 2008).

Un grupo de células con su soma ubicado a nivel de la CNI, son las denominadas **células interplexiformes** (Gallego, 1971). Aunque constituyen un tipo celular independiente, estas células son consideradas como un tipo de célula amacrina por varios autores (Kolb y West, 1977; Nakamura et al, 1980; Kolb et al, 1992; Feigenspan et al, 1998). Estas células extienden sus prolongaciones entre ambas capas plexiformes, la interna y la externa. En la retina de mamíferos son dopaminérgicas y contactan con fotorreceptores, células horizontales y células bipolares (Dowling, 1987; Witkovsky, 2004). Aunque no está muy claro su papel funcional, parece que ejercen una función neuromoduladora de la actividad sináptica de la retina.

1.2.2.5 Células Ganglionares.

Son las células de la retina situadas en posiciones más vítreas. Sus axones se agrupan en un haz en el disco óptico, a nivel de la CFNO, y abandonan el ojo formando el nervio óptico (NO). Esta es la vía eferente de la información nerviosa hacia los núcleos nerviosos centrales. Las dendritas de las células ganglionares se dirigen a la capa plexiforme interna (CPI) y reciben información de células bipolares y amacrinas.

Las células ganglionares son capaces de producir potenciales de acción (PA). Estos PA viajarán por sus axones hasta sus células diana, situadas en los distintos núcleos diencefálicos. Sin embargo, la excitación de estas células es un proceso algo más complejo; para comprender mejor la funcionalidad de las células ganglionares debemos tener en cuenta la existencia de **campos receptores**. En la retina el campo receptor es algo más que el receptor encargado de recibir, transformar y enviar una información a una determinada célula. Gracias a los trabajos de Kuffler (1953) se reconoció una subestructura en estos campos receptores: estimulando diferentes partes de este campo se obtenían respuestas cualitativamente diferentes. Kuffler observó la presencia de un centro y una periferia de respuesta antagónica en los campos receptores. En base a esto, Kuffler clasificó funcionalmente las células ganglionares en: *células de centro-ON* y *células de centro-OFF* (Hubel, 1999). 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.

En la retina de los mamíferos se pueden distinguir de 10 a 15 tipos diferentes de células ganglionares (Masland, 2001a) (véase **Figura 5**). Esta, no consensuada, heterogeneidad sí puede ser reducida a tres grupos funcionales según distintos autores (Enroth-Cugell y Robson, 1966; Guyton y Hall, 2006):

Células ganglionares tipo W (*células ganglionares enanas*). Constituyen el 40% de todas las ganglionares. Son pequeñas, su diámetro es inferior a 10 micrómetros y su velocidad de transferencia de información es lenta (8 m/s). Presentan campos amplios en la retina periférica. Parecen ser especialmente sensibles al movimiento direccional en el campo visual.

Células ganglionares tipo X (*células ganglionares difusas pequeñas*). Son las más abundantes, representan el 55% del total. Su diámetro está entre 10 y 15 μm y la velocidad de transmisión de señales es de 14 m/s. Las dendritas no ocupan una gran superficie, por ello sus campos receptivos son reducidos. Así que son las células encargadas de transmitir los detalles finos de la imagen visual. Las células ganglionares X responden de forma sostenida a estímulos visuales y permiten discriminar entre estímulos próximos en el espacio. Las células X, en ratón son llamadas

de **tipo II**, tienen un soma pequeño y unas dendritas densamente agrupadas en un área reducida.

Células ganglionares tipo Y (*células ganglionares difusas grandes*). Son las más grandes, hasta 35 μm y envían impulsos hacia el cerebro a 50 m/s. Son las menos numerosas, 5% del total. Sus campos dendríticos son amplios. Estas células responden a las modificaciones rápidas de la imagen visual, tanto al movimiento como a los cambios rápidos de intensidad lumínica. En el ratón, estas células corresponden con el **tipo I** ([Dreher et al, 1985](#))

En el ratón podemos resumir tres tipos principales de células ganglionares en función del tamaño del soma y del campo dendrítico:

- *tipo I* está constituido por células con somas y campos dendríticos de gran tamaño;
- *tipo II* por células con somas pequeños o medianos y campos dendríticos pequeños;
- *tipo III* por células con somas pequeños o medianos y grandes campos dendríticos.

Cada uno de estos tres tipos puede ser subdividido en función del nivel de la CPI donde finalizan sus dendritas y el patrón de ramificación de las mismas ([Doi et al, 1995](#)).

Digno de mención es el descubrimiento de una célula ganglionar con capacidad fotosensible. En 1998 era caracterizada una nueva opsina en melanóforos del anuro *Xenopus laevi*, por ello recibió el nombre de **melanopsina**; posteriormente fue localizada en ojos de mamíferos ([Provencio et al, 1998a; 1998b; 2000](#)). La pregunta de si esta nueva molécula fotosensible, descubierta en vertebrados, presentaba esa capacidad en otras especies tuvo su respuesta en las investigaciones simultáneas del Dr. David Berson y el Dr. S. Hattar, ambas en el año 2002. Estas células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (*ipRGCs, intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells*) se podrían incluir dentro de las células ganglionares tipo III o W ([Provencio et al,](#)

1998a; Gooley et al, 2001) presentando característicamente un campo receptivo extraordinariamente amplio, 200-300 μ m (Hattar et al, 2002). El número poblacional de estas células es muy reducido, no alcanzando el 3% del total de las células ganglionares.

En base a la morfología de estas células se han observado dos tipos de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en el ratón adulto (Provencio et al, 2002b) (Figura 9):

- Células con procesos dendríticos localizados en regiones más internas de la capa plexiforme interna (CPI).
- Células con procesos dendríticos en regiones externas de CPI.

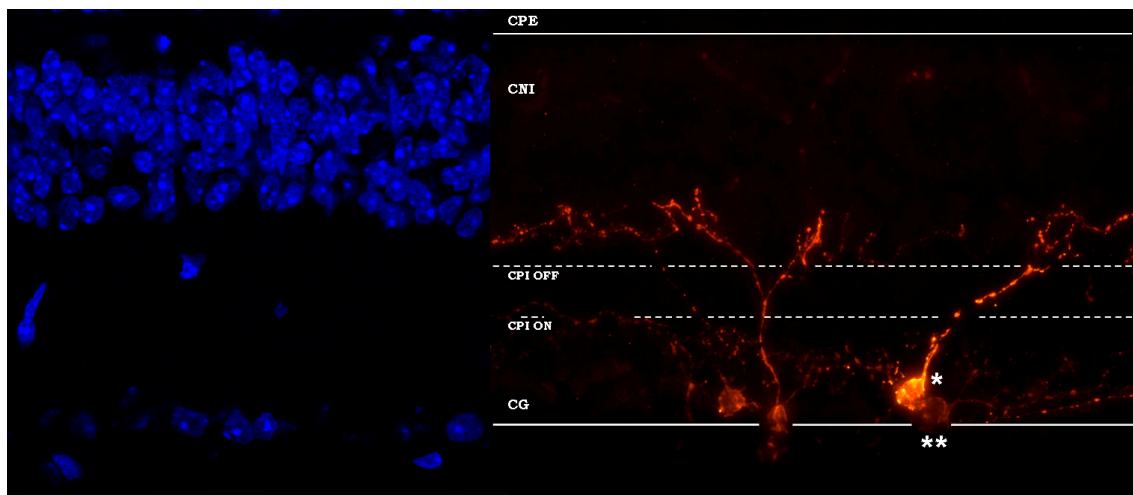


Fig9. Tipos de células ganglionares melanopsínicas en función de la arborización de sus dendritas. A la izquierda, núcleos de la capa nuclear interna (CNI) y capa ganglionar (CG) marcados con DAPI. A la derecha, inmunocitoquímica de dos tipos de ipRGCs según la localización de sus procesos dendríticos. *=célula con proyección a zonas más exteriores de la CPI; **= célula con proyección en zona más interna de CPI. Imágenes propias de DAPI y tinción de ipRGC (Ac anti-Nterminal Melanopsina, Oxford).

NOTA: Se muestra la imagen con DAPI para ubicar los somas de las ipRGCs y la proyección de sus dendritas en la retina de ratón. Ambas imágenes presentan la misma escala, sin embargo, no se autocorresponden.

Además, en retina de ratones jóvenes, en base a la latencia de disparo y fotosensibilidad se destaca la presencia de tres tipos de respuestas; de esta manera, al

menos tres poblaciones de ipRGCs han sido identificadas (Sekaran et al, 2003; 2005; Tu et al, 2005; 2006; Hattar et al, 2006; Baver et al, 2008; Schmidt et al, 2008; 2009):

Tipo I (M1): forman aproximadamente el 70% del total. Tienen una elevada fotosensibilidad pero larga latencia de actividad en respuesta a iluminación débil. La más abundante a edades cortas del animal. Proyectan sus procesos a nivel de la sublámina *Off* de la CPI.

Tipo II (M2): constituyen el 15% y tienen una sensibilidad baja y larga latencia. En el adulto es preponderante este tipo. Proyectan a nivel de la sublámina *On* de la CPI.

Tipo III (M3): son el 15% restante. Su sensibilidad es alta y su latencia corta. Parecen presentar proyecciones a nivel de las subláminas *On* y *Off*.

Estudios recientes han mostrado la funcionalidad de las células ganglionares fotosensibles y apuntan a nuevas diferencias entre los tipos M1 y M2. Las primeras se despolarizan más en registros de current-clamp; desencadenan una corriente máxima, por estímulo luminoso, más prolongada; presentan diez veces más sensibilidad a estímulos a 480nm que el tipo M2. El segundo tipo se caracteriza por un mayor diámetro y longitud del árbol dendrítico, mayor diámetro del soma, árbol dendrítico más complejo y más alto número de cruzamientos de las dendritas, más baja resistencia y mayor hiperpolarización del voltaje de membrana (Schmidt y Kofuji, 2009).

Hasta el momento la clasificación de las células ipRGCs mantiene cierto carácter indeterminado. La clasificación estructural de las células portadoras de melanopsina aún queda más abierta por lo incompleto del conocimiento genético sobre el pigmento fotosensible. La diversidad del gen de la melanopsina (*opn4*) es otro frente abierto para entender los diferentes modelos de fotoexcitación en la retina de los seres vivos. Como ya hemos comentado, se conoce la existencia de dos genes *opn4* en cordados: *opn4x* y *opn4m*, siendo cada uno de los nombres la denominación de un grupo. Entre ambos grupos las relaciones de identidad son menores al 55% (Bellingham et al, 2006). Los estudios con diferentes *phyllums* han determinado, hasta el momento, que el gen *opn4* antecesor a los dos grupos debe encontrarse con anterioridad al origen de los cefalocordados; la presencia de células rbdoméricas en el amphioxus *Branchiostoma b.*

y en la lamprea *Geotria a.* señala ese tiempo evolutivo (Koyanagi et al, 2005; Collin et al, 2003). Más allá, diferentes familias de cordados no-mamíferos presentan una subdivisión dentro de los dos grupos de genes *opn4*; en el caso de los Teleósteos en número de hasta 4 genes diferentes: *opn4m1*, *opn4m2*, *opn4x1* y *opn4x2* (Figura 10). Sin embargo, los “verdaderos mamíferos” (*Eutheria*) y los marsupiales sólo poseen un tipo de gen conocido, *opn4m* (Bellingham et al, 2006).

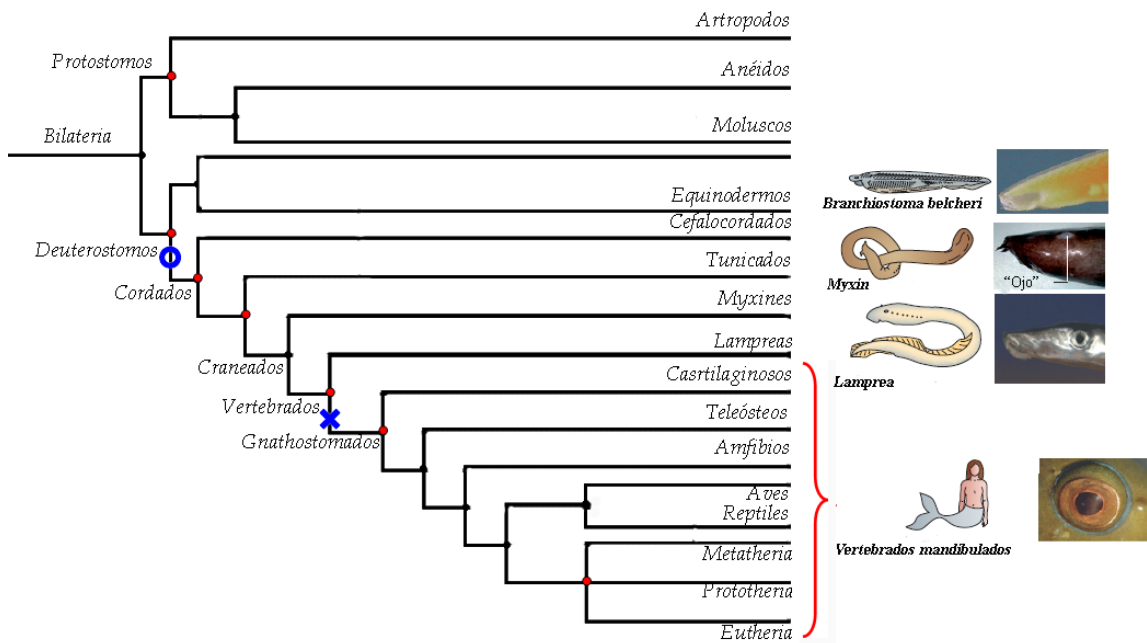


Fig10. Árbol filogenético de los organismos con simetría bilateral.

En base a los diferentes estudios filogenéticos se considera que la aparición de células con expresión del gen *opn4* tuvo que acontecer previamente a la formación del *super-phyllum* de **Cordados** (círculo azul). Organismos primitivos de este *super-phyllum* presentan células ciliares y rabdoméricas. En el desarrollo de este grupo encontramos organismos donde se ha documentado la aparición de diferencias en el gen *opn4*: *opn4m* y *opn4x*. Estas variaciones en la secuencia del gen se comienzan a dar dentro del grupo de **Vertebrados** (aspa azul). En corchete rojo se recogen los grupos pertenecientes a Gnatostomos, donde se han identificado diferentes genes de melanopsina dentro del mismo taxón. A pesar de incluirse los mamíferos, en este grupo sólo se tiene conocimiento de un tipo de gen de melanopsina, *opn4m*. Modificado de Lamb et al, 2007.

Nuevas investigaciones aportan nuevos elementos de discusión para la clasificación de las células portadoras del pigmento fotosensible melanopsina. Pires y colaboradores han publicado recientemente sus trabajos referentes a la presencia de dos isoformas de la melanopsina (Pires et al, 2009). El tamaño de esta proteína difiere en tamaño al comparar la aislada en humano con la aislada en ratón (Provencio et al, 2002a); curiosamente el tamaño de la melanopsina en rata es más similar al humano que al ratón (Hattar et al, 2002). Esto animó al estudio del gen de la melanopsina en modelos murinos con el fin de entender dichas diferencias. Los resultados sorprendieron con el hallazgo de un gen *opn4* en ratón que contenía 10 exones, al igual que presentaba dicho gen *opn4* en humano, rata y un tipo de marsupial australiano (Provencio et al, 2000; Hattar et al, 2002; Pires et al, 2007). La diferencia en el caso del ratón reside en un *splicing* alternativo post-transcripcional que produce dos isoformas de melanopsina con dos tamaños distintos: Opn4 Long y Opn4 Short. Dichas isoformas difieren en la cantidad de aminoácidos: 521aa para Opn4L y 466aa para Opn4S; sin embargo, los primeros 451aa son idénticos entre ambas isoformas y sólo difieren en los aminoácidos del extremo carboxilo. Opn4L y Opn4S están presentes en la retina de ratón y parecen revelar distintas subpoblaciones de ipRGCs (Pires et al, 2009).

Al margen de las clasificaciones, desde un punto de vista funcional, es importante entender que las ipRGC reciben un *input* doble. Por un lado, las ipRGC reciben un estímulo directo de la luz ambiental (respuesta intrínseca), y por otro 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).

1.2.3. Tipos No Neuronales.

En la retina existen otras células cuyo papel no pasa por el de transmitir o procesar la información procedente de la luz. Son células encargadas del soporte, manutención y limpieza de la red neural, la cual nos proporciona la capacidad visual. Estas células conforman la **Glia** y podemos distinguir: Células de Müller, Astrocitos y Microglía (**Figura 11**).

Células de Müller: Se extienden verticalmente desde la membrana limitante externa hacia la membrana limitante interna (MLE y MLI respectivamente), constituyendo los límites de ambas membranas. Para formar la MLE se unen procesos de células de Müller entre sí con células fotorreceptoras, a través de desmosomas y zónulas adherentes. En cuanto a la MLI, ésta se encuentra formada por los pies de las células de Müller, pero no se han observado uniones especializadas. Los pies de las células de Müller también rodean los grandes vasos sanguíneos en la superficie interna de la retina (Kolb et al, 2000). Sus núcleos se localizan en la capa nuclear interna (CNI) y sus procesos se extienden en todas direcciones y a todos los niveles. Estas células, proporcionan (Cibis et al, 2008):

- soporte estructural y nutricional;
- depuración por eliminación de los productos de desecho y reciclado de los aminoácidos usados en la sinápsis;
- control homeostático por regulación del medio iónico, al tomar el exceso de K^+ extracelular y redistribuirlo;
- degradación de neurotransmisores: glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA);
- funciones metabólicas por la producción de factores de crecimiento.

Astrocitos: Se han descrito en la barrera hematoencefálica junto a células de la microglía. Los astrocitos se disponen en la CFNO (Kolb et al, 2000) relacionándose con los vasos sanguíneos y forman una estructura tubular por la que discurren los axones de las células ganglionares. Estos dos hechos sugieren que los astrocitos constituyen vainas gliales para haces axónicos y vasos sanguíneos. Además de esto, las funciones de los astrocitos, confieren:

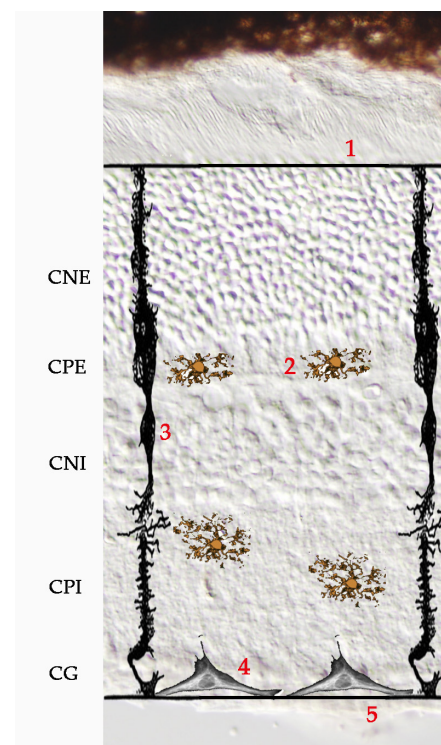
- aporte nutritivo metabólico, presentan altas concentraciones de glucógeno;
- regulación de los niveles de K^+ extracelular, participando así de la homeostasis iónica;
- resistencia al estrés oxidativo, lo aporta la cantidad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que acumulan y la capacidad para

regenerar glutatión y ascorbato (Kettenmann et al, 1996; Wilson, 1997).

Estas células parecen estar implicadas en el control del correcto procesamiento de la información por parte de los elementos nerviosos y en el desarrollo de enfermedades degenerativas o tóxicas que afectan a la retina (Fletcher y Kalloniatis, 1996; Matute et al, 2001). En procesos degenerativos los astrocitos aumentan su actividad y movilidad dentro y fuera de la retina, como el humor vítreo en la degeneración macular asociada a la edad (Ramírez et al, 2001).

Microglía: presentan un origen mesodérmico y su función fundamental es la de defensa. En la retina normal, la microglía está constituida por células de morfología estrellada que rodean a los vasos sanguíneos de la retina interna y que funcionan como macrófagos residentes (Provis et al, 1995; Gupta et al, 2003). Se ha descrito en la retina fundamentalmente en situaciones de lesión celular que afecta al tejido retiniano. Cuando se produce una lesión las células microgliales se activan y migran al área dañada, donde fagocitan los desechos celulares generados, denominándose entonces *microglía reactiva* (Kolb et al, 2000).

Fig11. Tipo y localización de células gliales. Entre la membrana limitante externa (1) y la membrana limitante interna (5) se disponen las diferentes células. Las células de Müller alcanzan ambas membranas limitantes (3); a nivel de la capa plexiforme externa (CPE) y en la capa plexiforme interna (CPI) vemos la representación de la microglía (2); por debajo de la capa ganglionar (CG) se ubican los astrocitos (4). Imagen en campo claro y esquema de las células gliales de la retina en un ratón control, amablemente cedido por el Dr. M. Marchena.



1.3- RED VASCULAR.

En el ojo, a través de la cabeza del nervio óptico, penetra la **arteria central de la retina** y hace su salida la **vena central**. De la arteria oftálmica deriva la arteria central, que acompaña al nervio óptico para penetrar en el globo ocular. La porción interna del ojo se perfunde por ramas de la arteria central, éstas penetran a través de las capas de la retina hasta la membrana limitante media, donde se realiza el cruce de arteriolas y vénulas. Las vénulas confluyen en la vena central que al salir del ojo formará, junto con otros vasos, la vena oftálmica.

Para el correcto mantenimiento de la retina externa, de la arteria oftálmica también surgen las *arterias ciliares posteriores* (cortas y largas) y las *arterias ciliares anteriores*. Aproximadamente unas 20 arterias ciliares posteriores cortas penetran en el ojo en un anillo alrededor del nervio óptico, formando una red de vasos a nivel de la Coroides, **vasos coroideos**. Las venas coroideas confluyen en la vena vorticosa. Las arterias ciliares posteriores vascularizan también la capa uveal, la esclerótica, el borde de la córnea y la conjuntiva adyacente. Las arterias ciliares anteriores vascularizarán los músculos rectos superior, medial e inferior (**Figura 12**).

Los vasos sanguíneos retinianos mantienen una barrera hematoencefálica interna. Esta barrera fisiológica se debe a la capa única de células endoteliales no fenestradas. La superficie externa de este endotelio se encuentra recubierta por la membrana basal, que contiene una capa interrumpida de *pericitos*, o *células murales* (Cibis et al, 2008).

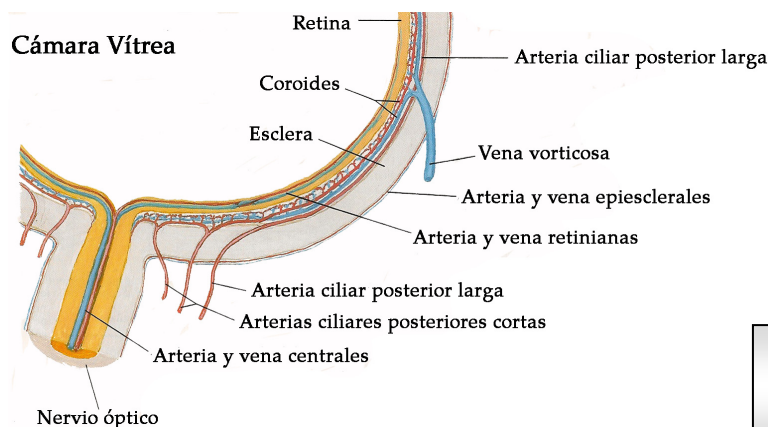


Fig12. Venas y arterias intrínsecas de la retina. Modificado de Netter, 2005.

2) FISIOLÓGÍA DE LA RETINA.

La capacidad visual de la que gozamos muchos organismos, algunos invertebrados y todos los vertebrados, es una conjunción entre la compleja participación de un ojo compuesto con la llegada y posterior análisis de la información por los núcleos del Sistema Nervioso Central (SNC).

El SNC ha de analizar la información, es decir, ha de realizar un **procesamiento de la información sensorial**. Pero la información la aportan numerosos estímulos ya que son muchos los elementos del entorno que nos rodea, por ello el SNC ha de ser capaz de **integrar la información sensorial**. Además es necesario que la información en cada uno de los distintos componentes de la “maquinaria visual” se integre funcionalmente, lo que requiere que haya un **procesamiento secuencial** de la información desde la retina hasta la corteza.

Imaginemos un haz de luz con la longitud de onda adecuada para que estimule nuestras células sensitivas en la retina. Esa luz atraviesa todas las capas de la retina y llega finalmente a la capa de fotorreceptores. La luz es recogida por los fotorreceptores que realizan la **fototransducción** o transformación de la energía lumínica en señales eléctricas. La información traducida en energía eléctrica viajará a lo largo del sistema nervioso, pasando por al menos seis núcleos o centros de relevo. Los dos primeros centros se encuentran en la retina. El primer relevo se produce a nivel de las células bipolares; el segundo relevo será de éstas a las células ganglionares, con la generación de potenciales de acción, y estas células exportarán la información a través del nervio óptico (NO). Una vez fuera del globo ocular los axones de las células ganglionares, constituyen un NO por cada ojo. Ambos forman una estructura decusa denominada *quiasma óptico*. Los axones que forman estos NO se cruzan en esta estructura y se dirigen al **núcleo geniculado lateral** del tálamo dorsal, en ambos hemisferios. El resto de las sinápsis de relevo se localizan en la **corteza visual**. Las células ganglionares de tipo II en el ratón, proyectan tanto al núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) como al colículo superior (CS) (Provencio et al, 1998a). Las células tipo I en ratón proyectan al NGLd (Provencio et al, 1998b).

En la propia corteza cerebral se pueden distinguir al menos tres niveles de procesamiento sensorial (Dowling, 1992): corteza visual primaria, corteza visual secundaria, y "cortezas asociativas" visuales. Actualmente, es conocido, que la corteza visual lleva a cabo sus funciones distribuyendo la "información" en distintas áreas corticales. Estudios clínicos y experimentales con animales de laboratorio han llevado a la conclusión de que las distintas características de la imagen visual, como la profundidad, la forma, el movimiento o el color, son procesadas por áreas distintas de la corteza visual, y que dicho procesamiento es "paralelo". De esta forma, la integración de la información de estas vías, cada una de ellas con su propia función, se consigue de forma interactiva a casi todos los niveles corticales (Kandel et al, 2000). Así podemos decir que la percepción visual comienza en la retina, pero se lleva a cabo en los centros superiores del cerebro.

Para finalizar esta visión general del sistema visual, señalaremos que además de la vía propiamente visual, parte de las células que proyectan sus axones desde la retina tienen sus centros de destino en hipotálamo, *tectum* y *pretectum* (Bear et al, 1996). La función de dichas proyecciones no se ha relacionado con la percepción visual sino más bien con funciones reflejas, autonómicas o endocrinas. Por ello podemos reconocer una transmisión de la información mediante una **vía visual** y otra relacionada con procesos no visuales, **vía no visual**.

2.1- VIA VISUAL.

2.1.1. Adaptación a la luz y a la oscuridad.

Los estímulos luminosos, que el ojo puede captar, pueden ser de diferente intensidad y frecuencia. La capacidad de recoger información de estímulos tan variables, se debe a la existencia de los dos tipos de células fotorreceptoras, ya comentadas. Los bastones son muy sensibles a la luz, ya que son sensibles a intensidades lumínicas muy bajas. Estos fotorreceptores realizan su labor funcional en condiciones de adaptación a la oscuridad o *condiciones escotópicas* ($<0,001 \text{ cd/m}^2$). Por el contrario, los conos necesitan mayor intensidad lumínica para ser estimulados. Estos fotorreceptores realizan su labor funcional en condiciones de adaptación a la luz o

condiciones fotópicas ($>0,3 \text{ cd/m}^2$). En condiciones de luminosidad intermedia, también llamadas *condiciones mesópicas* ($>0,001$ y $<0,3 \text{ cd/m}^2$), participarían ambos tipos de fotorreceptores, conos y bastones (Peichl, 2005) (Figura 13). Sin embargo, la valoración de estas diferentes intensidades del estímulo sólo es posible con la adaptación del ojo a cada una de ellas. Por ejemplo cuando se pasa de un estado de adaptación a la luz a una situación de baja iluminación, la sensibilidad de la retina es muy baja, veremos todo negro. Pero en unos minutos el umbral de estímulo habrá bajado, o lo que es lo mismo, la sensibilidad habrá aumentado. En el plazo de 1 minuto ya ha aumentado 10 veces; pasados 20 minutos, la sensibilidad se ha incrementado unas 6000 veces, y a los 40 minutos, 25000 veces. (Guyton y Hall, 2006).

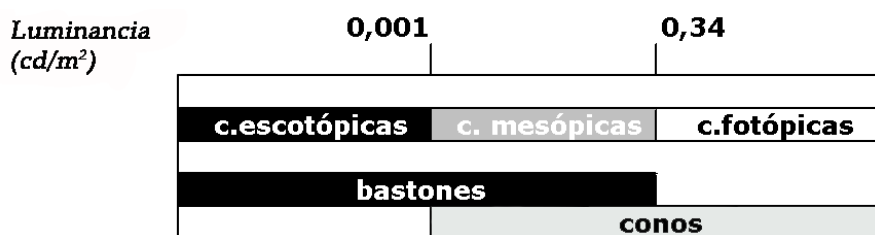
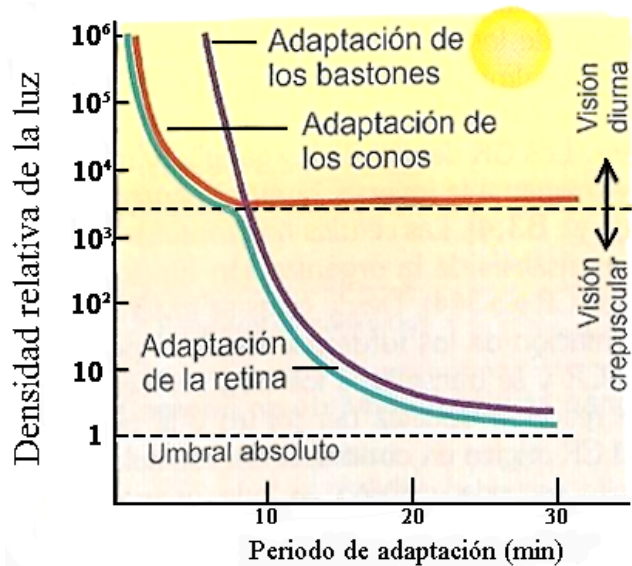


Fig13. Sensibilidad lumínica de conos y bastones. Relación de las distintas condiciones lumínicas y fotorreceptores. Modificado de Forns, 2007.

Se conoce como estado de *adaptación a la luz* aquel en el que las células fotorreceptoras han estado expuestas a una luz radiante durante un largo periodo. Debido a esta exposición, los pigmentos fotosensibles en las células fotorreceptoras quedan reducidos a concentraciones bajas, en los segmentos externos permanecen las opsinas y el retinal transformado, en gran parte, a vitamina A (todo-trans-retinol). La sensibilidad de la retina se ha reducido proporcionalmente a la inactivación de los fotopigmentos. Por el contrario, si los fotorreceptores de la retina permanecen en la oscuridad durante un tiempo prolongado, el retinal y las opsinas de los conos y los bastones son capaces de regenerar los pigmentos sensibles a la luz; la vitamina A se transforma de nuevo en retinal (todo-trans-retinaldehído) para suministrar aún más pigmentos. El número total de fotopigmento dependerá de la cantidad de opsina presente en los conos y bastones disponible para combinarse con el retinal. Este estado de gran cantidad de pigmento visual y máxima sensibilidad se denomina, *adaptación a la oscuridad* (Mathews y van Holde, 1998; Guyton y Hall, 2006).

La **Figura 14** expone el curso temporal de la adaptación a la luz y a la oscuridad mediada por conos y bastones. El desarrollo temporal de la adaptación normal de la retina muestra una primera fase que es debida a la adaptación de los conos, hasta un valor 200-1000 veces mayor que el umbral absoluto. Ese es el punto en el que los bastones aún pueden ser estimulados en condiciones escotópicas, es el *umbral de la visión diurna*. La formación de la segunda parte de la curva de *adaptación de la retina* se determina mediante la adaptación, algo rezagada, de los bastones. La sensibilidad de los conos es más rápida pero de menor sensibilidad absoluta, mientras que la adaptación de los bastones es más lenta, pero de mayor incremento de sensibilidad ([Silbernagl y Despopoulos, 2002](#)).

Fig14. Adaptación de la retina a las condiciones lumínicas. Los conos (línea roja) son sensibles hasta el umbral de la visión diurna. En intensidades inferiores a este umbral, nuestros ojos son capaces de captar estímulos luminosos gracias a la sensibilidad de los bastones. A partir del umbral absoluto no hay captación de luz. Primera línea discontinua= umbral de la visión diurna; segunda línea discontinua= umbral absoluto. Modificado de [Silbernagl y Despopoulos, 2002](#).



Además de la adaptación ocasionada por los cambios en las concentraciones de la rodopsina de bastones o fopsinas de conos, el ojo posee otros dos mecanismos de adaptación. El primero consiste en un *cambio del diámetro pupilar* debido a la modificación de la cantidad de luz que se deja pasar a través de la apertura pupilar. Un segundo mecanismo es la *adaptación neural*, en el que participan las neuronas que integran las sucesivas etapas de la cadena visual en la propia retina y en el encéfalo. De la misma manera también influye el número de células fotosensibles que aportan la señal, derivada del estímulo, a la neurona del siguiente relevo informativo. Sea grande o pequeña el área de fotorreceptores que transfieren información, la adaptación variará.

Esta **sumación espacial** disminuye con la luz y aumenta con la oscuridad (Silbernagl y Despopoulos, 2002).

La sensibilidad de los fotorreceptores se adapta **química**mente al comportamiento de la luz. Se piensa que son los cambios en los niveles intracelulares de calcio, los que generan cambios en la adaptación. Sin embargo, el mecanismo por el que el calcio causa los cambios en la sensibilidad y cinética de la fotorespuesta durante la adaptación es controvertida (Nakatani y Yau, 1988; Matthews, 1995; 1997; Fain et al, 1996; 2001; Burns y Arshavsky, 2005). Ante unas condiciones de mucha luz disminuye la concentración citoplasmática de calcio en los fotorreceptores, lo que reduce la disponibilidad de transducina y rodopsina, a través de la recoverina y la fosfoducina. Por el contrario, a intensidades lumínicas bajas, la rodopsina y transducina están disponibles en concentraciones más elevadas, por lo que los fotorreceptores son más sensibles (Silbernagl y Despopoulos, 2002; Guyton y Hall, 2006).

2.1.2. Fototransducción.

En condiciones de oscuridad los fotorreceptores mantienen un potencial de membrana en torno a -40mV ; se encuentran despolarizados con respecto a una neurona típica cuyo potencial de membrana es de aproximadamente -70mV . Debido a esta despolarización mantenida, los fotorreceptores no estimulados lumínicamente producen una liberación tónica de **glutamato** a la capa plexiforme externa, hacia las células bipolares y horizontales.

Inicialmente en estas condiciones escotópicas se está produciendo un flujo de corriente mantenido que recibe el nombre de “Corriente de oscuridad” o “fotocorriente” (*dark-current*). En la membrana plasmática del segmento externo se encuentran los canales dependientes de monofosfatos de guanidina cíclica (GMPc, descritos en detalle más abajo). Dichos canales se encuentran abiertos por la alta concentración de GMPc; esto permite una entrada sostenida de cationes, los cuales son responsables del estado relativamente despolarizado del fotorreceptor. Mientras un canal selectivo de K^+ crea una corriente que saca este ión desde el segmento interno. Esta corriente de salida tiende a hiperpolarizar el fotorreceptor hacia el potencial de equilibrio para el K^+ . La corriente

de oscuridad se encuentra equilibrada por la actividad de una bomba Na^+/K^+ ATPasa también en el segmento interno, expeliendo Sodio y reteniendo Potasio. La fotocorriente ayuda a que el potencial de membrana sea en torno a ese característico -40mV (Hagins et al, 1970; Penn y Hagins, 1972; Kandel et al, 2000).

Cuando un estímulo luminoso incide sobre la retina, los fotorreceptores responden con un cambio gradual del potencial de membrana. La molécula con capacidad de responder a la luz se dispone dentro de la rodopsina (en el bastón), y a su vez ésta se encuentra integrada en la membrana de los discos que conforman el segmento externo. En el estado de despolarización la rodopsina contiene el aldehído **11-cis-retinal** unido a un resto de lisina (Lys) (Palczewski et al, 2000). La **Figura 15** muestra la estructura de la rodopsina con su lugar de unión del 11-cis-retinal.

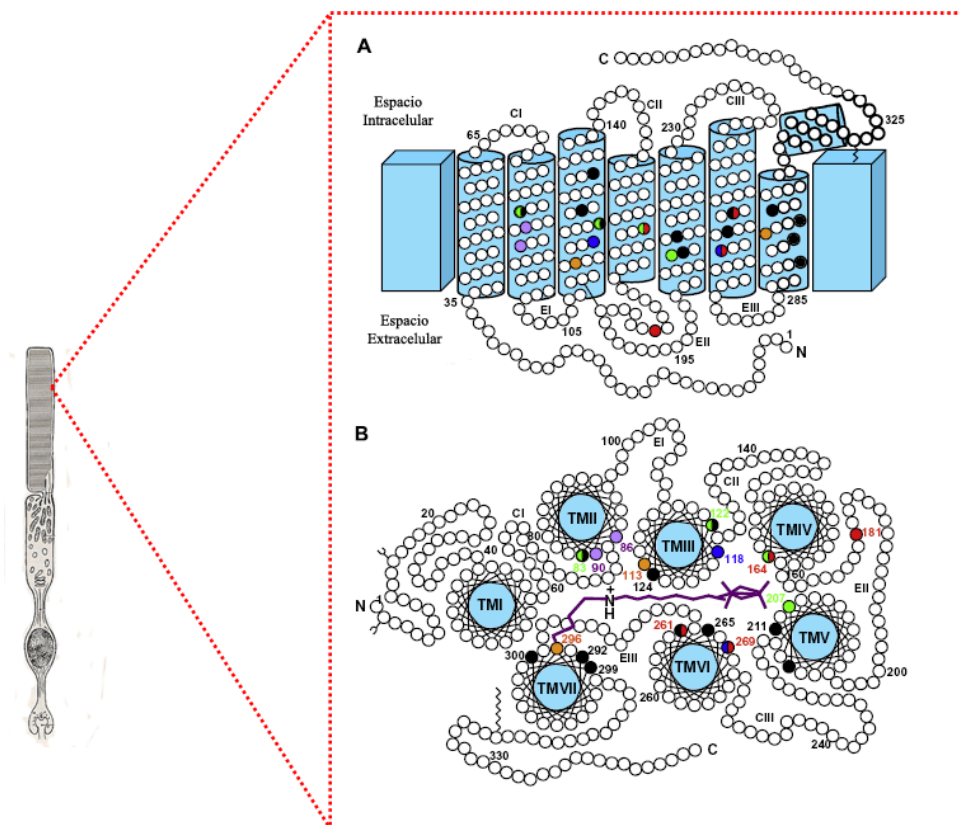


Fig15. Bastón y rodopsina. A- Vista bidimensional del pigmento visual. B-Esquema de las siete α -helices transmembrana (TM I-VII) rodeando al cromóforo (en violeta). Se muestra la unión de éste con la rodopsina a través de la Lisina 296, en color naranja. Modificado de Kahke, 2003 y Bowmaker, 2008.

En el momento que una onda electromagnética, de adecuada intensidad y longitud de onda, alcanza el segmento externo del bastón se produce la excitación del fotorreceptor, que consiste en un cambio de conformación instantáneo del 11-cis-retinal a **Todo-trans-retinal** (All-trans); y en un proceso de sólo 10^{-3} segundos, la rodopsina pasa a **Metarrodopsina II** (MRII ó R*). Es la MRII quién reacciona con la *transducina* (proteína G, Gt) dándose la sustitución de GDP por GTP; esto conlleva la escisión de las subunidades de la transducina en α y $\beta\gamma$. Una molécula de rodopsina puede activar a 100 moléculas de transducina, amplificando la reacción.

A la α -GTP se une la subunidad inhibitoria de la GMPC-Fosfodiesterasa (IPDE), de esta forma la *fosfodiesterasa* (PDE) queda libre de su inhibición siendo completamente funcional. Su activación disminuye la concentración citoplasmática de GMPC, por la hidrólisis de éste a GMP 5'.

En la oscuridad ese GMPC está unido a los canales catiónicos en la membrana del segmento externo (canales dependientes de GMPC) manteniéndolos abiertos, de forma que Na^+ y Ca^{2+} entran en la célula para conferirle su potencial de membrana. El Ca^{2+} , que ha utilizado esta vía de entrada, puede volver a salir gracias al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana. Ante el estímulo luminoso la PDE degrada el GMPC cerrando los canales catiónicos. La consecuencia de la activación de esta cascada metabólica es la restricción de la entrada a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sin embargo, la salida de cationes sigue existiendo y se produce, por tanto, una disminución de cargas positivas en el interior de la células o una *hiperpolarización*. En estas condiciones la liberación de glutamato por la terminal axónica del fotorreceptor disminuye (Cibis et al, 2008; Silbernagl y Despopoulos, 2002).

La **Figura 16** muestra la cascada de activación lumínica en un fotorreceptor y cómo dicho fenómeno se traduce en una mayor o menor liberación de glutamato por el pie sináptico del fotorreceptor.

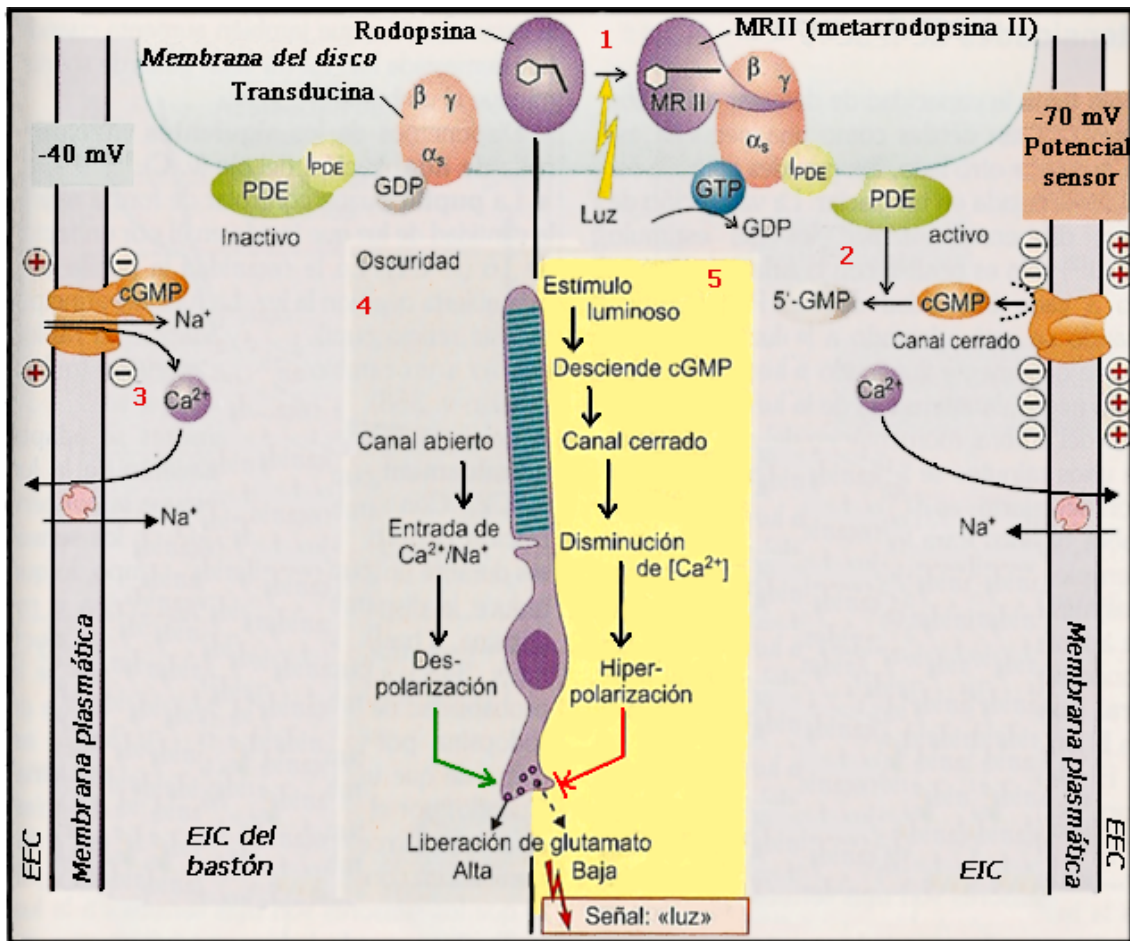


Fig16. Transducción fotoeléctrica. El cambio de conformación del 11-cis-retinal desencadena la activación de la cascada que conduce a la liberación de la fosfodiesterasa (PDE). Esto es desencadenado por la luz en la membrana de los discos (1). La enzima PDE produce la hidrólisis de GMPC en 5'-GMP (2). En oscuridad la entrada de iones a través de canales dependientes de GMPC posibilita un potencial de membrana entorno a los -40 mV (3). La consecuencia de este potencial es la alta liberación de glutamato (4). Sin embargo, la liberación de este neurotransmisor se ve disminuida en condiciones de luz por la hiperpolarización producida por la disminución de la concentración interna de cationes (5). EEC=espacio extracelular; EIC=espacio intracelular. Modificado de *Silbernagl y Despopoulos, 2002*.

Todos los elementos implicados en la fototransducción han de ser recuperados al desaparecer el estímulo lumínico que incide sobre el fotorreceptor ([Mathews y van Holde, 1998](#); [Silbernagl y Despopoulos, 2002](#); [Cibis et al, 2008](#)):

La rodopsina, en su estado de MR II, es captada por una *rodopsina cinasa* que la fosforila en su extremo C-terminal, de esta forma reduce su afinidad a la transducina y aumenta por otra proteína, la *arrestina*. Esta nueva proteína impide la unión MR II-

transducina y también libera el todo-trans-retinal. Este todo-trans-retinaldehido es convertido en todo-trans-retinol, un alcohol isoprenoide, por la retinol deshidrogenasa. El todo-trans es transportado al epitelio pigmentario, gracias a su asociación a la proteína fijadora de retinoides interfotorreceptora, donde se recicla nuevamente a 11-cis-retinal. Este proceso requiere una previa esterificación del todo-trans-retinol por la enzima Lecitin-retinol acil transferasa (Lrat) y posterior isomerización a través de la enzima PRE65. La transducina sufre, en su subunidad α , la escisión del GTP en GDP+Pi por la acción GTPasa intrínseca de la transducina, liberándose así la I_{PDE} y volviéndose a unir la subunidad $\beta\gamma$.

En los conos, la fototransducción es comparativamente menos sensible pero es mayor su rapidez y capacidad de adaptarse a los niveles ambientales de iluminación. En éstos, todos los procesos de la cadena de reacciones han de ser más potentes, más rápidos que en los bastones. La vida útil de la opsina de conos activada debe ser más corta, su inactivación y la inactivación de la transducina deben ser más rápidas ([Burns y Arshavsky, 2005](#); [Cibis et al, 2008](#)).

2.1.3. Transmisión de la información a través de la retina.

Para la obtención de una imagen visual el procesamiento de la información sensorial requiere de la convergencia y divergencia de ésta a lo largo de los diferentes tipos celulares de la retina. De esta manera es posible que la señal generada por varios bastones desemboque en una misma célula bipolar y la información transportada por estas células bipolares puede divergir por distintos caminos.

Los caminos por los que se conduce la información son dos y en ambos casos se inicia por el proceso de fototransducción en las células fotorreceptoras. Por un lado la información viaja a través de células bipolares hasta las células ganglionares, es la **vía centripeta**; ésta utiliza el *glutamato* (Glut) como neurotransmisor. Por otro la señal de los fotorreceptores estimula interneuronas retinianas (horizontales, amacrinas), modulando funcionalmente las células bipolares en la CPE y las células ganglionares (CG) en la CPI; estas dos vías constituyen la **vía transversal**; en este caso los neurotransmisores son ácido γ aminobutírico (GABA) y Glicina.

2.1.3.1. Via Centrípeta.

Desde los trabajos clásicos de Kuffler (1953) es conocido que el sistema nervioso visual transmite informaciones paralelas ante un mismo estímulo. Este sistema de transmisión paralela de la información es debido a la existencia de dos subtipos de células bipolares: *ON* y *OFF*.

Dicha subdivisión es aplicable tan solo a las células bipolares de cono, ya que, como ha sido ampliamente demostrado, las células bipolares de bastón son siempre células de tipo ON (Wässle y Boycott, 1991; de la Villa et al, 1995). La respuesta ON y OFF de las células bipolares se debe a la presencia, en la membrana de las propias células bipolares, de receptores con diferente mecanismo de actuación para el neurotransmisor liberado por los fotorreceptores. Las células bipolares *OFF* presentan un **receptor ionotrópico** para el Glutamato de tipo AMPA/kainato (Wässle y Boycott, 1991), que produce una entrada de cationes al interior de la célula. En el otro lado, las células bipolares *ON*, poseen un **receptor metabotrópico** para el glutamato, mGluR6 (Nakajima et al, 1993; de la Villa et al, 1995; Brandstätter et al, 1998). En este caso, la llegada del neurotransmisor activa una PDE que actúa degradando en GMPc en GMP 5'. La disminución de GMPc intracelular inactiva un canal catiónico dependiente de GMPc. Así en condiciones de oscuridad, una bipolar *OFF* recibirá el Glutamato del fotorreceptor y despolarizará la célula haciendo que ella misma libere neurotransmisor. En cambio, en una célula bipolar *ON*, la llegada del neurotransmisor hiperpolariza la célula inhibiendo la liberación de Glutamato (Kaneko et al, 1994; de la Villa et al, 1995).

Las células bipolares *ON* y *OFF* presentan otra característica diferencial, relacionada con la extensión de su axón y estratificación de su terminal axónica. Las terminales axónicas de las células bipolares de tipo *OFF* establecen sus sinapsis en la porción más superficial de la capa plexiforme interna, a nivel de la denominada sublámina *Off*, mientras que las terminales axónicas de las células bipolares tipo *ON* establecen sus conexiones sinápticas en la sublámina *On* de la capa plexiforme interna.

La **Figura 17** muestra esquemáticamente los mecanismos de respuesta molecular en las células bipolares *ON* y *OFF* y como ello se traduce en la liberación de glutamato a nivel de sus terminales axónicas.

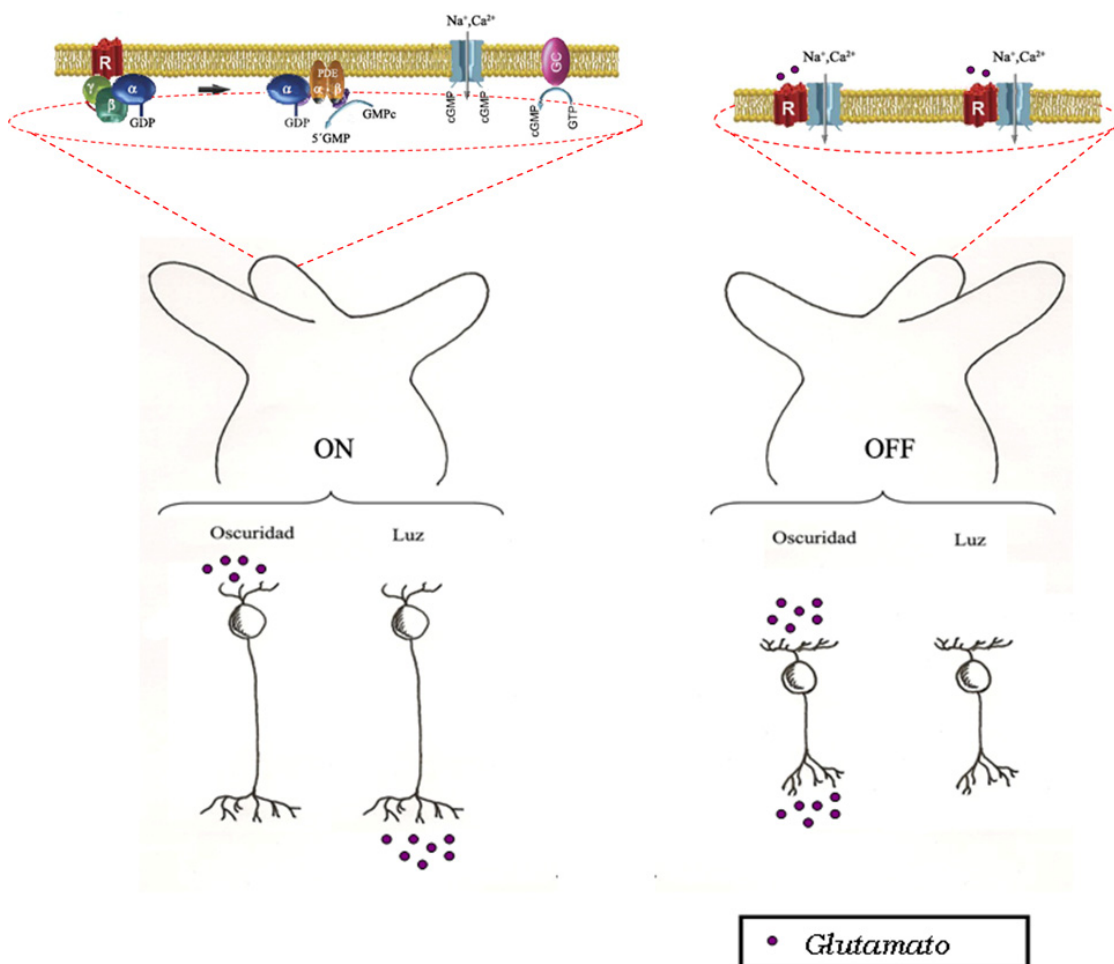


Fig17. Generación de las vías ON y OFF de procesamiento sensorial. La célula bipolar *ON* presenta receptores metabotrópicos para el glutamato. La llegada del neurotransmisor conduce a la activación de una PDE provocando el cierre de canales dependientes de GMPc para sodio y calcio. La hiperpolarización subsiguiente reduce la liberación del neurotransmisor de la célula bipolar. En el caso de la célula bipolar *OFF* el receptor que recibe al glutamato es de tipo ionotrópico. La unión de éste al receptor abre directamente canales catiónicos. La consecuencia es una despolarización de la célula bipolar, y por ende, una mayor liberación de su neurotransmisor. La concentración de glutamato aumenta, a nivel de las dendritas de las células bipolares, en condiciones de oscuridad. En condiciones de luz el glutamato disminuye en el espacio sináptico produciéndose el efecto opuesto al ocurrido en oscuridad. Receptores para glutamato modificado de *Burns y Arshavsky, 2005*.

Las células bipolares *OFF* dan lugar a lo que se conoce como *vía OFF* en el procesamiento visual, gracias a la cual se detectan imágenes oscuras sobre fondos claros. Por su parte, las células bipolares *ON* dan lugar a la *vía ON*, mediante la cual se detectan imágenes claras sobre fondos oscuros (Kolb, 2003).

La señal generada por el estímulo luminoso, en esta vía centripeta, puede seguir dos direcciones desde el cono: bien por las células bipolares *ON*, despolarizándolas (se invierte la señal), excitando a las células ganglionares tipo *ON* con las que conectan; o bien por las células bipolares tipo *OFF* que se hiperpolarizan con la luz e inhiben a las células ganglionares tipo *OFF*. Como ya hemos visto las células bipolares de bastón, no hacen relevo directamente con las células ganglionares, sino que lo hacen a través de las células amacrinas de tipo AII (Famiglietti et al, 1977; Nelson et al, 1978). 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 (Mills et al, 1995).

La respuesta al estímulo luminoso en las células ganglionares mantiene el código ON-OFF. Así, en presencia de un estímulo luminoso, la célula ganglionar *ON* se despolariza y envía potenciales de acción durante el tiempo que dura el estímulo mientras que la célula ganglionar *OFF* se hiperpolariza y deja de emitir potenciales de acción en presencia de estímulos lumínicos. Tan pronto como el estímulo luminoso desaparece, la célula ganglionar *OFF* se despolariza y emite nuevamente potenciales de acción (Kolb, 2003; Kolb y Marshak, 2004; Chalupa y Günhan, 2004).

2.1.3.2. Vía Transversal.

Al estimular uniformemente la retina los impulsos transmitidos *directamente* desde los fotorreceptores, a través de las células bipolares despolarizantes, tienen un carácter excitador. Sin embargo, la información también sigue una transmisión lateral a través de las células bipolares hiperpolarizantes y de las células horizontales. Esta señal es sobre todo inhibitoria (Guyton y Hall, 2006).

Las células horizontales reciben sinapsis de los fotorreceptores y envían información de retorno a los mismos o la dirigen a otros puntos de la retina (otras células horizontales u otros fotorreceptores). Existe una retroalimentación negativa, de mecanismo neural, en los conos: cuando la luz hiperpolariza al cono, éste hiperpolariza a las células horizontales vecinas. Su inhibición interrumpe la liberación de GABA, con lo cual despolariza (desinhibe) al cono por una sinapsis recurrente. Este mecanismo trata de devolver al cono a la situación de oscuridad, la despolarización compite con la hiperpolarización por luz (Rodieck, 1998; Cibis et al, 2008).

Las células horizontales también son importantes por ser, al menos en parte, responsables de la periferia del campo receptor de las células ganglionares (Hubel, 1999). Recientes estudios apuntan a un proceso similar de retroalimentación entre las células horizontales y los bastones, quizás con el propósito de conferir funciones análogas a las obtenidas por la relación Horizontal-Cono (Thoreson et al, 2008)

En la vía transversal también destacan las células amacrinas. La variedad de formas que presentan es enorme e impresiona el número de neurotransmisores que utilizan. Las células amacrinas no reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con las células ganglionares y retroalimentando a las células bipolares (Kolb et al, 2000). El papel funcional de las células amacrinas sería el de integrar y modular las características tempo-espaciales de las señales transmitidas por las células bipolares.

2.2- VIA NO VISUAL.

Hasta el momento hemos tratado de analizar todos los procesos ocurridos en la retina para la formación de una imagen. Sin embargo, la hegemonía de los conos y bastones como desencadenantes de todo proceso ocurrido en la retina ha sucumbido. Son numerosos los estudios que han ido señalando la posibilidad de la existencia de un nuevo tipo de célula fotosensible en los vertebrados. Ya hace muchos años, los estudios del reflejo pupilar con ratones ciegos apuntaban en esta dirección. El Dr. Keeler observó en 1928 una reacción de la pupila en ratones totalmente ciegos, y sugirió varias

explicaciones, como la existencia de células pigmentarias, o la estimulación directa de las células ganglionares (Keeler et al, 1928).

La idea de la presencia de algún nuevo tipo de célula fotosensible iba ganando adeptos y en 1993, el Dr. Kashani apuntaba la hipótesis de una “triple visión” en la retina (Kashani, 1993). Nuevas pistas eran aportadas desde los mecanismos de regulación de hormonas con ajuste circadiano, como es la independencia de los conos y bastones en la liberación cíclica de melatonina (Lucas et al, 1999a; 1999b). Con el descubrimiento de unas células dermales fotosensibles en el anuro *X. laevis* (Provencio et al, 1998b), los vertebrados mostraban la prueba fehaciente de esta nueva célula fotosensible. En los siguientes años (Provencio et al, 2000; 2002a; 2002b; Berson et al, 2002; Hattar et al, 2002) aquella hipótesis de una retina con, al menos, tres células fotosensibles se hacía realidad.

Como ya hemos comentado anteriormente, estas células (ipRGCs) se han caracterizado como una pequeña población de células ganglionares, con la presencia de un pigmento sensible a la luz, la **melanopsina**, necesario para desempeñar su función (Provencio et al, 1998b, 2002a; Gooley et al, 2001; Hannibal y Fahrenkrug, 2002; Hannibal et al, 2002a; Hattar et al, 2002; 2003; 2006; Lucas et al, 2003) y con un amplísimo campo fotoreceptivo, que se solapa entre los subtipos descritos hasta el momento. La melanopsina es menos sensible a la luz que los fotorreceptores clásicos y su respuesta es 100 veces más lenta (Fu et al, 2005), por tanto, las células portadoras de ella son especialistas en la detección de estímulos relativamente brillantes y mantenidos. Los axones de estas células proyectan a diversos centros visuales (**Figura 18**). 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, 2002b; Hannibal y Fahrenkrug, 2004b).

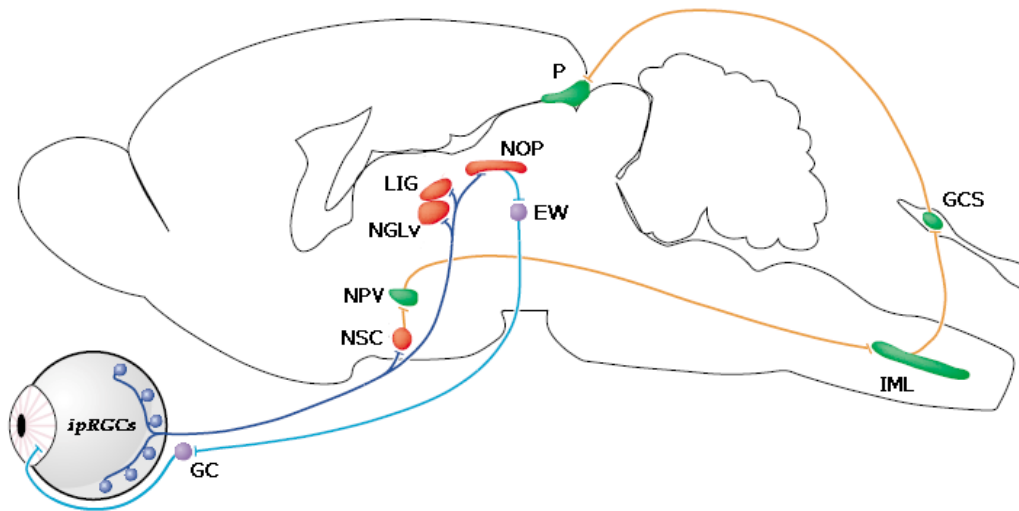


Fig18. Proyecciones de las células ganglionares de la vía no visual. La aferencia de las ipRGCs a diferentes estructuras subcorticales en el ratón se muestran con línea azul oscuro: NSC= núcleo supraquiasmático; NGLV= núcleo geniculado lateral ventral; LIG= lámina intergeniculada; NOP= núcleo de la oliva pretectal. Las eferencias vegetativas para el control del reflejo fotomotor a nivel del iris se presentan con línea azul claro: NOP; EW= núcleo de Edinger Westfall; GC= ganglio ciliar. La señal emitida por la vía no visual incluye caminos a nivel del hipotálamo (NPV= núcleo paraventricular), de la espina dorsal (IML= núcleo intermediolateral) y otros centros (GCS= ganglio colículo superior) para la liberación fotópicamente regulada de melatonina (P= glándula pineal). Modificado de *Berson, 2003*.

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, 2002a; 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, 1999a; 1999b; Thapan et al, 2001), la **supresión de la actividad motora (masking)** (Mrosovsky y Hattar, 2003), y la **regulación de las fases de sueño/vigilia** (Panda et al, 2003; Lupi et al, 2006; 2008; Altimus et al, 2008).



La fototransducción de las células ganglionares.

Las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (*ipRGCs*) presentan unos procesos dendríticos que ocupan una gran área, formando una red fotoreceptiva, a nivel de la CPI. Los axones se agrupan, con los de otras ganglionares, para formar el nervio óptico y sus proyecciones axónicas alcanzan el núcleo supraquiasmático (*NSC*), ciertos centros visuales subcorticales y el cerebro medio o *pretectum* (Berson, 2003). De los tipos de *ipRGCs* determinados hasta hoy, parece ser que las señales a NSC están dominadas por las de tipo M1, mientras que la mayoría de señales al Núcleo Olivario Pretectal (*NOP*) son M2 (Baver et al, 2008; Paul et al, 2009).

La respuesta a la luz de estas células difiere de los *fotorreceptores clásicos* (conos y bastones): la melanopsina es menos sensible que las otras opsinas, requiriendo mayor intensidad lumínica para responder; esta respuesta se da más lentamente que en las otras células fotosensibles, y con una latencia de varios segundos; el efecto de la luz desencadena una cascada que abre canales catiónicos produciendo una despolarización de la célula, como ocurre en la fototransducción de invertebrados; la fotorrespuesta puede darse tanto por estímulos en el soma como en las dendritas. (Berson et al, 2003; 2007, Hankins et al, 2007).

Otras características de las *ipRGC*, en cuanto a su actividad, documentadas en los últimos años, incluyen:

- la existencia de adaptación a la luz y a la oscuridad (Wong et al, 2005);
- la capacidad de mantener una respuesta remarcadamente estable durante un periodo largo (minutos), aunque decaiga significativamente en amplitud tras el pico inicial (Warren et al, 2003);
- el cromóforo es desconocido pero, como todas las opsinas, es posible que utilice una molécula basada en el retinal (Giesberg et al, 2008). Análisis en cultivos de células que expresaban melanopsina fueron capaces de responder a la luz usando diferentes cromóforos: 11-cis, 9-cis, también Todo-trans (Melyan et al, 2005; Panda et al, 2005; Torii et al, 2007).

- la regeneración de su cromóforo es distinto e independiente del mecanismo que usa el ciclo visual de los fotorreceptores clásicos (Tu et al, 2005).
- a pesar de que la melanopsina está ampliamente distribuida por la célula, su densidad es 10^4 veces más baja que en conos y bastones. Para compensarlo las ipRGCs, al igual que los bastones, son capaces de absorber la señal proveniente de un único fotón (Do et al, 2009).

La estructura de la melanopsina sugiere una fuerte relación con los sistemas de señalización por luz de los invertebrados. La fototransducción de invertebrados está muy bien caracterizada en *Drosophyla*; la cascada rabdomérica emplea una proteína G tipo Gq/G11 que activa una PLC con la subsiguiente apertura de los potenciales receptores transitorios (del inglés, *transient receptor potencial* TRP), resultando la despolarización de la membrana celular. La melanopsina parece estar relacionada con una proteína Gq por su estrecha semejanza a los fotorreceptores rabdoméricos; como ejemplos apuntamos: el aumento de IP3 debido a la luz en melanóforos dermales de anfibios, la colocalización de esta Gq con melanopsina en fotorreceptores rabdoméricos del amphioxus *Branquiosstoma beicheri* (Koyanagi et al, 2005; Terakita et al, 2008), al menos un TRP (TRPC) ha sido detectado en las ipRGCs por inmunohistoquímica (Qui et al, 2005; Warren et al, 2006; Kumbalasiri et al, 2007)

Hasta la fecha sólo podemos hipotetizar sobre determinados aspectos de la cascada de activación de las ipRGCs. Por ejemplo, no está claro como ocurre la regeneración del cromóforo. Una hipótesis es que la melanopsina posea una doble funcionalidad: *fotosensorial* y *fotoisomerante*, al igual que ocurre en invertebrados donde su fotopigmento es capaz de transformar el cromóforo de todo-trans-retinal a 11-cis-retinal. Esto se ve apoyado por la capacidad de la melanopsina de autoregenerar el cromóforo en ausencia del ciclo visual del retinoide en el epitelio pigmentario (por la falta de enzimas imprescindibles para el ciclo: *lrat* *-/-*, *rpe65* *-/-*) (Fu et al, 2005; Doyle et al, 2006; Tu et al, 2006). Esto implica una propiedad de **biestabilidad** por parte de la melanopsina (Panda et al, 2005; Mure et al, 2007; Rollag, 2008). Sin embargo, otros trabajos señalan, que a pesar de su capacidad de funcionar como pigmento “biestable”, la melanopsina debe usar algún otro mecanismo de regeneración del retinoide (que sea independiente de la luz) para retornar al estado de oscuridad (Walker et al, 2008).

2.3- PROTEÍNAS EN LA FISIOLÓGÍA DE LA RETINA.

La transmisión del impulso eléctrico, a través de los diferentes tipos celulares de la retina, implica numerosos procesos metabólicos para la continuación y extensión de esta señal. El efecto desencadenado por la transformación de la energía lumínica produce una expresión circadiana de ciertas proteínas. A continuación enumeramos una serie de proteínas características de ciertos tipos celulares y analizamos brevemente su función, estructura y ubicación.

2.3.1. Proteína Kinasa C.

La *quinasa dependiente de fosfolípido y Calcio* o *proteína kinasa C* (PKC) constituye una familia Serina/Treonina quinasa, y conforman el grupo enzimas altamente relacionadas entre sí. Estas enzimas responden a los segundos mensajeros Calcio (Ca^{2+}) y diacilglicerol (DAG) (Huang, 1989).

En un Receptor asociado a proteína G se da el producto de *subunidad α -GTP*, éste activa la Fosfolipasa C (PLC) que escinde el Fosfatidil Inositol Fosfato (PIP_2) en Inositol trifosfato (IP_3) y DAG. El DAG aumenta la afinidad de PKC a los iones Calcio y es el IP_3 quién modifica la concentración de Ca^{2+} intracelular desde las reservas de la propia célula. Parece ser que este Ca^{2+} es el responsable de alterar la PKC, trasladándola del citosol a la membrana, donde es activa. El DAG es rápidamente degradado, por tanto, para mantener la actividad de PKC se hace necesaria una segunda ola de DAG que procede del lípido de membrana Fosfatidilcolina (Alberst et al, 1996; Mathews y van Holde, 1998). De esta manera, podemos resumir en tres los requerimientos de PKC para su activación: Calcio, DAG y fosfolípidos de membrana; estos últimos para favorecer los mecanismos de asociación a la membrana, por fosfatidilserina y para permitir la conservación de la actividad, por el fosfolípido principal de membrana fosfatidilcolina. Las proteínas de la familia PKC fosforilarán residuos Serina y/o Treonina de numerosas dianas, por ejemplo Receptor de GABA_A (Krishek et al, 1994) y Receptor de GABA_C (Feigenspan y Bormann, 1994); también su actividad está ligada a la liberación de neurotransmisor, por ejemplo aumentando el número de fusiones de las vesículas sinápticas en la región cercana a la proteína *ribbon* (Midorikawa et al, 2007)

y/o modulando la acidificación de vesículas sinápticas en células bipolares (Abreu et al, 2008).

Las diferentes isoenzimas fueron identificadas inicialmente en el cerebro de rata por técnicas cromatográficas. Se designaron como PKC I, II, III a los diferentes picos obtenidos por separación desde las columnas de cromatografía. Los dos últimos grupos se encuentran en SNC y tejido periférico. Existen diferencias en la localización subcelular en estos grupos: mientras PKC I y II se presentan principalmente en la membrana de la célula, PKC III es eminentemente citoplasmática. Esto puede ser significativo al analizar los diferentes patrones de sensibilidad a los *inputs* de señalización que reciben (Huang, 1989; Huang y Huang, 1993).

Actualmente se conocen 11 isoenzimas de PKC, repartidas en tres familias (Blobe et al, 1996; García, 1996; Newton, 2003): **familia c** (clásicos): α , β I, β II, γ ; **familia n** (nuevos): δ , ϵ , η , θ , μ ; **familia a** (atípicos): ζ , λ . Todas son monómeros con pesos moleculares entre 68-84 KDa. Presentan dos dominios: *Catalítico* en la región C terminal y *Regulador* en la región N terminal. Diferencias en esos dominios confieren propiedades distintas y determinan la configuración de las familias; así las isoenzimas de PKC de la **familia n** no son dependientes de Ca^{2+} y se activan por DAG y Acidos grasos (AG), mientras que las isoenzimas de la **familia a** sólo son activas mediante AG y no por Ca^{2+} o DAG.

Existe una subunidad catalítica libre que procede de la degradación de PKC a través de calpaínas, una gran familia de al menos 14 formas diferentes de enzimas con numerosas dianas que la hace partícipe de otros tantos procesos celulares. Las más abundantes y ubicuas son *Calpaína 1* o μ -calpaínas y *Calpaína 2* o m-calpaínas; que difieren en la concentración de Ca^{2+} necesaria para su activación (Kifor et al, 2003).

Existen estudios que señalan a la *calpaína 2* como la responsable de la degradación de PKC. Las calpaínas son proteasas cuya activación por Ca^{2+} las emplaza en la membrana desde el citosol. Es ahí desde donde la calpaína activará irreversiblemente a la PKC, por rotura de las subunidades catalítica y reguladora,

generando una forma independiente de fosfolípidos y calcio denominada PKM (Shea et al, 1994).

En retinas de diferentes vertebrados han sido localizadas hasta ocho isoformas de PKC. En el caso del ratón, la isoforma PKC α es característica de las células bipolares de bastón; aunque también existe inmunoreactividad para las células amacrinas (Negishi et al, 1988; Osborne et al, 1991; Wood et al, 1997; Kosaka et al, 1998; Haverkamp y Wässle, 2000; Haverkamp et al, 2003).

2.3.2. Cotransportador Na^{2+} - K^{+} - Cl^{-} .

El cotransportador de Sodio-Potasio-Cloro, NKCC, se caracteriza por la transportación de cuatro iones: $1Na^{2+}:1K^{+}:2Cl^{-}$, que han de estar simultáneamente presentes en el mismo lugar de la membrana para su traslado (Lytle et al, 1995).

El NKCC ha sido localizado en numerosos tejidos de diferentes animales (vertebrados). Son conocidas dos isoformas de este cotransportador: NKCC1, NKCC2. Siendo el NKCC1 la isoforma inicialmente descubierta, se halló en la membrana basolateral de la glándula rectal de tiburón y también en riñón de ratón (Xu et al, 1994; Delpire et al, 1994).

El NKCC se encuentra intercalado en las membranas de diversos tipos celulares en la retina. Predominantemente es expresado en las células horizontales, modulando los potenciales de equilibrio para el Cl^{-} ($E_{Cl} > E_{rest}$), lo cual influye en la transmisión de información procedente de fotorreceptores. Sin embargo, también está presente en la punta de los procesos dendríticos de células bipolares *ON* (Vardi et al, 2000). Este último punto es algo más controvertido, ya que otros trabajos señalan sólo una tinción de las células horizontales, y no de las bipolares *ON*, por parte de NKCC1 (Zhang et al, 2007b).

Éste es un cotransportador de expresión temprana en el desarrollo de la retina. Su presencia explica el efecto despolarizante por GABA y Glicina en neuronas de la retina (Blanco et al, 1996; Vardi et al, 2002; Varela et al, 2005a; 2005b; Li et al, 2008).

La expresión en la membrana celular del cotransportador NKCC contribuye a introducir y acumular el cloruro dentro de la célula y por tanto determina una concentración intracelular de este ión más elevada ($[Cl^-]_{intracelular}$ alta) (Russell, 2000). La activación de los receptores ionotrópicos de GABA en aquellas células que expresen el NKCC producirá la salida de Cl^- , reduciendo la concentración interna de este ión, por tanto despolarizándolas.

NKCC tiene dos isoformas y a nivel de la retina la isoforma presente en exclusividad es NKCC1. La expresión de NKCC1 en el desarrollo es gradual, afectando a las concentraciones intracelulares del ión cloruro y esto implica una diferencia en la actuación de neurotransmisores como GABA. NKCC1 va aumentando su síntesis desde el neonato al adulto; sin embargo, en el adulto el canal NKCC1 va disminuyendo su presencia (Vu et al, 2000; Zhang et al, 2007b; Li et al, 2008)

2.3.3. Melanopsina.

Como ya referimos, las células ganglionares con capacidad fotosensible presentan dicha característica por la expresión de una opsina denominada Melanopsina. Esta proteína es la responsable de la existencia de un sistema óptico secundario paralelo al clásico sistema de conos y bastones.

Hasta hoy su filogenia no es completamente conocida; sin embargo, numerosos estudios señalan un parentesco mayor con las células fotosensibles de invertebrados, en contraposición a la que pudiese existir con similares células de vertebrados. Los aminoácidos de su secuencia tienen gran homología con las opsinas de fotorreceptores rabdoméricos (invertebrados), más que con los fotorreceptores ciliares (vertebrados) (Berson, 2003; 2007). Ya comentamos que la cascada de señalización de la melanopsina se encuentra asociada a un receptor con proteína G, aún así mantiene grandes incógnitas. Estudios recientes apuntan a que esta proteína G pudiera ser un miembro de la familia Gq y el enzima efector para esta proteína G es la PLC β . Como todas las PLC actúa sobre PIP $_2$ dando lugar a IP3 y DAG. Esta señalización por fosfoinositol separa más las ipRGC de los fotorreceptores ciliares y la aproxima a los rabdoméricos (Graham et al, 2008). Estos trabajos también apuntan a que el pico de absorción en el

espectro de luz visible, para inducir fotorrespuesta en las ipRGC, es en la porción del azul (~480nm). Esta proteína fotosensible ha sido localizada en las ipRGCs cubriendo enteramente la membrana plasmática: soma, procesos dendríticos y terminales axónicos, formando parte del tracto retinohipotalámico (Hattar et al, 2002; Belenkey et al, 2003). Siendo, además, fotoexcitable desde el nacimiento (Hannibal y Fahrenkrug, 2004a)

La movilidad electroforética de la proteína parece ser equivalente a una masa molecular de 62KDa, aunque la masa calculada en base a la secuencia de aminoácidos podría ser de 49 KDa (Hannibal et al, 2007). Estudios recientes señalan la potencial glicosilación de dos puntos extracelulares en el N-terminal, como la posible razón de la aparición de dos bandas en el gel (Fahrenkrung et al, 2009).

2.3.4. Tirosina Hidroxilasa.

La Tirosina Hidroxilasa (TH) juega un papel fundamental en la fisiología de las neuronas adrenérgicas. Ésta es la primera enzima en la ruta de síntesis de las catecolaminas. Su acción es la hidroxilación de la tirosina para la obtención de DOPA. Con la descarboxilación de DOPA se obtiene Dopamina, un importantísimo neurotransmisor de las vías dopaminérgicas del Sistema Nervioso Central (Veruki y Wässle, 1996; Nguyen-Legros et al, 1997; Mathews y van Holde, 1998). La enzima se presenta predominantemente en el citosol (Haycock et al, 1985).

A nivel de la retina, existen unas células con capacidad de síntesis y liberación de ese neurotransmisor, dopamina, son las células Amacrinas Dopaminérgicas (AD) y las células amacrinas interplexiformes. Las primeras poseen un rico plexo dendrítico en el estrato más escleral de la capa plexiforme interna (CPI). El papel de la Dopamina es fundamental para los procesos de adaptación visual. La identificación de estas células es posible, a nivel retiniano, por contener el enzima TH.

2.3.5 Calbindina.

La calbindina pertenece a una familia de proteínas unidoras de Calcio de bajo peso molecular; su función es, por tanto, la de regular la concentración intracelular de

este ión. La calbindina D-28K está presente predominantemente en subpoblaciones de neuronas del Sistema Nervioso Central y en ciertas células epiteliales en relación con el transporte de Ca^{2+} . En la retina se encuentra en el soma y procesos de células horizontales. En la presente tesis doctoral utilizamos dos anticuerpos producidos en distintos animales contra la calbindina. Conseguimos un claro marcaje en la capa plexiforme externa de los procesos de células horizontales y de la parte más escleral de la capa nuclear interna (CNI). Este anticuerpo también presenta inmunorreactividad por células bipolares a niveles más internos de la CNI.

Presentamos una lámina (*lámina 1*; véase *Iconografía*, página 141) donde se muestra la inmunorreactividad obtenida para la señal emitida por los anticuerpos anti- $\text{PKC}\alpha$, anti-NKCC, anti-TH y anti-Melanopsina en ratones control en fondo genético C57BL6/J. El anticuerpo anti-PKC marca las células bipolares de bastón. El anticuerpo anti-NKCC reconoce el cotransportador del mismo nombre en dendritas de células bipolares ON además de los somas y procesos de las células horizontales a nivel de la CPE. El anticuerpo anti-TH señala aquellas células que sintetizan catecolaminas. Por último, el pigmento fotosensible melanopsina es reconocido por el anticuerpo N-terminal contra esta proteína en células ganglionares (amablemente cedido por el Dr. Russell Foster de la Universidad de Oxford). En dicha lámina se muestran para cada marcador celular utilizado, el doble marcaje de los núcleos teñidos con el intercalador de ADN 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Las células bipolares de bastón, marcadas con el anticuerpo anti- $\text{PKC}\alpha$, se muestran en rojo, debido a la fluorescencia emitida por la cianina 3 (Cy3, a 570nm). En el caso de las células que expresan NKCC1, el anticuerpo secundario fue portador de una Cy2 cuya excitación emite en color verde (510nm). Se indican con flechas los somas de células horizontales positivas a NKCC1. Las células amacrinas dopaminérgicas son positivas para el anticuerpo anti-TH, cuyo anticuerpo secundario también se asoció a Cy2 (verde); los somas de estas células se sitúan a nivel de la CNI y sus procesos corren paralelos a la parte más externa de la CPI. La tinción de células por el anticuerpo que reconoce epítomos en el extremo N-terminal de la proteína melanopsina se muestran en color rojo (Cy3). Se indican con flechas los somas de las células portadoras de melanopsina en la CG y CNI.



3) ELECTORRETINOGRAMA.

Como ha quedado patente el ojo es un órgano de una complejidad sorprendente. Sin embargo, avances técnicos a lo largo de los años han permitido que podamos tener constancia de la mayoría de los procesos eléctricos acontecidos en la retina. Ello es debido, en parte, gracias a una técnica denominada electrorretinograma (ERG).

Esta técnica presenta la virtud de no conferir daño alguno al paciente por su carácter no invasivo. El ERG no es más que el registro integrado de los cambios de potencial eléctrico en la retina tras un estímulo luminoso.

La posibilidad de recoger la difusa respuesta eléctrica, derivada de los procesos de la retina, se remonta a 1865. El Dr. Alarik F. Holmgren fue el primero en realizar registros desde un ojo de rana e identificó las ondas obtenidas como potenciales de acción del nervio óptico. Los sucesivos trabajos con la técnica de ERG (Dewar en 1877, Riggs en 1941) condujeron al primer uso diagnóstico en Oftalmología en 1845 por el Dr. G. Karpe, que en 1958, fue el primer presidente de la Sociedad Internacional de Electrorretinografía, conocida actualmente como ISCEV (*Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision*). Esta sociedad se encarga de consensuar las normas internacionales para un uso adecuado de la técnica, realizando revisiones de las mismas con una periodicidad de 4 años. (Marmor y Zrenner, 1999; Vilela et al, 1998; Fishman et al, 2001).

La respuesta que recoge el ERG es producida por el movimiento de iones, en las distintas células de la retina. El movimiento iónico se debe fundamentalmente al Potasio (K^+) y al Sodio (Na^+), producido por la apertura y cierre de canales. Esta actividad es medida por un **electrodo de registro** colocado sobre o muy próximo a la córnea. (Lam, 2005).

3.1- ELEMENTOS DEL ERG.

3.1.1. Tipos de ERG.

A lo largo de los años, han ido surgiendo multitud de variantes de la técnica y distintos métodos de registro electroretinográfico, siguiendo una gran variedad de protocolos ([Marmor et al, 2004](#)).

El ERG aporta información sobre la funcionalidad de la retina; sin embargo, el modo de estimular a ésta, representar la información y posteriormente analizarla difiere según que modelo de ERG estemos usando. Entre los distintos tipos de ERG utilizados tanto en investigación como en aplicaciones clínicas, podemos destacar:

ERG de campo completo: consiste en el estímulo global e "isoluminante" de toda la retina. Por ser el método empleado en la presente Tesis, será descrito en detalle en el capítulo de material y métodos.

ERG focal o macular: el ERG de campo lleno puede valorar la función general de bastones y conos pero no puede detectar adecuadamente una disfunción local. En el ERG focal, un estímulo de luz focal es usado para registrar una respuesta de ERG local. Generalmente las respuestas de conos en la fovea son valoradas con este ERG focal. Se aplica un estímulo cíclico blanco de 30-42 Hz. El haz de luz es circundado con un anillo de luz más brillante para evitar las respuestas de bastones y conos cercanos a la mácula. Los valores normales del ERG focal varían en función del diámetro, la frecuencia y la intensidad del estímulo ([Lam, 2005](#)).

ERG multifocal: como en el caso anterior, se utiliza para aportar información funcional topográfica de la retina, tanto en pacientes que sufren degeneración macular y paracentral como los que sufren glaucoma incipiente ([Hood y Greenstein, 2003](#)). El electroretinograma multifocal (*mfERG*) fue desarrollado por Sutter y Tran (1992). En esta prueba, se utiliza un estímulo compuesto por un patrón de hexágonos dispuestos en una malla concéntrica que es capaz de estimular específicamente áreas retinianas centrales (maculares) o periféricas (campos retinianos nasales y temporales, superiores e inferiores). El número de

hexágonos para el estímulo multifocal abarca rangos desde 61 a 241. Un menor número de hexágonos requiere más cortos tiempos de registro, produciendo respuestas más largas pero disminuyendo la resolución espacial. Mediante el uso de recursos informáticos y herramientas de computación se pueden analizar la contribución de cada área focal de la retina al registro conjunto, obteniéndose con ello trazados electroretinográficos de áreas precisas. La disposición espacial de los conos en la retina, con una mayor densidad en la mácula y menor en retina periférica, determina que los trazados electroretinográficos registrados en cada área sean de distinta magnitud. Este tipo de registros está permitiendo en el momento actual llegar a diagnosticar lesiones retinianas de tan solo unos pocos milímetros cuadrados de superficie, en fases precoces de enfermedades degenerativas (Lam, 2005).

ERG de potencial temprano de receptores (ERP): Esta respuesta aparece inmediatamente después de la aplicación del estímulo y tiene un patrón bifásico. Registros del ERP con microelectrodos y registros intracelulares demuestran que el ERP es generado por los fotorreceptores (Brown y Murakami, 1964; Murakami y Pak, 1970). El ERP ha sido utilizado en investigación para conocer, de forma no invasiva, la concentración del pigmento visual durante la adaptación a la luz y a la oscuridad seguida de una exposición a una luz intensa que puede causar un blanqueamiento del pigmento (Hodgkin y O'Bryan, 1977). En humanos, se utiliza de forma ocasional para estimar la densidad de la rodopsina en pacientes que sufren retinitis pigmentosa.

ERG patrón (ERG pattern): Las respuestas obtenidas son producidas por un dámetro de estímulos que presentan alternancia negro-blanco en los cuadrados unitarios que lo configuran. Este modelo aporta información de la funcionalidad de las células ganglionares, con contribución de otros elementos celulares intrarretinianos. Clínicamente es posible evaluar la función macular y de las células ganglionares. Mientras que el ERG de campo lleno mide la actividad retinal en respuesta a un cambio en la luminancia, el ERG pattern detecta actividad de la retina en respuesta a un estímulo reversible blanco-negro. Existen dos categorías de respuestas reconocidas por este ERG: *Transitorias* y *Estado Estático*. Las primeras ocurren cuando los ratios de alternancia son lo suficientemente bajos como para permitir a la retina recuperarse entre estímulos. Las respuestas *Estado*

Estático ocurren por todo lo contrario, cuando la alternancia es demasiado rápida para la recuperación (Lam, 2005).

3.1.2. Orígenes de las respuestas Electrorretinográficas.

La representación gráfica de un ERG consiste en una serie de deflexiones positivas y negativas, resultantes de la activación de distintos tipos celulares en la retina. Eindhoven y Jolly hicieron una previa interpretación de tres de los componentes del ERG. Denominaron con la letra **a** a la deflexión negativa inicial, con la letra **b** señalaron la siguiente onda de carácter positivo y finalmente como onda **c**, un último y prolongado componente positivo. Granit y Riddell trabajando con retina de gato, en 1933, demostraron que las ondas del ERG eran una sumación de tres procesos o potenciales llamados **PI**, **PII**, **PIII**. El primero corresponde con un potencial positivo generado en el epitelio pigmentario. PII es un potencial positivo de la retina interna relacionado, principalmente, con células bipolares. Por último, PIII, es un potencial negativo que consiste en dos componentes separados (fases), que se produce desde dos clases diferentes de células. La fase uno es llamada *potencial receptor* o *fase PIII* y es debido al cierre de canales de Sodio en los fotorreceptores. La segunda fase es llamada *show PIII* y es debido a la hiperpolarización de la porción distal de las células de Müller. Los potenciales PI, PII, PIII corresponden con las ondas **c**, **b** y **a** respectivamente (Fishman et al, 2001; Lam, 2005).

Cuando la retina de un vertebrado absorbe luz por su pigmento visual se desencadena una cascada de activación dentro del segmento externo del fotorreceptor. La hiperpolarización subsiguiente es producida por un descenso de la conductancia de cationes, concretamente de Sodio. Ese cambio de potencial de membrana es medido como la onda **a** del ERG. La hiperpolarización conlleva una disminución de la liberación del neurotransmisor que generará despolarizaciones e hiperpolarizaciones a nivel de las células bipolares. La principal consecuencia de la despolarización de bipolares es un aumento de Potasio extracelular, primero en CPE causando la despolarización de células de Müller, y luego a nivel de la CPI, derivado de las despolarizaciones de células amacrinas, horizontales y ganglionares. En la formación de la onda **b** participan ambos incrementos en el potasio extracelular, con más peso el

ocurrido a nivel de la CPE (Fishman et al, 2001). La **Figura 19** muestra las deflexiones típicas de un ERG de campo completo ante un estímulo de muy corta duración.

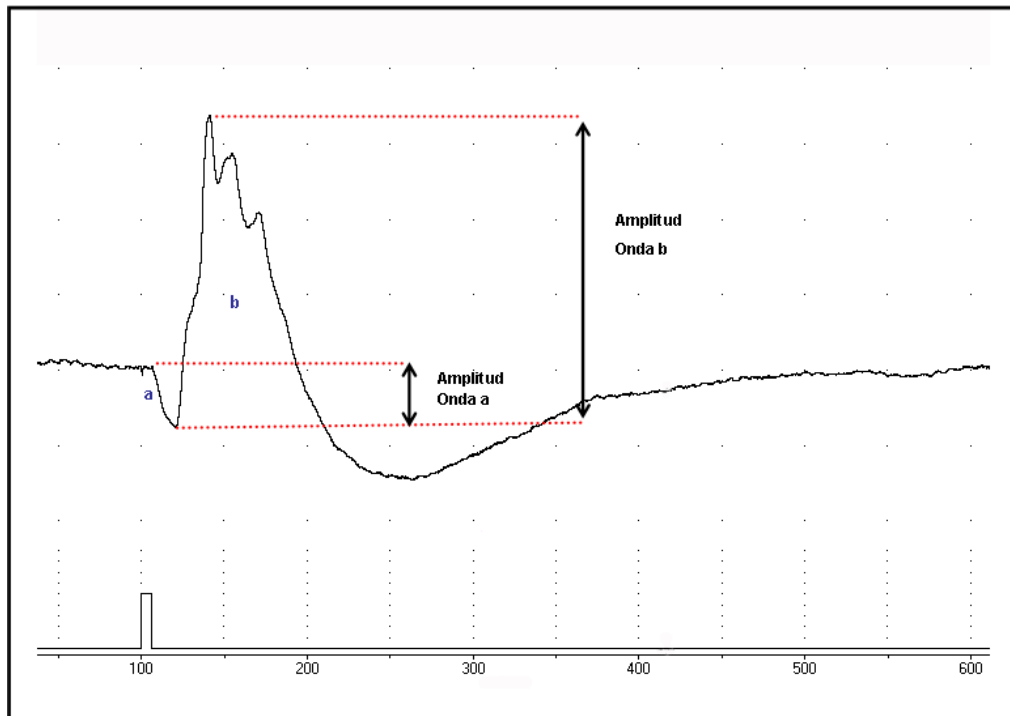


Fig19. Ondas de un electroretinograma en un registro fotópico. En el margen inferior de la figura se representa el estímulo dado a los 100ms de iniciarse la señal. Ante ese estímulo luminoso se capta, en primer lugar, una deflexión negativa denominada *onda a* (a), inmediatamente comienza una deflexión positiva, conocida como *onda b* (b). La amplitud de ambas ondas son parámetros utilizados en el análisis de las respuestas.

Como ya se ha comentado, son muchas las posibilidades de estimulación y registro que permite el ERG. Por ello, atendiendo a las condiciones lumínicas en las que son obtenidas las respuestas, actualmente se han establecido unos estándares de registro electroretinográfico (Fishman et al, 2001; Lam, 2005):

Respuestas escotópicas: en condiciones de oscuridad y con *flashes* débiles, cortos y aislados, el camino de señalización de los bastones aportan las respuestas electroretinográficas con una prominente *onda b*. Sin embargo, la *onda a* no es

perceptible al ser los estímulos demasiado pequeños para que las respuestas hiperpolarizantes de bastones sean detectadas.

En las condiciones escotópicas es posible ver como un estímulo brillante combina las respuestas de conos y bastones, presentando una llamativa *onda a* y *onda b*. Son las *respuestas mixtas*. La *onda a* es debida a la hiperpolarización de los fotorreceptores. La forma y pico de la *onda b* es debida a la interacción de fotorreceptores y retina interna. Esta *onda b* es debida a la despolarización de células bipolares *ON*, causando la despolarización de las células de Müller.

Respuestas fotópicas: las respuestas obtenidas en estas condiciones, ante un *flash* único de luz, presentan una clara *onda a* y *onda b*. En este caso, sólo el proceso de fototransducción de los conos participa en la formación de la *onda a*; pero hay que añadir la contribución que tiene desde la actividad postsináptica a conos. La *onda a* está influenciada por esa actividad de la retina interna incluyendo la hiperpolarización de bipolares tipo *OFF*. Por otro lado, la *onda b* vuelve a deberse a las despolarizaciones de la retina interna, siendo también afectada por las actividades de bipolares *OFF* y horizontales. Es decir, la respuesta se obtiene por la vía de señalización de los conos.

En las condiciones fotópicas también es posible generar una respuesta consistente en varias *ondas b*. Es también una respuesta de conos con un estímulo repetido con una frecuencia de entre 20 y 50 Hz. En este caso la contribución directa de los conos es muy pequeña. Esta respuesta, conocida como *flicker*, está constituida por componentes *On* y *Off*, que se van contrarrestando.

Falta mencionar un último tipo de respuesta que es posible registrar en ambos tipos de condiciones, escotópicas y fotópicas. Es el registro de los *potenciales oscilatorios*, y es debido a la actividad conjunta de bastones y conos. Consisten en 4-6 ondas que aparecen en el ascenso de la *onda b*. Las ondas se denominan con una numeración cardinal y las siglas OP: OP1 y OP2 parecen ser mediadas por conos, mientras que OP3 y OP4 lo son por bastones. Aún así no es muy claro el mecanismo por el cuál se producen y una posible interpretación es que estos potenciales son

evocados por amacrininas, o posiblemente interplexiformes, y bipolares, aunque la contribución de estas últimas no está bien establecida y es motivo de controversia entre diferentes autores (Wachmeister, 1998; de la Villa y Blanco, 2004; Lam, 2005). Cabe destacar que estas divisiones, en pequeñas ondas, de los potenciales oscilatorios se relacionan de la siguiente manera: las ondas tempranas con el camino ON y las tardías con el camino OFF.

3.1.3. Estandarización de las respuestas del ERG.

Debido a la gran diversidad de modelos para obtener un registro de la actividad eléctrica de la retina y con el fin de poder comparar resultados en un ámbito internacional, la ISCEV fijó en cinco las respuestas de análisis al emplear un ERG de campo lleno, obtenidas en base al tipo de estímulo y condiciones lumínicas (**Figura 20**).

En el ERG de campo lleno estándar, el estímulo luminoso es un flash de luz blanca y la intensidad de este estímulo varía en función del trazado que se pretenda registrar; asimismo, en la iluminación de fondo para los registros en condiciones fotópicas también se emplea luz blanca (Marmor et al, 2004; 2009; Lam, 2005). En cada registro, debe medirse la amplitud máxima de cada onda y el tiempo que transcurre desde la aplicación del estímulo luminoso hasta el pico máximo para cada onda analizada (valor mínimo en onda-a o máximo en onda-b), esta medida recibe el nombre de **tiempo implícito** (Marmor et al, 2004; 2009; Lam, 2005).

Sensibilidad de bastones: se obtiene por el registro de la actividad de eléctrica de la retina en condiciones de adaptación a la oscuridad (condiciones escotópicas). El *flash* luminoso es de pocos milisegundos de duración. El trazado electroretinográfico muestra tan solo una deflexión positiva (onda b_{dim}) de unos cientos de μV . Dicha onda, generada fundamentalmente en las células bipolares de bastón, es de curso temporal lento.

Respuesta máxima escotópica, o respuesta mixta de conos y bastones: Es el trazado electroretinográfico que se registra ante un *flash* de luz blanca, de gran intensidad y corta duración que es capaz de activar completamente tanto conos como

bastones. La conforman una deflexión negativa (*onda a*), seguida de una deflexión positiva (*onda b*).

Potenciales oscilatorios: consisten en una serie de deflexiones positivas y negativas, de curso temporal rápido y que se obtienen al filtrar eléctricamente el registro. El estímulo es potente y el periodo interestímulo dependerá de las condiciones lumínicas en las que se realice el registro.

Respuesta de conos: Es necesaria la adaptación de la retina a la luz (condiciones fotópicas) mediante la aplicación de una luz de fondo. De esta forma la contribución de los bastones se ve anulada por encontrarse saturados (“blanqueo” de los bastones). Se genera una deflexión negativa, seguida de una serie de deflexiones positivas (*onda b_{fot}*).

Respuesta de estímulos repetidos o *respuesta flicker*: Consiste en el trazado electroretinográfico que se registra ante la estimulación repetida con *flashes* de luz blanca de corta duración, de gran intensidad, aplicados con una frecuencia de 20 – 50 Hz, en condiciones fotópicas. El registro consiste en una serie de deflexiones positivas y negativas, generadas por la activación de los conos y sus células postsinápticas.

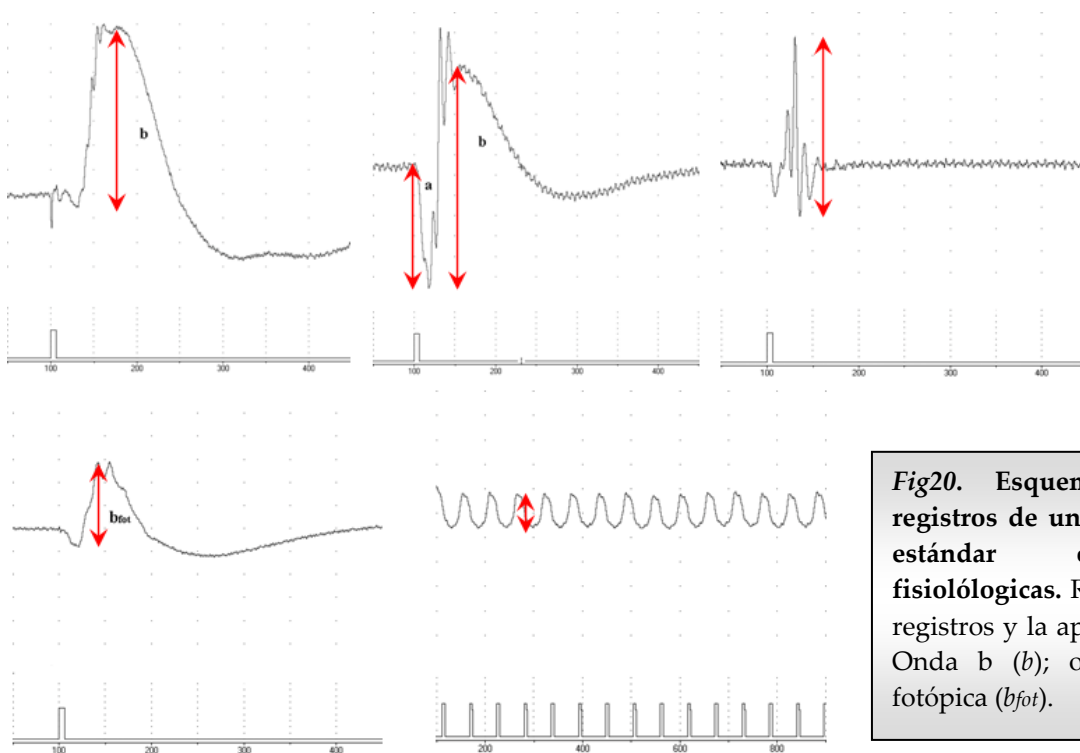


Fig20. Esquema de los cinco registros de un electroretinograma estándar en condiciones fisiológicas. Representación de los registros y la aplicación de estímulo. Onda b (*b*); onda a (*a*); onda b fotópica (*b_{fot}*).



4) DEGENERACIONES RETINIANAS.

Hasta aquí hemos venido desarrollando la estructura y fisiología de una retina normal. Sin embargo, en la naturaleza se pueden dar defectos genéticos o mecanismos naturales que conducen a una retina degenerada o a un proceso degenerativo. De naturaleza genética son aquellas mutaciones que pueden afectar a bastones a nivel de: la rodopsina, transducina, PDE de GMPc, arrestina, rodopsina cinasa, guanilato ciclasa, transportador, canal de calcio de tipo L. Incluso a ambos fotorreceptores, bastones y conos: defectos en la periferina, ROM1, proteína regulada por el oxígeno, opsinas L y/o M., proteína 65 del epitelio pigmentario (EPR65 ó RPE65), 11-*cis*- retino deshidrogenada, etc (Cibis et al, 2008).

Denominamos degeneraciones retinianas aquellas que son consecuencia de una progresiva desaparición o muerte de estructuras oculares que han alcanzado un desarrollo completo (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 a 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).

En el desarrollo de la presente Tesis doctoral hemos empleado ratones con procesos degenerativos para el estudio del papel de las diferentes células fotosensibles en la fisiología de la retina. El ratón empleado para el análisis de resultados en condiciones de no-presencia de fotorreceptores clásicos fue el ratón *rd/rd*. Los ratones *rd* (*rod degeneration*) agrupan a diferentes modelos animales con diferencias en la velocidad de degeneración de sus células fotosensibles. En nuestros estudios hemos utilizado el ratón *Rd10* que presenta una mutación en el gen que codifica la subunidad β de la fosfodiesterasa de bastones. Estos ratones simulan una enfermedad degenerativa humana conocida como **retinosis pigmentaria**. Este modelo ha sido ampliamente caracterizado y se conocen bien los sucesivos pasos de su degeneración retiniana (Chang et al, 2002) (véase *Materiales y Métodos*).

El término Retinosis Pigmentaria (RP) hace referencia a un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que causan la degeneración de las células fotorreceptoras de la retina humana (Gutiérrez-Torre, 1995; Milam et al., 1998). La RP es la distrofia retiniana más frecuente, siendo la cuarta causa de ceguera en el mundo (Gutiérrez-Torre, 1995). Los primeros síntomas de la enfermedad, que aparecen con frecuencia en la adolescencia, son la perturbación de la visión nocturna y la pérdida del campo visual medio-periférico (Milam et al., 1998). En la RP, la disfunción de los bastones, que suele preceder a la de los conos, causa la temprana pérdida de visión nocturna. La pérdida visual causada por la muerte de los bastones y conos suele comenzar con frecuencia en la zona medio-periférica; posteriormente, la muerte de los fotorreceptores ubicados en la mácula reduce la visión central. La pérdida de los bastones y los conos está acompañada por cambios en las células del EP, las neuronas de la retina interna, los vasos sanguíneos y la glía (Milam et al., 1998).

OBJETIVOS



La hipótesis de la presente Tesis doctoral defiende el papel de las ipRGCs en los procesos neurales de adaptación lumínica como mecanismos de modulación de la respuesta funcional de la retina. Los posibles contactos que estas células realizan dentro de la retina nos llevan a plantear una interacción moduladora de las ipRGCs con otros tipos celulares. Nuestra hipótesis apuesta por una regulación directa de las ipRGCs sobre la retina externa, con la afectación acompañada de ciertas proteínas en su expresión circadiana. Esta implicación en el ajuste de la funcionalidad de ciertas proteínas es respaldada por la participación en el aumento de las respuestas electroretinográficas de la retina. Asimismo, para comprender más ampliamente la importancia de las ipRGCs en el desarrollo funcional de la retina, planteamos el papel funcional que puedan desempeñar estas células en la sincronización lumínica de la actividad circadiana.

Como objetivos particulares desarrollamos técnicas y creamos protocolos para:

- Analizar el comportamiento circadiano de la expresión de proteínas características de ciertos tipos celulares de la retina, en los distintos modelos murinos: animales control, animales con degeneración de fotorreceptores (Rd10) y animales carentes de melanopsina (Opn4 KO), con el propósito de establecer la posible relación de las diferentes células fotosensibles con dicho comportamiento.
- Analizar la respuesta electroretinográfica de animales sanos, *wt*, en condiciones de estimulación y no estimulación de las ipRGCs, en busca de la relación de estas células con la fase circadiana o con la intensidad de la luz ambiental.
- Analizar el papel de las ipRGCs en los mecanismos de adaptación y regulación circadiana en animales sanos y con degeneración de la capa de fotorreceptores ante diferentes escenarios de desajustes horarios.



*MATERIALES Y
MÉTODOS*



1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

En la presente Tesis Doctoral se persigue estudiar los mecanismos fisiológicos implicados en la adaptación a la luz y a la oscuridad, ya sean derivados de la actividad circadiana endógena o de la iluminación sufrida por el animal. Para ello, hemos empleado como animal de experimentación el ratón (*Mus musculus*, L. 1758).

1.1- MODELOS ANIMALES

Con el fin de llevar a cabo los distintos experimentos, hemos empleado TRES modelos murinos con distinto contenido retiniano en células fotosensibles:

- **Ratón *Control o wild-type (wt)*: C57BL/6J** es el fondo genético de estos ratones control. Adquiridos de los Laboratorios Jackson, la cepa C57BL/6J es probablemente el ratón mejor conocido en investigación científica y está siendo utilizado en diversos campos de la investigación, como la biología del desarrollo, genética, inmunología, neurobiología o estudio de enfermedades metabólicas (diabetes y obesidad). El ratón C57BL/6J es comúnmente utilizado como cepa origen para la generación de ratones transgénicos. Tienen una vida media larga (entre los 2 y 3 años) y baja susceptibilidad a los tumores (www.jax.org). Todas estas características, junto con la gran disponibilidad y fácil cría, nos llevaron a elegir a esta cepa como ratones control.

- **Ratón *Rd10 (Pdebrd10^{-/-})***: El grupo de ratones *rd* (*rod degeneration*) han sido ampliamente utilizados como modelos animales de la enfermedad humana de la Retinosis Pigmentaria ([Chang et al, 2002](#)). El modelo de ratón Rd10 empleado en la Tesis Doctoral fue donado por el Dr. B. Chang, de los laboratorios Jackson. Los ratones homocigotos *rd10* muestran una degeneración de la retina casi completa para la cuarta semana de vida ([Chang et al, 2002](#)). Análisis genéticos muestran que estos ratones sufren una mutación espontánea del exón 13 de la subunidad β de la PDE-GMPc. El ratón *rd10* se encuentra en fondo genético C57BL/6J.

La degeneración de fotorreceptores en ratones Rd10 afecta tanto a conos como a bastones (**Figura 21**). Los bastones comienzan su degeneración sobre la segunda

semana de vida del animal, la pérdida es máxima entre los días 20-25, existiendo un claro gradiente centro-periferia (Chang et al., 2002; Gargini et al, 2007). La muerte de los bastones influye en la vida de los conos, cuya degeneración es mucho más lenta (Carter-Dawson et al, 1978); es posible observar un marcaje disperso de conos a nivel de la capa nuclear externa (CNE) en animales de más de 5 meses de edad. Sin embargo, estos perfiles corresponden a restos de los conos degenerados o pies de conos que persisten en su ubicación inicial (Gargini et al, 2007). Las células bipolares de bastón pierden sus procesos dendríticos casi completamente al final de la tercera semana (Strettoi et al, 2003). La degeneración de fotorreceptores también afecta a los procesos dendríticos de las células horizontales, así como a otros tipos celulares, que también se ven alterados a lo largo de la vida del animal (Strettoi y Pignaleti, 2000). Estudios funcionales de la retina de estos ratones señalan la pérdida absoluta de visión escotópica a los 30 días y de la visión fotópica entre los 45 y 60 días desde el nacimiento (Varela et al, 2003; Barhoum, 2006; Chang et al, 2007; Corrochano et al, 2008).

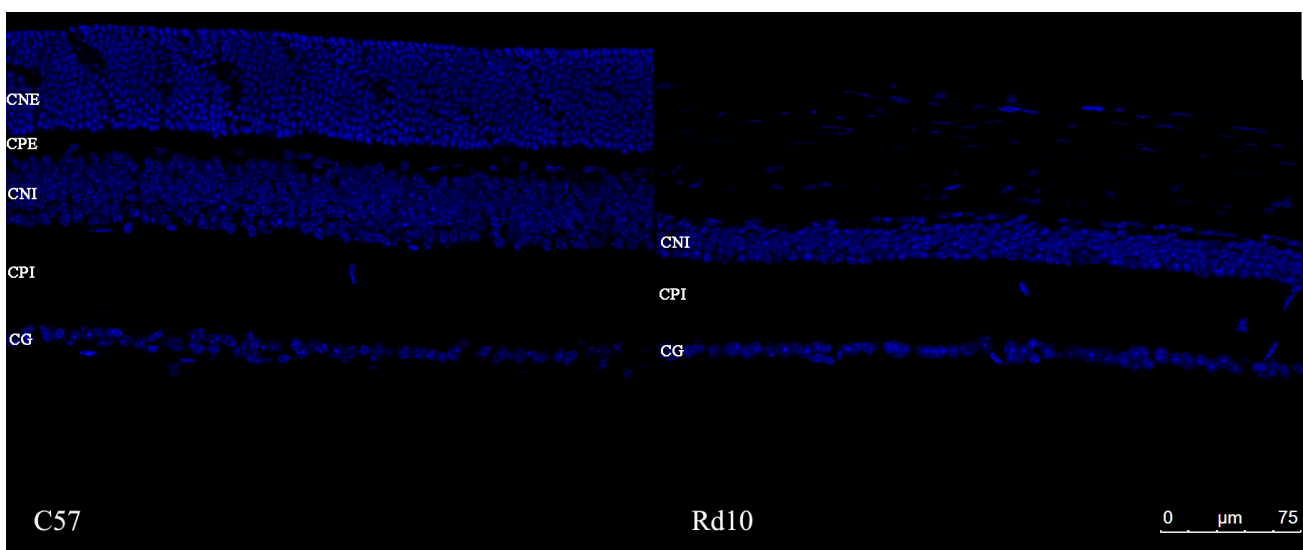


Fig21. Capas nucleares de los diferentes modelos animales: Marcaje celular de retina de ratones controles y ratones distróficos Rd10: Se muestran secciones de 14 μm de espesor de retina de ratón control (C57) y ratón Rd10 de tres meses de edad marcadas con DAPI. CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CG: capa de células ganglionares. Escala 75 μm para ambas imágenes.



• **Ratón *Opn4*^{-/-} (*Opn4KO*):** Este modelo animal carece de la capacidad de expresión de melanopsina en sus células ganglionares y fue amablemente cedido por el Laboratorio del Dr. R. Foster, *Circadian and Visual Neuroscience Group Nuffield Lab of Ophthalmology* de la Universidad de Oxford.

La melanopsina o proteína *Opn4* es el f otopigmento encargado de conferir capacidad fotosensible a las células que la portan. Su descubrimiento en melanóforos de anfibios (*Xenopus laevis*) en 1998 por el Dr. Provencio abrió la puerta a la búsqueda e investigación de nuevas moléculas captadoras de luz. En mamíferos la melanopsina se localiza en un tipo de célula ganglionar de la retina, las células ganglionares fotosensibles (Provencio et al, 2002b; Berson et al, 2002; Panda et al, 2002; Ruby et al, 2002; Hattar et al, 2003).

Las células ganglionares fotosensibles participan en procesos no visuales: regulación de la síntesis de melanopsina, regulación de los ritmos circadianos, regulación del diámetro pupilar. Estas funciones se hicieron patentes con la creación de modelos portadores de disrupción del locus de melanopsina. Tres líneas fueron generadas por inserción de distintos casetes en diferentes exones del gen de la melanopsina.

El modelo empleado en la presente Tesis fue creado por Hattar y colaboradores (2002), donde un gen híbrido, *tau-LacZ*, fue insertado reemplazando la melanopsina. El fondo genético en el que se diseñó el *Knockout* de melanopsina fue una mezcla de fondo *C57Bl/6J* y *129/SvJ* (Hattar et al, 2002). Los animales con una correcta inserción de ese casete codifican para la proteína bacteriana β -galactosidasa. Además se transcribe la proteína asociada a actina, *tau*; que se encuentra fusionada a la enzima β -galactosidasa. La participación de ambas proteínas permite la visualización por marcaje X-gal *in situ* de somas y terminales presinápticos, axones y sus dianas en Sistema Nervioso Central (Lucas et al, 2008).



1.2- CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS RATONES.

El mantenimiento y manipulación de los ratones utilizados en la presente Tesis, 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. Cumpliendo dicha normativa, el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá 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 con ultrafiltración de aire de entrada y salida a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air Filtres) 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. Los ciclos circadianos fueron de 12h/12h luz/oscuridad, mantenidos con luz emitida desde los fluorescentes de la habitación (luz indirecta $>200 \text{ cd/m}^2$) en la fase de día y completa oscuridad en la fase de noche.

Para la realización de los experimentos de actividad circadiana que se refieren más abajo, los animales se ubicaron en unas cajas de adaptación circadiana de forma individual, con suficiente antelación al experimento para permitir su adecuación. Las condiciones en la caja eran las mismas que las del rack descrito en hojas anteriores.

1.3- RITMOS LUZ/OSCURIDAD Y RITMOS BIOLÓGICOS.

Los experimentos descritos en la presente Tesis Doctoral han sido clasificados mediante una terminología cronobiológica. La información relativa a cada experimento incluye la hora del ciclo biológico intrínseco en la que se encontraba cada animal de experimentación, así como las condiciones lumínicas de su entorno.



Los ritmos circadianos son oscilaciones cíclicas en las reacciones bioquímicas y en el comportamiento de los organismos; éstos ocurren con una periodicidad de aproximadamente veinticuatro horas. Si un organismo es aislado de la influencia de los factores ambientales - luz, temperatura, humedad y sonido- éste desarrolla ritmos biológicos que presentan una periodicidad cercana a las 24 horas. Sin embargo, como la duración de esos ciclos no siempre es de 24 horas, debemos referirnos a ellos como días subjetivos que, esto sí, se dividen en 24 horas subjetivas u horas circadianas. En este caso nos referiremos a tiempo circadiano (CT, del inglés *circadian time*) (S.A.H.A., 2009) Son por tanto **ritmos circadianos** (del latín *Circa*=cerca y *Dies*=días) aquellos que el organismo, endógenamente, ajusta al ciclo aproximado de un día. En el ratón, la duración de estos ritmos se estima en 23,5 horas (Rollag et al, 2003; Forns, 2008; Hatori et al, 2008)

Este ritmo circadiano presentan tres propiedades fundamentales (Kavakli y Sancar, 2002):

- 1- Su naturaleza innata.
- 2- Su capacidad de mantener su periodo, o fase intrínseca, a pesar de las fluctuaciones externas en relación a la temperatura.
- 3- Su fotoadaptación, o capacidad de sincronización de las fases del ritmo con el ciclo externo luz-oscuridad del día solar.

Como queda patente con el tercer punto, el factor exógeno más importante que sincroniza las fases circadianas al medio ambiente es la luz.

Cuando un animal se encuentra bajo condiciones ambientales periódicas manifiesta un ritmo circadiano con el mismo periodo que el entorno. Los elementos externos que utiliza el organismo como referencias temporales para poder encarrilar sus ritmos se conocen con el término alemán **zeitgebers** (*Zeit*=tiempo y *Geber*= "dador, marcador") (Sharma y Chandrashekar, 2005).

Para situar un fenómeno en el tiempo se hace referencia al zeitgeber time (ZT), que consiste en contar fases de 60 minutos a partir del momento en que se aplica el



zeitgeber. Así podemos dividir el ciclo de 24 horas en función de la alternancia entre luz y oscuridad; siendo ZT00 el momento en el que la luz comienza y ZT12 el momento en el que desaparece. Comparativamente serían los momentos de la salida y la puesta del sol respectivamente.

Por tanto, cada ZT es una fracción de 24 ($ZT00=1/24$) que relaciona la actividad del animal con la fase circadiana ambiental en función de la luz. La **Figura 22** muestra de forma esquemática el estado de actividad del animal en relación a la iluminación recibida.

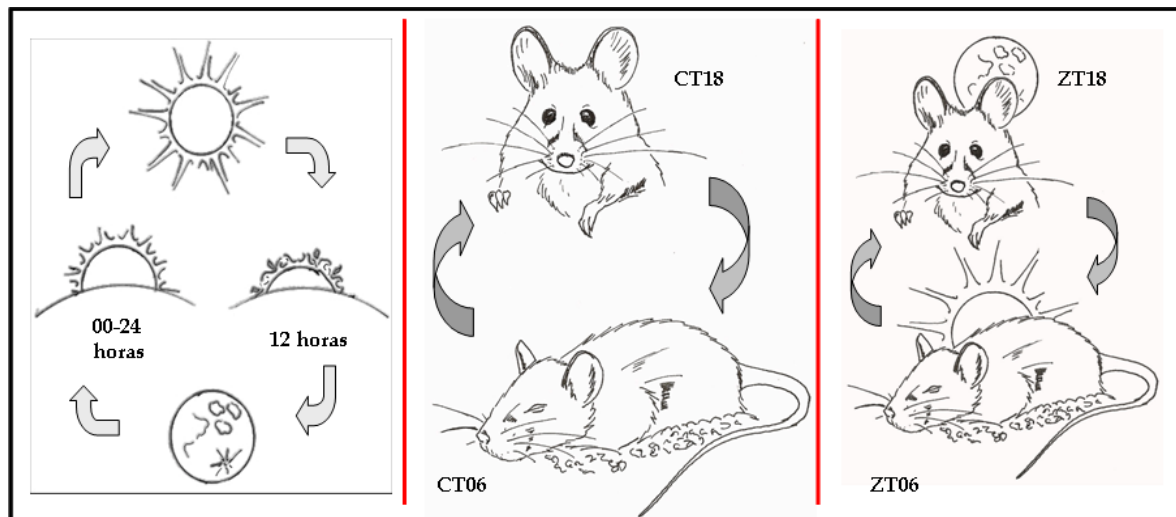


Fig22. Ritmos y ciclos naturales: La tierra rota sobre si misma en un periodo de 24 horas; en ese tiempo discernimos dos fases, una de luz (0-12h) y otra de oscuridad (12-24h). Los seres vivos presentan una regulación cíclica que afecta a su metabolismo y comportamiento (ritmos circadianos) cuya periodicidad es cercana a las 24 horas (CT, Circadian Time). Sin embargo estos ciclos se mantienen independientemente de los factores externos (zeitgebers). De esos factores el más importante es la luz. Las horas del día se pueden denominar con las siglas ZT (Zeitgeber Time) para relacionarlas con los ciclos endógenos de los seres vivos. El ratón presenta su fase de actividad durante la noche



2) TÉCNICAS MOLECULARES.

El uso de técnicas moleculares aportó información al respecto de la localización y expresión de proteínas involucradas en el procesamiento de la información sensorial. El estudio de dichas moléculas ha permitido conocer ciertos mecanismos de adaptación lumínica en la retina de mamíferos.

En base a la bibliografía y con el afán de conocer más detalladamente los mecanismos de actuación entre diferentes tipos celulares en relación con los ritmos circadianos, las proteínas a estudio fueron: Proteína Kinasa C (PKC), Melanopsina (Opn4), Tirosina Hidroxilasa (TH) y Cotransportador $\text{Na}^{2+}\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC). Estas proteínas son características y específicas de las células bipolares de bastón, células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, células amacrinas dopaminérgicas y células horizontales respectivamente. El Cotransportador NKCC también aparece en dendritas de bipolares tipo ON (Vardi et al, 2000). En el trabajo aquí expuesto se utilizaron como técnicas de estudio molecular el Marcaje inmunohistoquímico y la técnica de Western blot.

2.1- MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO.

2.1.1 Fijación, encastrado y corte.

Los animales fueron sacrificados a los diferentes tiempos: ZT00, ZT06, ZT12, ZT18 mediante sobredosis de pentobarbital (95mg/Kg), por inyección intraperitoneal. A continuación se enuclearon los ojos y fueron sumergidos en Paraformaldehido (PFA) al 4% durante una hora. Tras este tiempo se procedió a realizar la retirada de la córnea, permitiendo así la llegada del fijador a la retina. Se mantuvieron a 4°C durante 24 horas con el PFA 4% en esas condiciones.

El siguiente paso consistió en la crioprotección del tejido antes de su inclusión en un medio apropiado para su congelación. El agua que contienen los tejidos, cristaliza al congelarse, pudiendo rasgar las muestras. La crioprotección se llevaba a cabo mediante baños seriados en diferentes concentraciones de Sacarosa. Los ojos fueron



retirados del PFA y lavados por tres veces en Tampón Fosfato Salino (PBS) durante diez minutos cada vez. A continuación, los ojos fueron sumergidos en la primera concentración de Sacarosa: 15% durante 1 hora a temperatura ambiente; se retiraba esa concentración y los ojos fueron sumergidos, esta vez, en Sacarosa 20% durante otra hora, también a temperatura ambiente.

El último paso consistió en la inmersión del tejido en Sacarosa 30% durante toda la noche en agitación y a 4°C. Este protocolo de crioprotección fue variado para ciertas inmunocitoquímicas por otra serie de concentraciones de Sacarosa: 20%, 30% y 40%, con los respectivos tiempos de 1h, 1h y noche completa. Una vez realizada la crioprotección, los ojos fueron embebidos en un medio adecuado para la congelación (Tissue-Tek® O.C.T.TM, Sakura). Se mantuvieron en este medio durante una hora, en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente eran congelados rápidamente mediante nitrógeno líquido. La conservación del material biológico así encastrado se realizó a -80°C.

Se obtuvieron secciones seriadas de 14 µm de grosor usando un criostato (Leica CM1850). Las secciones se adhirieron a portaobjetos gelatinizados y fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

2.1.2. Protocolo de Inmunotinción.

Los diferentes tipos celulares observados mediante esta técnica, fueron reconocidos por el uso de anticuerpos con inmunoreactividad hacia proteínas específicas y características de dichas células (**Tabla I**). En las **Tablas II** y **III** se relacionan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de marcaje inmunocitoquímico.

<i>Marcadores Neuronales.</i>	
<i>Células Bipolares</i>	PKC α , NKCC1
<i>Células Horizontales.</i>	NKCC1, Calbindina
<i>Células Amacrinas</i>	Calbindina, TH
<i>Células Ganglionares</i>	Melanopsina, Brn3a

Tabla I- Relación de proteínas utilizadas y tipos celulares.



<i>Anticuerpos 1°</i>	<i>Tipo.</i>	<i>Donador.</i>	<i>Concentración.</i>	<i>Procedencia.</i>
Anti-PKCa	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:1000</i>	<i>SIGMA</i>
Anti-NKCC1	<i>Policlonal</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:100</i>	<i>Santa Cruz</i>
Anti-Calbindina	<i>Monoclonal</i>	<i>Ratón</i>	<i>1:1000</i>	<i>SIGMA</i>
Anti-Calbindina	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:1000</i>	<i>SIGMA</i>
Anti-TH.	<i>Monoclonal</i>	<i>Ratón</i>	<i>1:200</i>	<i>Chemicon International</i>
Anti-Melanopsina	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:100</i>	<i>ABR</i>
Anti-Melanopsina	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:100</i>	<i>Laboratorio Dr. R. Foster</i>
Anti-Brn3a	<i>Monoclonal</i>	<i>Ratón</i>	<i>1:50</i>	<i>Abcam</i>

Tabla II-Relación de anticuerpos primarios utilizados.

<i>Anticuerpos 2°</i>	<i>Marca.</i>	<i>Donador.</i>	<i>Concentración.</i>	<i>Procedencia.</i>	<i>Emisión.</i>
Anti-IgG de ratón	<i>CyTM2</i>	<i>Oveja</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>510nm</i>
Anti-IgG de ratón	<i>CyTM3</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>570nm</i>
Anti-IgG de ratón	<i>Rodamina</i>	<i>Oveja</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>570nm</i>
Anti-IgG de conejo	<i>CyTM2</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>510nm</i>
Anti-IgG de conejo	<i>CyTM3</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>570nm</i>
Anti-IgG de conejo	<i>CyTM5</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>670nm</i>
Anti-IgG de Cabra	<i>CyTM5</i>	<i>Burro</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>670nm</i>
Anti-IgG de Cabra	<i>CyTM2</i>	<i>Burro</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>510nm</i>
Anti-IgG de Cabra	<i>CyTM3</i>	<i>Burro</i>	<i>1:200</i>	<i>Jackson</i>	<i>570nm</i>

Tabla III-Relación de anticuerpos secundarios utilizados.

Para proceder a la inmunotinción se siguieron los procedimientos que se describen a continuación:

Aclimatación: Los cortes son retirados del congelador y mantenidos durante una hora a temperatura ambiente.

Lavado: Los portaobjetos con las secciones de retina se sumergen en PBS por tres veces, con el fin de retirar todos los posibles restos de OCT. Cada lavado tiene una duración de 10 minutos, en agitación.

Preincubación: Con el fin de bloquear señales inespecíficas, las secciones permanecen durante una hora en un medio constituido por Tritón X-100 (0,2%) y Suero del animal del que procede el anticuerpo 2° al 2% en PBS.

Incubación con Anticuerpo 1° (Ac1°): Las secciones, son incubadas con Tritón 0,2%, Suero 2% y el anticuerpo 1°, a la titulación elegida en PBS. La **Tabla II** muestra los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, así como la titulación empleada. Dejamos las muestras toda la noche a



temperatura ambiente. En el caso de realizar un doble o triple marcaje, se incubaron, las muestras con los dos o tres Ac1° de forma simultánea.

Lavado: Al día siguiente retiramos el exceso de Ac1° con nuevos lavados en PBS con agitación (3x10 minutos)

Incubación con Anticuerpo 2° (Ac2°): Igualmente que con el primario, los portaobjetos son tratados con un medio de Tritón 0,2%, Suero 2%, más el anticuerpo o anticuerpos 2° correspondientes disuelto en PBS durante 1h 30min. La **Tabla III** muestra los anticuerpos secundarios utilizados en el presente trabajo así como la titulación empleada y el marcaje inmunofluorescente a que dan lugar.

Lavado: Nuevamente, tres veces x 10 minutos en PBS con agitación. Mediante estos lavados retiramos el exceso de Ac2°.

Contraste: Usamos marcadores intercaladores de ADN para determinar las capas nucleares de la retina. De esta forma tenemos una referencia para la localización de los marcajes en el tejido retiniano. Con este propósito se empleó de manera más habitual la molécula 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a 1:10000, aunque también fue utilizado el yoduro de propidio (IPr) a 1:2000, con el mismo propósito. La **Tabla IV** muestra los marcadores nucleares utilizados en el presente trabajo y las concentraciones empleadas. Los portaobjetos se mantienen con estos marcadores nucleares durante 10 minutos.

<i>Compuesto</i>	<i>Absorción</i>	<i>Emisión</i>	<i>Concentración</i>	<i>Procedencia</i>
DAPI	350nm	470nm	0,01%	SIGMA
IPr	536nm	623nm	0,05%	SIGMA

Tabla IV- Intercaladores de ADN.

Lavar: con PBS en agitación. (3x10 minutos)

Montaje: Para el montaje se utilizó un medio adecuado con propiedad de protección de la fluorescencia, *Fluorsave Reagents* (Bionova, Calbiochem).



En alguno de los protocolos de marcaje inmunocitoquímico se hizo necesario añadir un paso más en el protocolo de experimentación. Algunas de las proteínas analizadas presentan el epítipo, que es reconocido por el anticuerpo, muy oculto; éste se encuentra internalizado en la estructura cuaternaria de la proteína. El empleo de técnicas de recuperación antigénica ofreció grandes avances en el análisis del cotransportador NKCC.

Una de las técnicas empleadas es el baño de todos los portaobjetos en una dilución de SDS-EDTA. Para el caso concreto de NKCC, esto no fue suficiente; por ello empleamos medios más agresivos para el tejido. Basándonos en la bibliografía (Li et al, 2008) utilizamos un lavado de los portaobjetos en SDS, sin embargo, la concentración de este detergente fue aumentada respecto a la utilizada por otros autores. Los portaobjetos eran lavados durante 10 minutos con una solución SDS 10% previamente a la preincubación con suero y tritón.

En todos los experimentos de marcaje inmunocitoquímico llevados a cabo se realizaron dos controles negativos con el fin de determinar el correcto marcaje por parte de los anticuerpos utilizados:

- Eliminación del anticuerpo primario, para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- Eliminación del anticuerpo secundario, para descartar en nuestros análisis la fluorescencia intrínseca a la muestra, por el uso del fijador PFA.

2.1.3. Obtención de imágenes y Análisis de la inmunoreactividad.

Para la obtención de las imágenes derivadas de los marcajes inmunocitoquímicos se fotografiaron las secciones teñidas en un Microscopio de Epifluorescencia BX Olympus con una cámara digital DP-71. Para la captación de imágenes de mayor calidad utilizamos el Microscopio Confocal LEICA TCS-SP5; éstas fueron las posteriormente analizadas en la medición de intensidad.

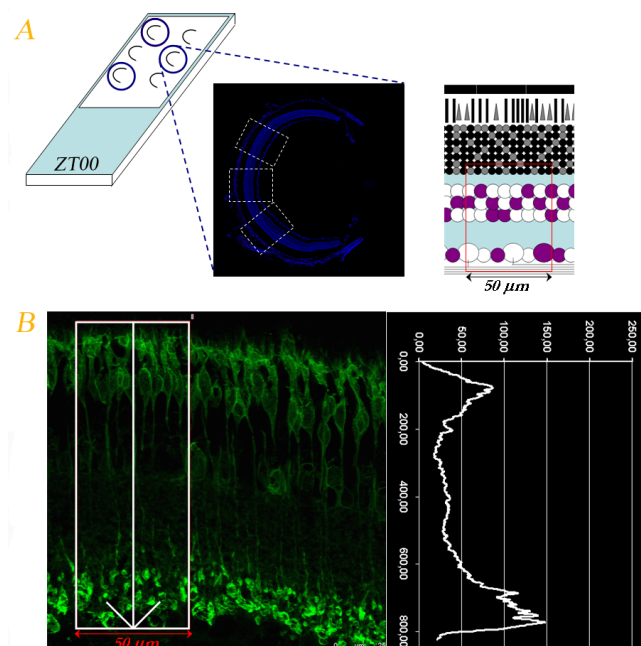
Análisis cuantitativo del grado de inmunofluorescencia

Para el estudio de la expresión de la PKC α , en sus distintos tiempos del día (ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18), en los diferentes modelos animales, se llevó a cabo un protocolo de trabajo diseñado para el análisis cuantitativo del marcaje inmunocitoquímico. Este análisis se realizó sobre las imágenes tomadas mediante el Microscopio Confocal LEICA TCS-SP5. Para el análisis cuantitativo del grado de inmunofluorescencia, se eligieron tres secciones por cada ZT y en cada una de estas secciones se realizaron tres fotos de la región media de la retina. Cada imagen fue el resultado de la proyección máxima de 11 a 14 planos; este tipo de proyección nos permite obtener un único valor para el mismo punto (píxel) dentro del total de planos.

Todas las fotos obtenidas se hicieron bajo las mismas condiciones de ganancia y reducción de la señal de fondo. Se utilizó el objetivo 40x para todas ellas y se aplicó un zoom sobre cada foto de 3x. Las nueve fotos tomadas por cada tiempo y animal fueron analizadas mediante las aplicaciones del *software* Cell[^]R, para el estudio de la intensidad de la fluorescencia. Elegimos un área de 50 μ m de longitud en cada foto. De las nueve fotos por cada ZT, ocho fueron promediadas en un valor único. La **Figura 23** muestra de forma esquemática el procesamiento de las muestras para el análisis cuantitativo del grado de inmunorreactividad (IR).

Fig23. Protocolo de análisis de la inmunorreactividad (IR):

A. Representación de un único portaobjetos con las secciones del tiempo ZT00. Elegidas tres secciones, en cada una se toman tres imágenes (foto de sección con DAPI, donde se muestran tres zonas de retina central). De cada zona, esquematizada con todas sus capas, se extrae un área de 50 μ m de anchura. B. Ejemplo de área en una foto de un ratón KO Opn4 y a su derecha la lectura de la intensidad de la IR.





2.1.4. Inmunocitoquímica en tejidos con marcaje retrógrado

Casi todas las secciones obtenidas de los ojos congelados de los ratones no habían sufrido ningún manejo anterior. En un caso se realizó un contraste de marcaje para las células ganglionares. Aquí se emplearon ratones en los cuales se inyectó una molécula fluorescente de desplazamiento retrógrado, DTMR (*Molecular probes*, D3308)

Los ratones eran anestesiados con la misma dilución de ketamina y xilacina que en los experimentos de Electrorretinografía. Colocados bajo una lupa e inmovilizados se seccionaba el nervio óptico y en el muñón resultante se colocaba un papel mojado en DTMR. Al día siguiente de la operación fue sacrificado como el resto de ratones y las retinas se trataron con el mismo protocolo que las de anteriores experimentos. A posteriori, estos portaobjetos fueron utilizados para la realización de una inmunocitoquímica, cuyo protocolo hemos descrito unas líneas más arriba.

2.2- DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA MEDIANTE WESTERN BLOT.

La técnica de Western blot (WB) nos permite separar proteínas en función de su tamaño. De este modo, podemos observar la presencia de una proteína concreta en el conjunto de una muestra, la cual almacena el total del contenido proteico relativo al tejido. Para localizar la proteína se emplean anticuerpos específicos contra ella. La aparición de bandas en el gel de poliacrilamida indica su presencia; además, el ancho de la banda en el gel determinará la cantidad de proteína que aparece en la muestra problema. Utilizamos el WB para valorar cuando se está expresando una proteína y con qué intensidad. Es por tanto un método cualitativo y semi-cuantitativo.

Con el fin de potenciar la señal obtenida por WB para cada proteína, desarrollamos un protocolo de fraccionamiento celular. Dicho protocolo nos permitió obtener, de forma separada, el conjunto de membranas y el contenido citosólico. A continuación, se describen los protocolos llevados a cabo para la obtención de los resultados moleculares/biológicos.

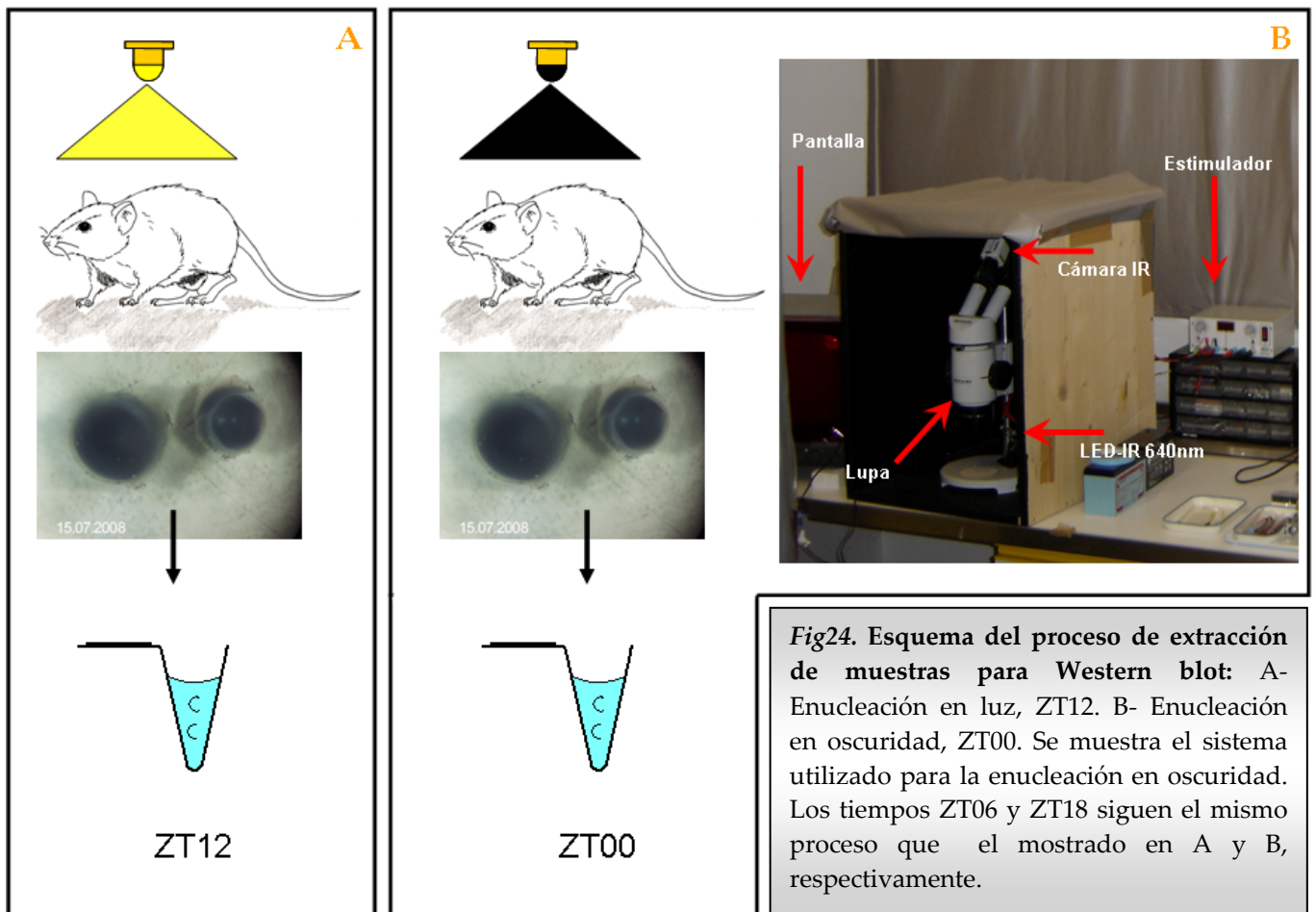


2.2.1. Obtención de las muestras.

La obtención de muestras, como paso fundamental, requirió del uso de cajas de Actividad Circadiana. Empleamos retinas obtenidas a cuatro tiempos circadianos distintos: ZT0, ZT06, ZT12 y ZT18. Para cada uno de los tiempos a estudio, obteníamos 6 retinas (dos por animal y tres ratones por tiempo). Las dos retinas de cada ratón eran recogidas y tratadas conjuntamente en el mismo eppendorf, para aumentar la concentración proteica presente en cada retina. Se utilizó una n de 3 animales por cada tiempo.

Los ratones eran sacrificados 5-10 minutos antes de llegar al tiempo concreto, así las retinas a ZT00 pertenecían a ratones sacrificados cinco minutos antes de iniciarse su fase de luz (ratones que habían pasado prácticamente 12 horas en oscuridad); este grupo de muestras se obtenían tras haberse completado su fase nocturna. Para ZT12 es el caso contrario, las retinas correspondían a ratones sacrificados al haber completado prácticamente su fase diurna, doce horas en luz. Los tiempos intermedios implican retinas las cuales se obtuvieron a las seis horas de hacerse de día (ZT06) o a las seis horas de hacerse de noche (ZT18).

Todos los sacrificios fueron realizados por dislocación cervical, buscando el mecanismo más rápido y tratando de eliminar alteraciones de factores externos, como podría ser el caso del uso de drogas. Para los ZT correspondientes a las horas de luz (ZT06, ZT12) la dislocación, enucleación y extracción de la retina se realizaban en condiciones lumínicas. Empleamos para ello una lupa de laboratorio con una fuente de iluminación de luz fría (WILD HEERBRUGG, Intralux HE, Suiza). Sin embargo, en el caso de los ZT00 y ZT18, los animales eran sacrificados y enucleados en oscuridad y para ello empleamos una luz monocromática roja (~650nm). Para la extracción de la retina se hizo necesario el uso de sistemas de trabajo sin incidencia de luz sobre el tejido. La extracción se realizó bajo un sistema de diodos de emisión infrarroja y una cámara de infrarrojos, acoplada a una lupa. La **Figura 24** muestra de forma esquemática el procedimiento de adaptación, enucleación y extracción de las muestras de retina. Una vez obtenidas las retinas por cada tiempo se almacenaban a -80°C hasta su uso.



2.2.2. Fraccionamiento celular.

1) *Tampón de Lisis.*

Las retinas congeladas eran sometidas a una disgregación por medio de un tampón hipotónico. El uso de este tampón nos permitió comenzar la separación de ambas fracciones: citosólica y de membrana sin dañar la integridad de esta última. En la **Tabla V** se detalla el contenido de dicho tampón. El volumen utilizado fue de 100 μ l por tubo eppendorf tratando de cubrir ambas retinas. Cada tubo fue mantenido con el tampón en hielo una hora.



Componente	Concentración
Hepes	20mM
KCl	10mM
MgCl	1,5mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
Na ₃ VO ₄	1mM
NaF	1mM
DTT	1mM
Inhibidor de Proteasas	1X
H ₂ O destilada	

Tabla V-Tampón Hipotónico

Empleamos los inhibidores de Fosfatasas, Na₃VO₄ y NaF, para controlar las fosforilaciones que podían ocurrir sobre las proteínas de las retinas a estudio, ya que en las proteínas analizadas, la fosforilación/desfosforilación de las mismas podría jugar un papel importante en sus mecanismos de activación. Este protocolo fue desarrollado en base al original de Doonan y colaboradores (Doonan et al, 2005).

2) Trituración Mecánica.

El contenido de los eppendorf fue agitado tras la hora con el tampón de lisis. Para asegurarnos una completa disgregación y romper las uniones intercelulares, se sometió a las retinas a una trituración más agresiva con la punta de las micropipetas; al cumplir el tiempo con el tampón de lisis la disgregación era prácticamente total. El resultado fue un *homogenado* o *extracto* donde encontramos todos los componentes celulares dispersos.

3) Centrifugaciones.

El método de centrifugación constituye el primer paso para tratar el homogenado en la mayoría de fraccionamientos, separando los componentes en base a sus tamaños.

Primera centrifugación: Todas las muestras eran centrifugadas a 3.000 revoluciones por minuto (rpm), equivalente a 1.000g, a 4°C de temperatura. Con



este procedimiento separamos los núcleos, células que no se hubiesen lisado y estructuras del citoesqueleto que quedando en el precipitado son descartadas.

Segunda centrifugación: Los sobrenadantes resultantes de la primera centrifugación se sometían a una centrifugación de velocidad media de 12.000 rpm (10.000g) a 4°C. En este caso eran las mitocondrias, lisosomas y componentes similares los que quedaban en el precipitado, siendo igualmente descartados.

Ultracentrifugación: Con esta última centrifugación conseguimos un precipitado compuesto, casi exclusivamente, por membranas. Empleamos el modelo TL-100 de ultracentrífuga (*Beckman Coulter*) y el rotor TLA-100.2, apropiado para volúmenes de hasta 2 mL. El proceso consistió en 1 hora de centrifugación a 50.000 rpm (100.000g) a 4°C.

4) Resuspensión.

Finalizadas las centrifugaciones recogimos y separamos ambas fracciones: por un lado el sobrenadante de la ultracentrifugación, siendo éste la fracción citosólica; y por otro lado el precipitado que correspondería con la fracción de membrana. Esta última fracción se resuspendió en otro tampón, RIPA (del inglés *Radio Immuno Precipitation Assay*). Este tampón tiene la función de solubilizar las membranas, permitiendo una mayor exposición de las proteínas que se encuentran asociadas a ella. El volumen de tampón suministrado por eppendorf fue de 15 µl. En la **Tabla VI** se presenta la composición del RIPA.

Componente	Concentración
<i>Tris HCl pH7,4</i>	50mM
<i>NP40</i>	1%
<i>Deoxicolato Sódico</i>	0,25%
<i>NaCl</i>	150mM
<i>EGTA</i>	1mM
<i>Na₃VO₄</i>	1mM
<i>NaF</i>	1mM
<i>Inhibidor de Proteasas</i>	1X
<i>H₂O destilada</i>	50mM
<i>Tris HCl pH7,4</i>	

Tabla VI- Composición de RIPA.



2.2.3. Cuantificación proteica.

Hasta el momento tenemos dos fracciones distintas de un homogenado inicial, resultante de la lisis de las dos retinas pertenecientes a un mismo animal. En estas fracciones, citosólica y de membrana, encontramos el total de proteínas que es característica de una u otra ubicación. Sin embargo, en los pasos seguidos hasta ahora es difícil asegurar un exacto procesamiento para cada muestra. Con tal propósito, buscamos estandarizar nuestros resultados y para ello calculamos el contenido proteico de cada muestra usando el kit comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), basado en el método de Bradford ([Bradford, 1976](#))

Elaboramos una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA, SIGMA ref.7906) a distintas concentraciones conocidas en un rango de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Realizamos la lectura de absorbancia de nuestras muestras estándar, para la recta, y muestras problema en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. Conociendo el factor de dilución y la lectura de absorbancia de las muestras problema, podemos extrapolar la concentración de proteína TOTAL a partir de la recta patrón

2.2.4. Revelado de la proteína.

En general, las proteínas poseen carga positiva o negativa; ésta es reflejo de la carga que presentan los aminoácidos que la constituyen. En esta técnica separamos las proteínas sólo por su tamaño ya que el dodecil sulfato sódico (SDS) confiere a todas ellas su carga negativa. Por tanto, la migración de las proteínas depende de su tamaño y del tamaño de poro que elijamos para el gel de poliacrilamida.

Este gel está constituido, realmente, por dos geles y cada uno de ellos desempeña una función: El primer gel es el “Estancador” (del inglés *Stacking*) donde se cargan las muestras (dilución de proteínas); para ello antes de su solidificación se acopla una estructura denominada *peine* que mantiene unos espacios libres de gel, en forma de pequeños pozos, coloquialmente “pocillos”. Este gel permitirá alinear todas las cargas para que su desplazamiento a través del segundo gel sea lo más simétrico posible. El segundo gel es el “Resolutor” (del inglés *Resolving*) y es por el que correrán las



muestras separando las proteínas por su tamaño. La proporción de los distintos elementos que configuran este último gel determinará la abertura de poro. Las **Tablas VII y VIII** muestran los componentes y concentraciones usados para la composición de los geles mencionados.

Debido a los tamaños de proteínas que nosotros nos detuvimos a analizar, el tamaño de poro elegido fue de entre un 8-10%.

<i>Stacking</i>	<i>Concentración</i>
<i>Acrilamida</i>	5%
<i>Tris HCl pH6,8</i>	125mM
<i>SDS</i>	0,1% (w/v)
<i>Persulfato Amónico</i>	0,1% (w/v)
<i>TEMED</i>	0,1% (v/v)
<i>H₂O destilada</i>	

Tabla VII- Composición gel Estancador.

<i>Resolving</i>	<i>Concentración</i>
<i>Acrilamida</i>	8-10%
<i>Tris HCl pH8,8</i>	375mM
<i>SDS</i>	0,1% (w/v)
<i>Persulfato Amónico</i>	0,1% (w/v)
<i>TEMED</i>	0,05% (v/v)
<i>H₂O destilada</i>	

Tabla VIII-Composición gel Resolutor.

Por cada experimento y siempre que fue posible, fueron cargadas las muestras de los cuatro tiempos a estudio (ZT00, ZT06, ZT12, ZT18). Para cada uno de los ZT contábamos con su fracción citosólica y su fracción de membrana. El orden de carga fue, por lo general, como se observa en la siguiente representación esquemática de los pocillos de un gel:

<i>Marcador</i>	<i>Fracciones Citosólicas</i>				<i>Fracciones de Membrana</i>			
	ZT00	ZT06	ZT12	ZT18	ZT00	ZT06	ZT12	ZT18

De esta manera pudimos comparar los resultados de ambas fracciones para cada ZT y los distintos ZT entre sí dentro de cada fracción, por cada membrana de nitrocelulosa. La carga de las muestras en sus respectivos pocillos varió en función de la fracción. Así en las muestras cargadas para la fracción citosólica siempre empleamos una concentración de proteína de 10 µg; sin embargo, para la de membrana cargamos todo el tejido. Cada volumen de carga era mezclado con el Tampón de Laemmli o Tampón de Carga 2x (Laemmli Buffer o Loading Buffer) (**Tabla IX**). Tras desnaturalizar con calor durante 5 minutos a 96°C, las muestras se disponían en los



pocillos. La intensidad de corriente para el desplazamiento de las proteínas a lo largo del gel fue de 80 voltios.

<i>Tampón de Carga 2x</i>	<i>Concentración</i>
<i>SDS</i>	4%
<i>Tris HCl pH6,8</i>	125mM
<i>Glicerol</i>	10%
<i>DTT</i>	100mM
<i>Azul de Bromofenol</i>	0,1%
<i>H₂O destilada</i>	

Tabla IX-Composición tampón de carga.

2.2.5. Transferencia.

Las proteínas separadas en función de su tamaño son posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se emplean métodos que utilizan la corriente eléctrica para adherir las proteínas a esta membrana. Previamente se monta un paquete, conocido como *sandwich*, con el gel que contiene las bandas de proteínas (gel *Resolving*), la membrana de nitrocelulosa y elementos que facilitan la conducción de la corriente. El método puede ser *húmedo* o *semi-seco*. En el primero, el *sandwich* ha de estar sumergido en un medio líquido de transferencia (Buffer de transferencia); mientras que en el segundo sólo es necesario que el *sandwich* permanezca húmedo, y es suficiente con verter una pequeña cantidad del Tampón de Transferencia sobre él. En nuestro caso empleamos la transferencia semi-seca. Mantuvimos el *sandwich* a 20 voltios durante aproximadamente una hora.

2.2.6. Incubaciones.

A continuación se bloqueó la membrana con BSA al 5% en tampón Tris salino pH 7,6 suplementado con 0,1% Tween-20 (TBS-T, del inglés *Tris-buffered saline*), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras dicho paso se incubó con el respectivo anticuerpo primario a 4°C toda la noche y en agitación suave constante.



Transcurridas al menos 14 horas con el anticuerpo primario, aclarábamos el exceso de éste con 3 lavados de 5 minutos con TBS-T (Buffer Tris Salino pH 7,6 más *tween* 0,1%). Posteriormente la membrana fue incubada con el correspondiente anticuerpo secundario (Dako) diluido 1:10.000 en BSA al 5% en TBS-T, durante 2 horas en agitación suave y a temperatura ambiente. Nuevamente procedimos a otra serie de lavados, con el mismo procedimiento que los anteriores, y añadimos un enjuague rápido de la membrana con PBS (Tampón Fosfato Salino pH 7,4). La actividad peroxidasa del enzima HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase*) conjugado al anticuerpo secundario fue detectada mediante el reactivo ECL (del inglés *Enhanced Chemiluminescence*) (PIERCE, *ref.32106*). En la **Tabla X** se detallan los anticuerpos usados para la detección de las proteínas a estudio; así como los anticuerpos secundarios empleados.

<i>Anticuerpo 1°.</i>	<i>Tipo.</i>	<i>Donador.</i>	<i>Concentración.</i>	<i>Procedencia.</i>
Anti-PKCa	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:10000</i>	<i>SIGMA</i>
Anti-NKCC1	<i>Policlonal</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:1000</i>	<i>Santa Cruz</i>
Anti-TH	<i>Monoclonal</i>	<i>Ratón</i>	<i>1:2000</i>	<i>Chemicon Intern.</i>
Anti-Melanopsina	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:2000</i>	<i>ABR company</i>
Anti-Melanopsina	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:2000</i>	<i>Foster, R.G.</i>
Anti-Hsc70	<i>Policlonal</i>	<i>Rata</i>	<i>1:3000</i>	<i>Stressgen</i>
Anti-ATPasa	<i>Policlonal</i>	<i>Ratón</i>	<i>1:500</i>	<i>ABR</i>
<i>Anticuerpo 2°.</i>	<i>Tipo.</i>	<i>Donador.</i>	<i>Concentración.</i>	<i>Procedencia.</i>
α -Conejo HRPC	<i>Policlonal</i>	<i>Cabra</i>	<i>1:10000</i>	<i>Dako</i>
α -Ratón HRPC	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:10000</i>	<i>Dako</i>
α -Cabra Fluoro	<i>Policlonal</i>	<i>Burro</i>	<i>1:10000</i>	<i>AbD SEROTEC</i>
α -Rata HRPC	<i>Policlonal</i>	<i>Conejo</i>	<i>1:10000</i>	<i>Dako</i>

Tabla X- Relación de anticuerpos en la incubación de membranas de Western blot.

2.2.7. Revelado.

El revelado fue realizado tras 5 minutos mínimo de incubación con el reactivo ECL, usando un cassette con pantalla intensificadora (BioMax MS *intensifying screen*, Kodak).

La quimioluminiscencia asociada a la carga proteica, presente en la membrana de nitrocelulosa, impresiona una película radiográfica (Curix RP2 Plus *medical X-ray film*, AGFA) que se revela mediante técnicas de revelado convencionales. La película



mostrará bandas, de intensidad variable, a la altura del marcador correspondiente al peso de la proteína en estudio.

2.2.8. Densitometría.

. Para cuantificar dicha densidad escaneamos las películas y trabajamos sobre imágenes digitalizadas. Es necesario eliminar posibles errores de carga y para ello dividimos la densidad de la banda correspondiente a la proteína de estudio, por la densidad de la banda correspondiente a una proteína control. La representación gráfica de los resultados obtenidos en los diferentes Western blot requiere del uso de controles de carga y pureza.

Como controles de carga utilizaremos, dependiendo del experimento:

- Bomba Na^{2+} - K^{+} ATPasa.
- Hsc70 (Heat shock cognate)

La **bomba Na^{2+} - K^{+} ATPasa** se encuentra ubicada en las membranas plasmáticas de las células animales. Ésta es *electrogénica*, es decir, tiende a crear un potencial eléctrico al dirigir una corriente neta a través de la membrana. Sin embargo, su función más importante es la de mantener el equilibrio osmótico y estabilizar el volumen celular (Alberst et al, 1996). La importancia de estas funciones la hace prácticamente universal en los diferentes tipos celulares. Utilizamos un anticuerpo contra la isoforma $\beta 1$ de esta bomba como control de carga y de pureza para el análisis de los diferentes Western blot. El tamaño de banda impreso en la película radiográfica es de $\sim 150\text{KDa}$.

Las **proteínas de choque térmico** (o estrés por calor, *Hsps*) constituyen una familia de proteínas altamente conservada, encontrada en todos los organismos. Estas proteínas actúan, con un reducido número, cuando colaboran en el plegamiento de otras proteínas. Actúan como chaperonas al asistir en el plegamiento, ensamblaje y tráfico intracelular de proteínas de nueva síntesis (Alberst et al, 1996; Mathews et al, 1998). *Hsps* están clasificadas en varios grupos de acuerdo con su tamaño molecular: Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40; de esta forma diferentes miembros de las familias actúan en compartimentos celulares distintos. Dentro de la familia, algunos miembros como



Hsc70 se expresan de forma constitutiva. Esta proteína, principalmente citosólica, presenta una isoforma en la matriz mitocondrial (Alberst et al, 1996); a esto hay que añadir la asociación de esta proteína a las membranas neuronales (Chen et al, 2005). La banda que encontramos en la película radiográfica, para nuestro segundo control de carga, es de un tamaño de ~72KDa.

Para conocer si nuestro fraccionamiento celular era correcto usamos controles de pureza para la fracción de membrana. La exclusividad de la bomba $\text{Na}^{2+}\text{-K}^+$ ATPasa en la membrana posibilitó un adecuado control de pureza.

El análisis de densidad fue realizado con el programa de Bio-Rad *Quantity-One*. Medidas las áreas de cada banda los cálculos posteriormente realizados fueron de dos tipos:

- medición de la cantidad de proteína en membrana.
- medición del tanto por ciento, de la proteína presente en citosol, que pasó a membrana.

Para el primer caso, el control de carga y pureza utilizado fue el mismo: bomba $\text{Na}^{2+}\text{-K}^+$ ATPasa. La presencia de Hsc70 en la fracción citosólica y de membrana convirtió, a este anticuerpo, en el mejor candidato para ser usado como control de carga en la medición del % proteína en membrana. En este segundo análisis, el control de pureza fue de nuevo la bomba $\text{Na}^{2+}\text{-K}^+$ ATPasa.

3) REGISTRO ELECTORRETINOGRÁFICO.

Los experimentos de registro de la actividad funcional de la retina se realizaron mediante un Electrorretinograma (ERG) de campo lleno (véase introducción). Nuestro equipo se ajusta a las indicaciones de la Sociedad Internacional para la Electrofisiología Clínica de la Visión (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, ISCEV) para la realización de registros electrorretinográficos.

3.1- FUENTES DE ILUMINACIÓN.

En la técnica de registro electrorretinográfico se desea evaluar la función de la retina en su conjunto. Para ello la iluminación de la misma ha de ser lo más homogénea posible (isoluminante). En la **Figura 25** se muestran las fuentes de luz utilizadas para la estimulación lumínica en los experimentos de registro electrorretinográfico:

Campana Ganzfeld: Consiste en una cúpula en la cual se encuentran insertados unos diodos emisores de luz (LED, del inglés *Light Emission Diodes*) (Kooijman y Damhof, 1980; Seiple et al, 1986) que permiten el uso de esta semiesfera como campo de estimulación. El estímulo aplicado proporciona una luz homogénea en los 120° centrales de la retina (Dieterle y Gordon, 1956). La pantalla de Ganzfeld fue diseñada en nuestro propio laboratorio y calibrada convenientemente de acuerdo a los criterios de la ISCEV. De la misma manera la intensidad lumínica relativa a los LEDs fue calibrada convenientemente.

La campana de Ganzfeld nos permitió aplicar estímulos de muy baja intensidad, lo que posibilitó el registro de las Respuestas Umbrales Escotópicas (STR) y las respuestas de bastones (véase *introducción*) cuando fue necesario.

Diodo de Emisión de Luz (LED, Light Emission Diode): Debido al pequeño tamaño del ojo de ratón, la utilización de LEDs permite una iluminación homogénea de toda la retina (Viswanathan et al., 2001). Se emplearon LEDs de la firma comercial RS-Amidata (ref. nº 310-6707), cuya intensidad era controlada mediante una

f uente de alimentación diseñada por la casa CIBERTEC S.A. Los LEDs son dispositivos electrónicos que emiten una cantidad de luz proporcional a la corriente eléctrica que circula por sus polos. La iluminación proporcionada por el LED fue medida por un fotómetro (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg, GE) y ajustada a las necesidades de cada protocolo experimental.

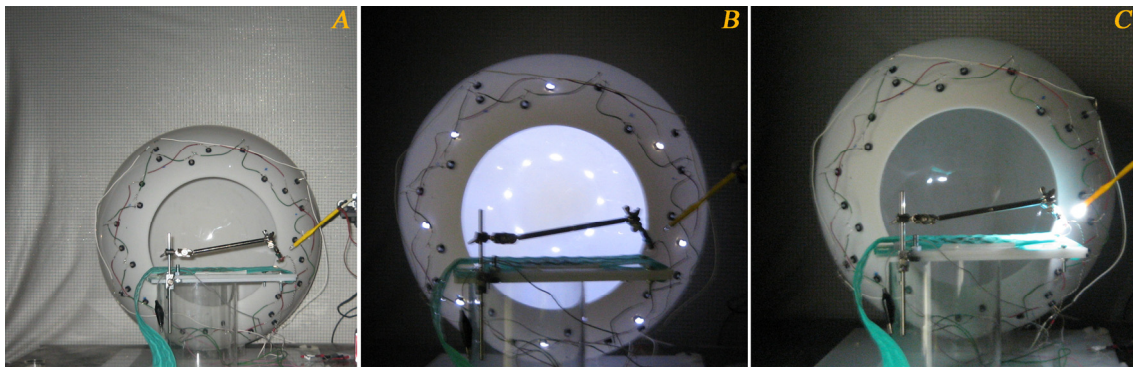


Fig25. Fuentes de Iluminación. A. Elementos del equipo de Electrorretinografía: campana de Ganzfeld (al fondo) y diodo de luz (en amarillo, delante de la campana). B. Ejemplo de la iluminación de la campana de Ganzfeld. C. Ejemplo de la iluminación del diodo de luz. El manejo de una u otra fuente nos permite, junto con el cambio de las condiciones lumínicas externas, la aplicación de los distintos protocolos de estimulación para el registro en condiciones fotópicas y escotópicas.

3.2- PREPARACIÓN DEL ANIMAL.

Anestesia: Con el fin de facilitar el registro electrorretinográfico y a su vez de reducir el sufrimiento animal, como refleja el “Real Decreto 1201_2005 de la protección de los animales utilizados en experimentación”, para la realización de los experimentos de registro electrorretinográfico aplicamos a cada ratón una inyección intraperitoneal de un cóctel de Ketamina (70mg/kg) y Xilacina (7mg/kg) diluidos en solución salina (NaCl, 0.9% en agua destilada).



Dado que la técnica es extracorpórea y prácticamente indolora para el animal, el anestésico produce una relajación muscular de grado medio-moderado. Esta concentración de anestésico es suficiente para la realización de estudios de la respuesta funcional de la retina, mediante técnicas electroretinográficas, ya que permite mantener al animal en estado de anestesia durante 40-50 minutos.

Colocación del animal: El animal anestesiado era colocado dentro de una Caja de Faraday, donde se procedía a la preparación del animal para el registro. Dentro de la caja el animal se depositaba sobre una manta calefactora (Hot-Cold, Pelton- Sherpherd Industries, CA, USA) que le mantenía a una temperatura de 37°C. El efecto de la caja de Faraday permite disminuir las radiaciones en el interior de la misma, anulando interferencias debidas a campos electromagnéticos externos.

Condiciones del animal durante el registro: Previamente al registro se aplicaba en los ojos del animal un midriático (Tropicamida al 1%, Colircusí Tropicamida, Alcon Cusí, SA, Barcelona, España) para la dilatación pupilar, lo que facilitaba la iluminación homogénea de la retina. Debido al efecto de la anestesia, era requerido un medio líquido gelatinoso para preservar la superficie corneal de la desecación. Para ello se administró tópicamente Methocel (Ciba Vision AG, 8442 Hetlingen, Switzerland) al 2%, en el ojo a registrar antes de colocar el electrodo de contacto corneal. Este medio, con capacidad conductora, optimizaba el registro eléctrico. El ojo no registrado también recibió una gota de Methocel para evitar su desecación durante la anestesia.

Colocación de los electrodos: En cada uno de los registros, se procedió a la colocación de tres electrodos. Electrodo de tierra: conectado a una aguja de 30G pinchada de forma subcutánea en la cola del animal. Electrodo de referencia: Placa de oro en forma de lengüeta, ubicada en la boca del animal. Electrodo corneal o de registro: Este electrodo, fabricado en metacrilato transparente y oro, se coloca en el eje visual y localizado a ~1 mm de la córnea (electrodo comercial Burian-Allen, Hansen Ophthalmic Development Lab, Coralville, IA). La **Figura 26** muestra de forma esquemática la colocación de los electrodos de referencia y registro.

Adecuación lumínica: Una vez colocados los electrodos, y tras la adecuación lumínica del animal, se procedía al registro de las respuestas electrofisiológicas de la retina. Para la realización de los registros en condiciones escotópicas, se dejaba reposar al animal durante ~5 minutos en absoluta oscuridad antes de comenzar los registros.

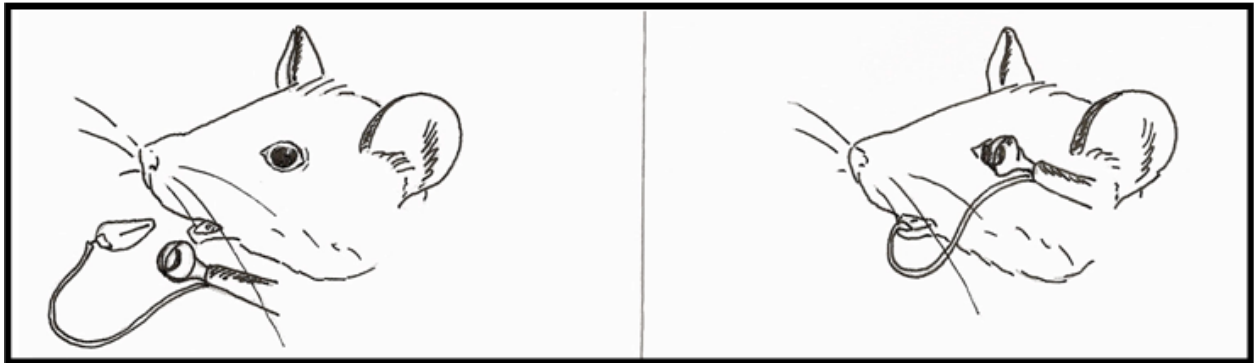


Fig26. Esquema de la disposición de los electrodos: La forma de lengüeta del electrodo de referencia facilita su colocación en la cavidad oral del animal. El electrodo corneal con forma de lente de contacto era manipulado mediante un soporte de sujeción y ubicado en contacto con la córnea.

En todos los experimentos de registro realizados en condiciones fotópicas, una vez recogido el ratón de su jaula en un ZT o CT concreto y llevada a cabo la preparación del animal siguiendo el protocolo descrito más arriba, el animal fue sometido a 5 minutos de adaptación a una luz de fondo. La intensidad de dicha luz depende del experimento y del grupo a registrar. Esta luz de fondo permite la saturación de los bastones, siendo la contribución a la respuesta electrorretinográfica únicamente de conos.

3.3- **TÉCNICA DE REGISTRO.**

Mediante la utilización del estimulador eléctrico diseñado específicamente para el control de las fuentes de iluminación (CIBERTEC S.L.) se procedía a alimentar los dispositivos luminosos, consiguiendo luminosidades entre los $-4 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ y $3 \log$

$\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Los estímulos aplicados en los distintos protocolos de trabajo estuvieron en el intervalo comprendido entre $-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ y $2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$, cuando se utilizó el Diodo (LED) como fuente de luz.

Las intensidades lumínicas aplicadas en cada caso fueron medidas con un fotómetro (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg, GE). La señal electrofisiológica registrada era después amplificada y filtrada con un amplificador comercial (CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA) y digitalizada a 10 KHz con una tarjeta de adquisición de datos de la casa comercial Power Lab (ADInstruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido). La señal era finalmente representada en la pantalla de un ordenador PC-compatible. Tanto para la representación gráfica de las señales registradas como para el control del estimulador luminoso se empleó el software comercial Scope v6.4 del Power Lab (ADInstruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido). La **Figura 27** muestra de forma esquemática el equipamiento requerido para el registro electroretinográfico y su disposición relativa.

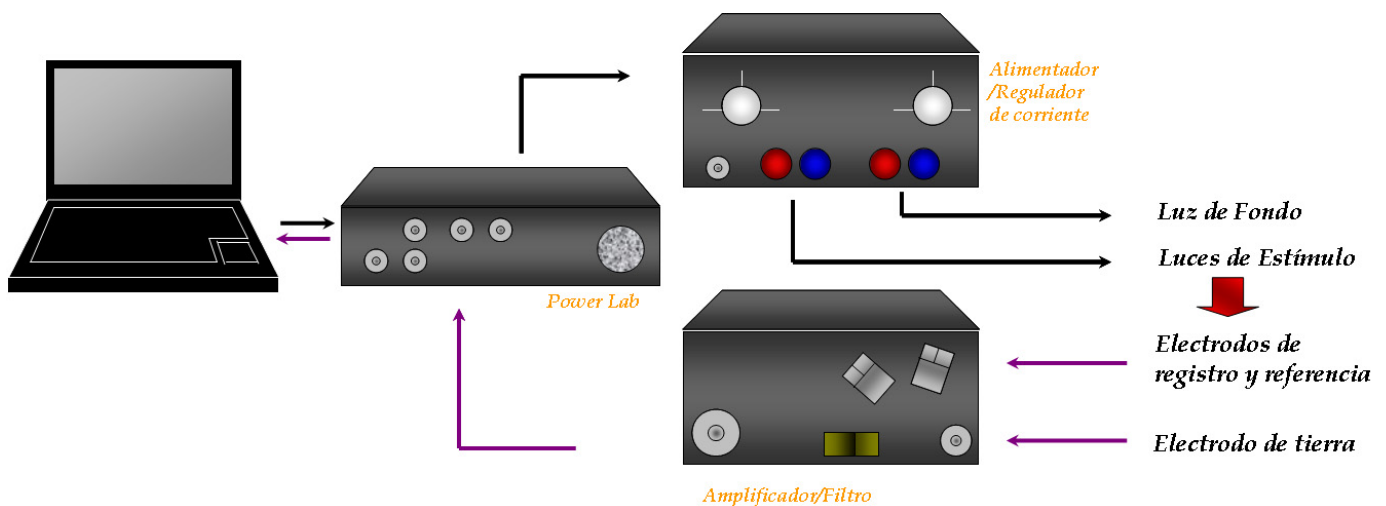


Fig27. Componentes del equipo de registro: El protocolo de estimulación, configurado en el ordenador, es emitido a la tarjeta digitalizadora (Power Lab). La señal pasa al alimentador que permite el encendido de las diferentes fuentes de luz. El estímulo es recogido por los electrodos y amplificado para volver a la tarjeta digitalizadora; ésta convierte la información para su lectura y representación digital en el ordenador.



4) ACTIVIDAD CIRCADIANA.

Como ya describimos en el apartado de animales de experimentación, la actividad circadiana hace mención al desarrollo de las distintas y diversas actividades de un organismo comprendido en el tiempo de un día. Si existe un marcador o *zeitgeber*, como la luz, esta actividad orgánica del individuo presentará un ciclo ajustado a los ritmos circadianos exógenos (alternancia luz-oscuridad)

El estudio del comportamiento de diferentes modelos de ratones ante diferentes alteraciones de los ritmos circadiano, se consiguió con el uso de jaulas equipadas con una rueda de actividad (Linton Instrumentation, Modelo EWAC-R, Inglaterra). Los distintos experimentos fueron realizados con los modelos *múridos control* y *Rd10*. Las jaulas portadoras de la rueda, eran alojadas en unas cajas de gran tamaño, aisladas de los ciclos de luz generales. En estas jaulas la iluminación procedía de fuentes de iluminación comerciales (*Super Max 2000*, B8RE12). Las horas de luz y oscuridad eran controladas por componentes electrónicos acoplados a temporizadores eléctricos (programador eléctrico de encendido y apagado y ordenador personal). El ciclo basal para los animales era de 12:12 horas luz/oscuridad. La intensidad de la luz recibida por los animales, al nivel de la jaula de actividad fue de $\sim 300 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$. Se realizaron diferentes protocolos en los que alterábamos la duración de la fase de luz u oscuridad, como *zeitgeber* principal de los comportamientos rítmicos circadianos.

Para indicar el inicio del ciclo de 24 horas utilizamos la terminología ya descrita y lo denominamos *ZT00*; en el caso del inicio de la noche, que se encuentra acompasado con el inicio de la actividad circadiana de los animales, lo denominamos *ZT12*. A partir del momento en el que realizamos el desajuste horario los intervalos de 60 minutos pasaran a denominarse *CT* (*circadian time*), ya que la actividad desarrollada por los animales no se encuentra sincronizada con el ciclo luz/oscuridad. A lo largo de cada uno de los experimentos que comprenden esta parte de la Tesis doctoral, los animales buscarán resincronizar su ritmo al del ciclo diurno, a partir de ese momento los intervalos de 60 minutos volverán a denominarse por las siglas *ZT* (*zeitgeber time*).



En la **Figura 28** se explican cada uno de los escenarios desplegados para la realización de esta parte del trabajo doctoral, enfrentando las horas del ciclo 12:12h (eje de abscisas) con los días (eje de ordenadas, se expone el día cero como un día normal y el día uno en el que se realiza el desfase horario).

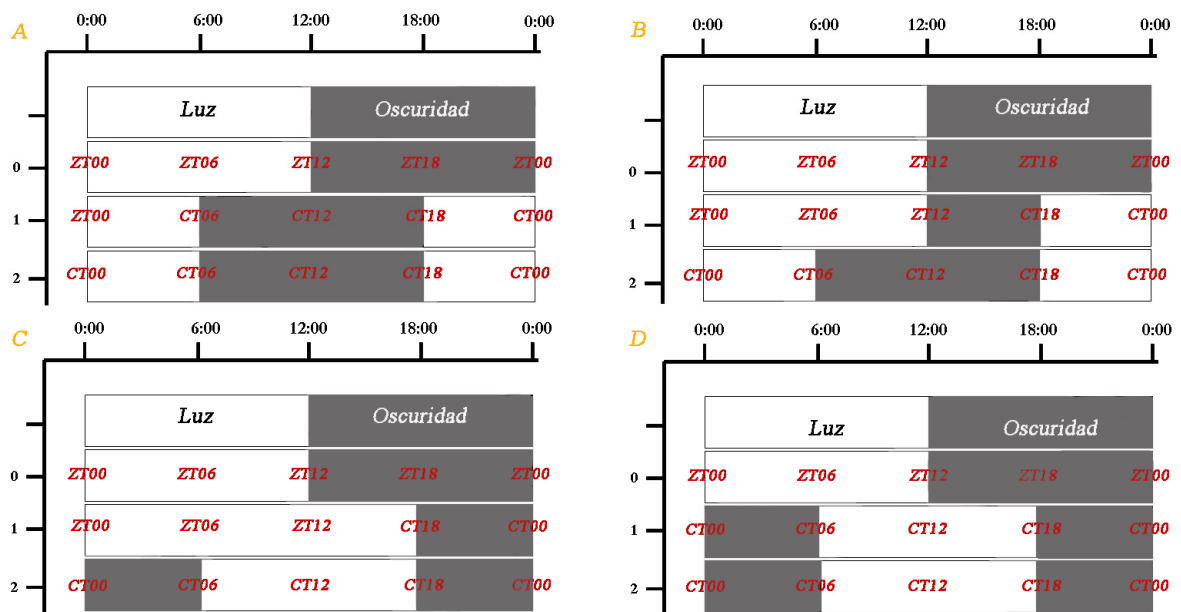


Fig28. Representación de los escenarios de los cambios de fase del ciclo luz/oscuridad: Tras un ciclo 12:12h de luz/oscuridad comienza un nuevo ciclo (día cero) cuyos intervalos de tiempo los denominamos ZT. En el día uno de cada escenario se produce el desfase horario, siendo a partir de ese momento cuando se emplean las siglas CT. Posteriormente al acortamiento (de 12 a 6 horas) o alargamiento (de 12 a 18 horas) de una fase, los ciclos siguientes presentan una duración de las fases luz/oscuridad de 12:12 horas respectivamente. A- Acortamiento de la fase de luz. B- Acortamiento de la fase de oscuridad. C- Alargamiento de la fase de luz. D- Alargamiento de la fase de oscuridad. Se representan las horas en el eje de abscisas (X) y los días en el eje de ordenadas (Y).

Protocolos de actuación:

-*Acortamiento fase de luz.* Tras un periodo de alternancia de luz/oscuridad normal (12:12), procedíamos a la reducción de la fase de luz en 6 horas. Sin embargo, la fase de oscuridad (noche) contigua mantenía la duración normal (12 horas). El registro de la actividad era mantenido una semana, tras el desajuste. Este tiempo era necesario



para poder analizar el proceso de resincronización que comenzaba posteriormente al desajuste al que había sido sometido el animal. La alternancia de luz/oscuridad para el resto de los días registrados era de 12:12 horas (Ver A en la **Figura 28**).

-*Alargamiento fase de luz*. Es el caso contrario. Aquí el proceso es el de ampliar en seis horas la fase de luz del ciclo luz/oscuridad. De la misma manera, las fases siguientes presentaban su duración normal. El experimento era mantenido, de nuevo, una semana tras la alteración del *zeitgeber* (Ver C en la **Figura 28**).

- *Acortamiento de la fase de oscuridad*, en el que reducíamos de 12 a 6 las horas correspondientes a la fase de oscuridad (Ver B en la **Figura 28**).

-*Alargamiento fase de oscuridad*. Al igual que en el protocolo para el alargamiento de fase de luz, se procedía a un aumento de la fase de oscuridad de 12 a 18 horas (Ver D en la **Figura 28**).

Durante la realización de los experimentos de actividad circadiana, cada jaula albergaba un único animal, con agua y comida *ab libitum*. La actividad de los ratones fue analizada mediante el recuento automatizado del número de vueltas dado por la rueda de actividad presente en cada una de las jaulas. Los animales hacen girar la rueda en sus horas de mayor actividad. Cada vuelta que da la rueda es registrada mediante un sensor electromagnético, que transfiere una señal a una tarjeta digitalizadora (CED+, 1401). Los recuentos acumulativos del número de vueltas son analizados de forma continua mediante un software informático (Spike 2 4.06) y representados en la pantalla de un ordenador (PC compatible) en forma de histograma de barras. Cada columna del histograma representa el número de vueltas dado por el animal en un periodo de 10 minutos. Estas barras que definen la actividad motora del ratón se representan de forma consecutiva unas a otras. Esta forma de representación permite obtener un registro de la actividad motora del animal durante las 24 horas continuas que configuran un día.

La representación mostrada en la **Figura 29** esquematiza el registro de la actividad del animal durante la noche (12 horas) y como en el periodo de luz (12 horas)

apenas existe movimiento por parte del ratón. Esto sucede tanto en animales sanos como en ciegos, si la luz es suficientemente intensa.

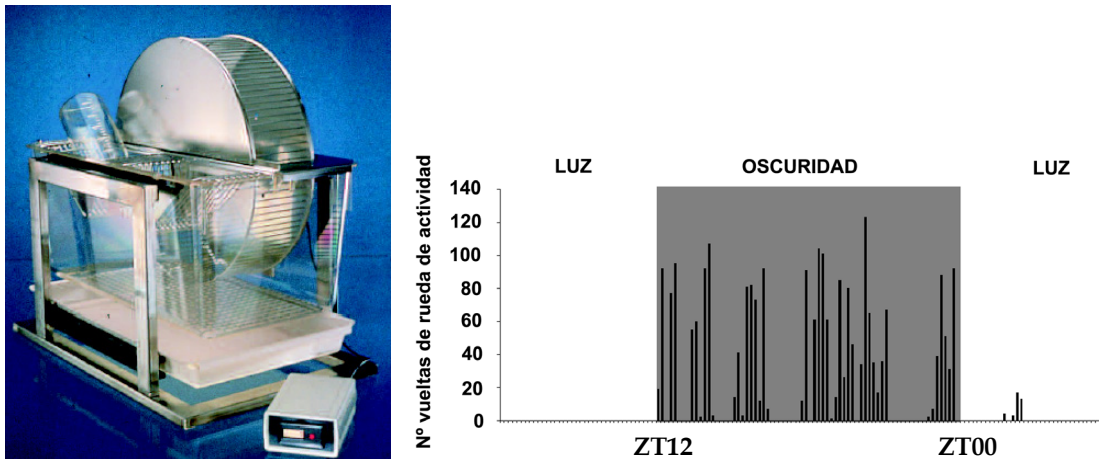


Fig29. Jaulas de actividad y representación de un Actograma: La imagen de la izquierda nos muestra el acondicionamiento de las jaulas para la medición de la actividad circadiana. Los datos obtenidos por la actividad del animal se codifican para la obtención de la gráfica expuesta a la derecha. En dicha gráfica, se enfrenta el nº de vueltas que es capaz de dar el animal en un ciclo de 24h. El eje de abscisas se encuentra dividido en fracciones de 10 minutos hasta completar las 24 horas del ciclo. Los ratones son animales nocturnos que restringen su actividad a las horas de oscuridad.

Antes de iniciar los experimentos, los animales se mantenían en las jaulas durante 7 días para su adecuación a las nuevas condiciones. Ese tiempo era suficiente para que ajustasen su actividad. Cuando el 90% de su actividad motora se veía acotada a las horas de oscuridad se comenzaba con el primer protocolo experimental. La representación gráfica consistía en *Actogramas* que muestran una lectura del movimiento del animal en 24 horas. Dado que el registro total era de varios días se realizaba un solapamiento de estas representaciones de un día con el siguiente. El resultado obtenido es un actograma que comprende el total del experimento.



En la **Figura 30** se representan los registros de dos de los protocolos desarrollados: *Alargamiento de la fase de luz* y *Acortamiento de la fase de oscuridad*. La actividad motora del animal en cada ciclo de 24 horas se muestra junto al resto de días registrados hasta la “resincronización” de la actividad con el ciclo luz/oscuridad.

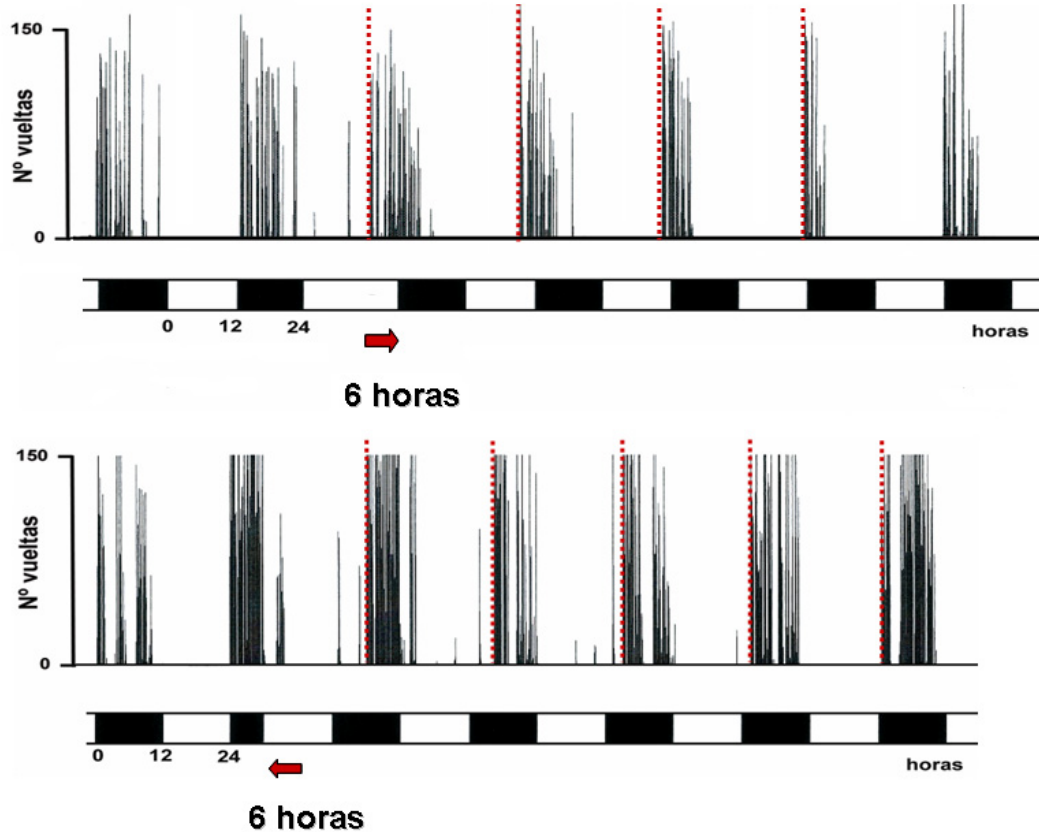


Fig30. Actogramas de la actividad registrados durante dos protocolos diferentes: El registro representado más arriba es un ejemplo de los protocolos de *Alargamiento de fase*, en este caso, alargamiento de la fase de luz. La actividad del animal, acotada a las horas de oscuridad, se desfasa con respecto al ciclo de 24 horas. A lo largo de los días ese desfase se reduce hasta la completa sincronización de la actividad del animal con el ciclo luz/oscuridad. El segundo registro representa un protocolo de *Acortamiento de fase*, el ejemplo muestra el acortamiento en la fase de oscuridad. Para ambos casos los desfases producidos son de seis horas con respecto al ciclo 24h.

En nuestros estudios de la actividad circadiana analizamos el desajuste ocasionado a la sincronía del animal con el ambiente ante los distintos protocolos y su capacidad de recuperación en cada uno de ellos. Para ello, se realiza el cálculo del



número de horas de desfase entre el comienzo de la fase de oscuridad (momento de mayor actividad de los ratones) y el comienzo de las barras verticales que representan su actividad motora. Los datos se representaron en una gráfica enfrentando las horas de desfase contra los días acaecidos hasta su correcta regulación.

Para los dos ejemplos anteriores realizamos la representación que se muestra en la **Figura 31**. Esta nueva forma de exponer los registros facilita el cálculo de las horas de desfase entre el comienzo de la actividad circadiana y el ciclo luz/oscuridad. También muestra, de forma más clara, el tiempo necesario para la recuperación de la sincronía del animal con el ciclo de 24h. Esta figura enfrenta horas de desfase a días de “resincronización”; cada fila de rectángulos representa un día. Como ya hemos comentado, el día cero muestra un día sincronizado (ver figura 28) y el día uno el momento en que se aplica el desfase. En la columna izquierda de la *Figura 31* se observa como, al alargar la fase de luz, la actividad del animal se modifica; comienza con antelación y progresivamente se va reajustando. Lo mismo para un caso de acortamiento de fase (oscuridad) representado en la columna derecha. En este escenario el desfase en la actividad se observa al día siguiente, cuando el movimiento del animal no coincide con el comienzo de la noche actual (CT06) sino con la que hubiese sido de haberse mantenido el ciclo 12:12horas.

Por debajo de la representación esquemática de los registros, se disponen las diferentes gráficas para cada escenario. Éstas muestran el recuento de las horas de desfase con respecto a los días que tarda el animal hasta hallarse completamente sincronizado. Se representa con círculos blancos los resultados del animal sometido al *Alargamiento de fase*; en el caso del *Acortamiento de fase* la gráfica se representa mediante círculos negros.

La pendiente resultante de la gráfica determinará la velocidad, en días, que emplean los ratones para recuperar su sincronía con el medio externo. La comparación entre grupos se basó en el análisis de la constante de tiempo *tau* (τ).

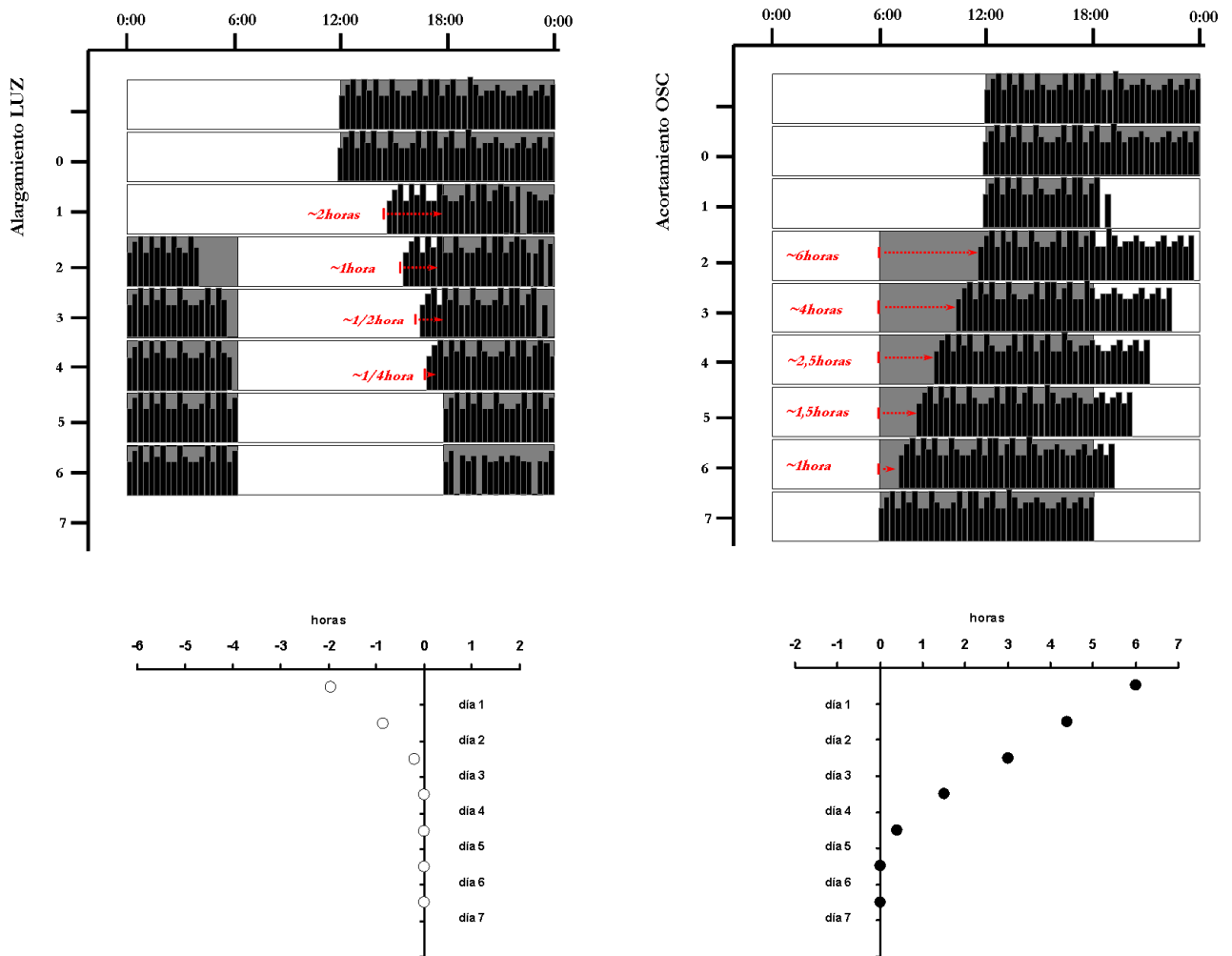


Fig31. Representación del análisis de la actividad circadiana: La actividad desarrollada por el animal en ambos escenarios se encuentra acotada a las horas de oscuridad en condiciones normales (de ZT12 a ZT00). En la columna izquierda se muestra la representación esquemática de un alargamiento de luz. En rojo las horas de desfase por cada día. La gráfica inferior representa esas horas de desfase frente a los días necesarios hasta su completo reajuste (círculos blancos). En la columna de la derecha el mismo esquema, pero para el protocolo de acortamiento de oscuridad. Las horas de desfase se enfrentan a los días obteniéndose la gráfica inferior, mostradas con círculos negros. La actividad de los animales se ha esquematizado con barras verticales en color negro.



RESULTADOS



En la presente Tesis doctoral se han desarrollado tres bloques de experimentos con el fin de resolver los objetivos propuestos. Este enunciado engloba, por tanto, tres capítulos que documentan un aspecto estructural, funcional y conductual, respectivamente, de las reacciones fisiológicas de la retina y del individuo en diferentes momentos del ciclo luz/oscuridad.





CAPÍTULO 1: Estudio Molecular.

1.1- MELANOPSINA.

Con el propósito de estudiar los mecanismos de adaptación lumínica en la retina, en su paso de una visión escotópica a una visión fotópica iniciamos una serie de experimentos de naturaleza molecular, intentando conocer hasta qué punto las células ganglionares fotosensibles pudieran estar involucradas en dichos mecanismos. Con tal propósito procedimos a estudiar por técnica de marcaje inmunocitoquímico las células de la retina que expresan la Melanopsina. Estos experimentos, fueron llevados a cabo en ratones control sanos y ratones Rd10 que, como ha sido descrito y como se muestra en el capítulo 3 de los resultados, mantienen sus ritmos circadianos sincronizados con el fotoperiodo a pesar de carecer de fotorreceptores clásicos (conos y bastones).

Las células positivas a melanopsina corresponden únicamente al 1-3% de células presentes en la capa de las células ganglionares de la retina (CG). Además, en ocasiones se observan células melanopsínicas a nivel de la capa nuclear interna (CNI), en su porción más vitreal.

En primer lugar se realizó una técnica de doble marcaje inmunohistoquímico, con un anticuerpo anti-Melanopsina y un marcador específico de células ganglionares, el factor de transcripción Brn3a. La colocalización de ambos anticuerpos en células de la CG confirma la expresión de Melanopsina por células ganglionares de la retina. Asimismo, en el caso de las células con el soma ubicado a nivel de la CNI también se observó la colocalización de Melanopsina con el marcador de Brn3a. Los resultados apuntan a una naturaleza ganglionar de todas las células melanopsínicas desplazadas que fueron analizadas.

De forma llamativa, las células portadoras de melanopsina no siempre presentaron esa colocalización. En este experimento también fue observado un número significativo de células cuyo soma, en la CG, no presentaba señal inmunorreactiva para el anticuerpo contra Brn3a. La *lámina 2* muestra células positivas a Melanopsina y



Brn3a en retina de animales control (sano) y ratón Rd10, de la misma manera se presentan ejemplos de *no colocalización* para ambos modelos animales.

Se realizó una segunda serie de experimentos para contrastar los resultados previamente descritos. En éstos se procedió también a marcar por técnica inmunocitoquímica secciones de retina correspondientes a animales cuyas células ganglionares habían sido previamente marcadas retrógradamente con rodamina (dextra-tetra-metil rodamina, DTMR, ver *Materiales y Métodos*). Igual que en el caso anterior encontramos células marcadas con melanopsina en somas de células portadoras de melanopsina, e igual que en el caso anterior aparecen cierto número de células que no presentan dicha confluencia de la señal positiva a melanopsina con el DTMR. En la **Figura 32** se muestra la confluencia de marcaje, donde el marcador retrógrado DTMR colocaliza con la Melanopsina. En la *lámina 3* presentamos un ejemplo de no coincidencia de la señal de melanopsina y DTMR en el soma de una célula localizada a nivel de la CG en un ratón control.

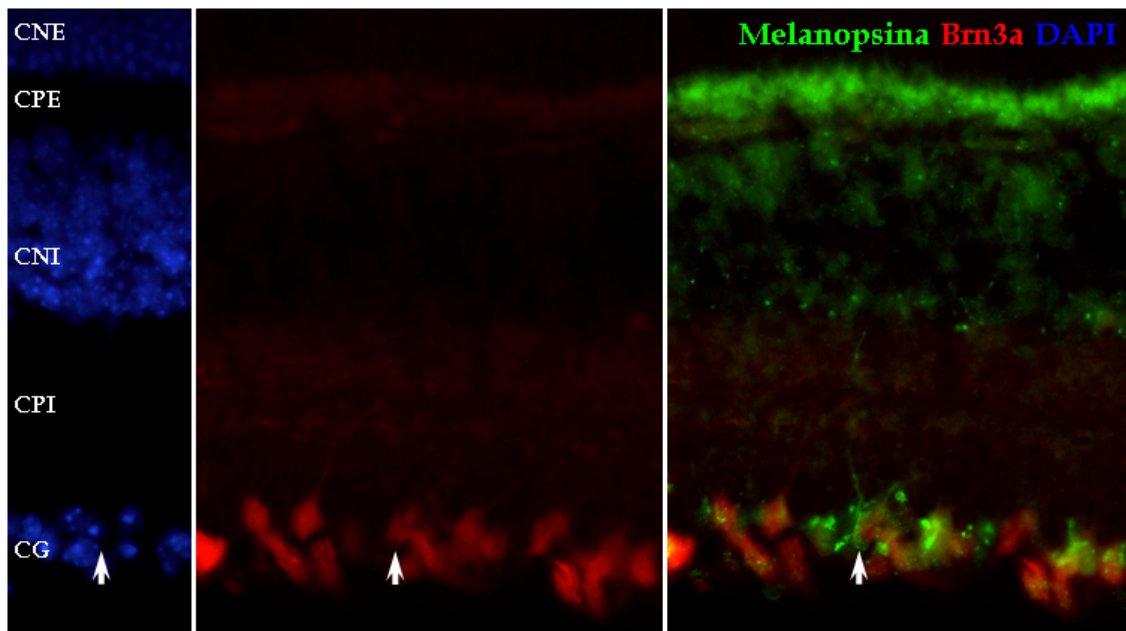


Fig32. Colocalización de melanopsina y DTMR a nivel de la Capa Ganglionar en un ratón control. De izquierda a derecha, núcleos teñidos con DAPI señalando las capas de la retina. Imagen de células ganglionares marcadas retrógradamente con DTMR. Confluencia en la CG de una célula ganglionar portadora de Melanopsina y DTMR. La flecha blanca indica la posición de la célula positiva para el fotorpigmento melanopsina y como la presencia de DTMR en su soma confirma dicha célula como ganglionar. Imágenes captadas por el Microscopio de Epifluorescencia.



El marcaje inmunocitoquímico nos ha permitido observar los mismos tipos de células melanopsínicas en retinas de ratones control y ratones Rd10. En todos los casos, se observó el marcaje de los somas a nivel de la CG y, en menor medida, a nivel de la CNI. Los procesos dendríticos emitidos por las células marcadas permitió la diferenciación de los distintos subtipos de ipRGC. Las células marcadas con el anticuerpo anti-Melanopsina, cuyos somas aparecen en la CNI, presentaron también una variedad en la distribución de sus procesos. La *lámina 4* muestra los diferentes tipos de ipRGCs, clasificados en base a la proyección de sus dendritas, así como a la ubicación de sus somas.

En algunos de los experimentos realizados pudimos observar que los procesos de las células melanopsínicas parecían extenderse también hasta la CPE, donde pudieran establecer conexiones con células allí presentes (*Lámina 5*). Asimismo y como ya ha sido comentado en la introducción, se ha postulado que las células ganglionares que expresan Melanopsina pudieran establecer conexiones sinápticas directas con otros subtipos celulares de la retina como son las células bipolares o las células amacrinas dopaminérgicas. En este sentido, realizamos una serie de experimentos de doble tinción inmunocitoquímica en la que se marcaron las células ganglionares que expresan Melanopsina y células amacrinas dopaminérgicas y/o células bipolares. La señal emitida por los diferentes fluorocromos de cada doble marcaje presentó puntos de confluencia de ambas señales. Las *láminas 5 y 6* muestra los dobles marcajes comentados más arriba, donde se señalan los posibles puntos de conexión sináptica entre células melanopsínicas y células de la capa plexiforme externa, así como con células dopaminérgicas o células bipolares de bastón.

Estos resultados señalan la posible influencia de las ipRGC en la modulación de las respuestas funcionales de la retina, en su papel de regular mecanismos de adaptación a la luz y oscuridad.

Los datos mostrados hasta el momento confirman algunos de los resultados de la bibliografía y permiten postular a su vez que las células ganglionares fotosensibles, además de regular la ritmicidad circadiana en el núcleo supraquiasmático pudieran estar ejerciendo una acción moduladora a nivel de la propia retina. Con el fin de demostrar



este segundo aspecto funcional de las células ganglionares fotosensibles, se llevó a cabo una serie de experimentos. En ellos se estudió, desde un punto de vista molecular, la capacidad de las células ganglionares fotosensibles para regular la expresión y activación de ciertas proteínas retinianas, escogidas por su posible papel funcional en los mecanismos de adaptación lumínica (véase *Introducción*).

Las tres moléculas estudiadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral son:

- Proteína Kinasa C-alfa ($PKC\alpha$), localizada en células bipolares de bastón.
- Cotransportador de Cloro (NKCC1), localizado en células horizontales.
- Tirosina Hidroxilasa (TH), localizada en células amacrinas dopaminérgicas.

Los estudios realizados sobre estas tres proteínas persiguen analizar si su expresión y/o activación obedece a un comportamiento circadiano o tan solo al estado de activación lumínica de la retina. Para ello, se han utilizado tres modelos animales, los ratones control (*wt*), ratones distróficos Rd10 y ratones *Opn4* KO (véase *Material y Métodos*). Para el análisis de la expresión temporal de cada una de las proteínas a estudio se emplearon cuatro tiempos representativos: ZT00, ZT06, ZT12, ZT18. Los datos obtenidos corresponden a los momentos de inicio de fase de luz (ZT00), mitad del día (ZT06), inicio fase oscuridad (ZT12) y mitad de la noche (ZT18).

Los experimentos de carácter molecular han sido realizados por técnicas de marcaje inmunocitoquímico y Western blot. El uso de una o ambas de estas técnicas nos ha permitido observar la expresión y posible activación proteica en las distintas condiciones experimentales.

1.2- PROTEÍNA KINASA C α ($PKC\alpha$).

Se ha descrito la existencia de una regulación dependiente de luz para la Proteína Kinasa C α ($PKC\alpha$) y la persistencia de este ritmo en condiciones de tiempos prolongados de oscuridad ([Gabriel et al, 2001](#)). La $PKC\alpha$, presente en células bipolares de bastón y ciertas células amacrinas (véase *Introducción*), podría interactuar con las células ganglionares portadoras de melanopsina ([Belenkey et al, 2003](#); [Dacey et al,](#)



2005; Pérez-León et al, 2006; Østergaard et al, 2007; Vugler et al, 2007b; Viney et al, 2007; Wong et al, 2007; Zhang et al, 2008).

La proteína kinasa dependiente de calcio y fosfolípidos es una enzima ubicua que se expresa en diversos tejidos animales. Las múltiples formas de PKC aisladas en cerebro de rata, denominadas PKC I-II-III (Huang, 1989), corresponden a las formas γ , β y α respectivamente. La célula bipolar de bastón, en la retina de ratón, expresa característicamente la isoforma PKC α .

Como ya vimos, existen diferencias en la localización de las isoformas y esta guarda relación con su actividad. La PKC puede encontrarse en la membrana, el citoplasma o en ambos lugares; el estado inactivo de la proteína se encuentra normalmente en el citosol. Sin embargo, su activación, por aumento de los niveles de Diacil Glicerol (DAG) y/o Ca^{2+} está asociada con la transferencia de la enzima a la membrana, donde se une a lípidos reguladores (Wolf et al, 1985). Este proceso es conocido científicamente como **translocación** de la proteína.

A su vez, las células bipolares expresan canales de calcio de tipo L (canales dependientes de voltaje y de alto umbral). Las células bipolares de bastón concentran este canal en sus terminales axónicos. La despolarización de la célula bipolar determina la apertura de los canales de Ca^{2+} (Protti y Llano, 1998; Nachman-Clewner et al, 1999; Baumann et al, 2004; Xiao et al, 2007). La entrada de Ca^{2+} a su vez, induce la activación de la PKC α (Gabriel et al, 2001). Asimismo, los ésteres de forbol, análogos funcionalmente a DAG, influyen en el **transporte** de PKC hacia la terminal axónica (Osborne et al, 1991).

Como ya se comentó en la introducción, la presencia de PKC en la membrana plasmática permite mantener el estado activo de la enzima. La asociación a la membrana tiene como consecuencia la proteólisis o escisión de PKC dando lugar a la subunidad catalítica libre PKM, independiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La movilización de Ca^{2+} también proporciona un elemento clave para esta proteólisis, como es la activación y translocación a membrana de las calpaínas responsables de la escisión (Inoue et al, 1977; Shea et al, 1994; Liu et al, 2007).



En los tres modelos animales empleados, la PKC α se expresa en los mismos tipos celulares. Sin embargo, existen diferencias morfológicas entre el grupo de ratones control (C57BL6J) y el grupo de animales que presenta degeneración retiniana (Rd10). La pérdida de fotorreceptores conlleva una reestructuración del resto de la retina; en concreto, las células bipolares sufren una retracción de su árbol dendrítico (Strettoi et al, 2000; 2003). La **Figura 33** muestra el aspecto de las células bipolares de bastón, marcadas inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-PKC α en un animal control y en un ratón distrófico.

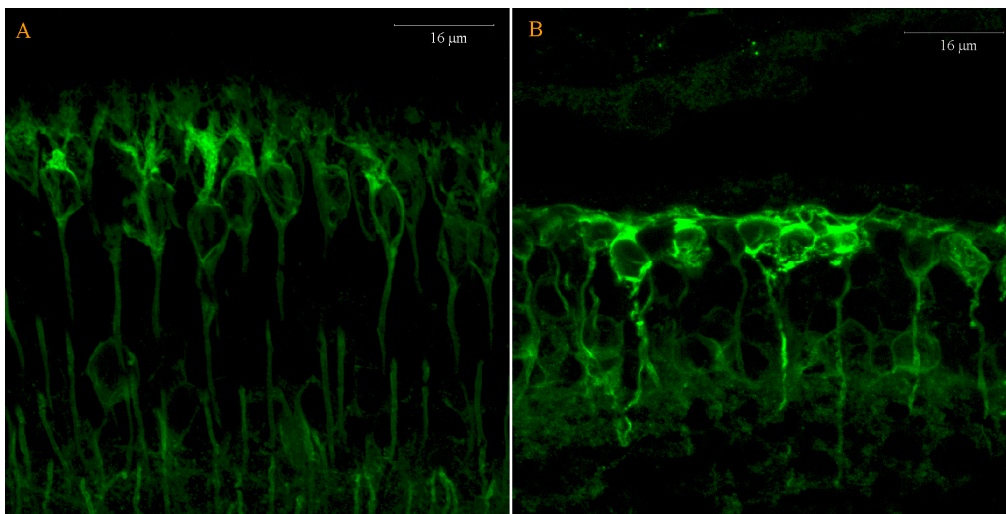


Fig33. Marcaje inmunocitoquímico de células bipolares de bastón. A- Imagen del marcaje inmunocitoquímico con anticuerpo anti-PKC α en retina de ratón control. B- Imagen de las células bipolares marcadas con anticuerpo anti-PKC α en retina de ratón distrófico Rd10. Se aprecia en este último modelo la pérdida de las prolongaciones dendríticas

1.2.1. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón control.

Con objeto de estudiar la expresión y función de PKC α en células bipolares de bastón en ratones control (sanos), se procedió a cuantificar la intensidad de la inmunorreactividad para PKC α en somas y terminales axónicas de dichas células. El análisis se llevó a cabo en distintos tiempos de actividad circadiana (ZT).



En la *lámina 7* se muestran las medidas de intensidad de la inmunofluorescencia para PKC α a ZT00, ZT06, ZT12, ZT18. Se realizaron ocho medidas distintas para cada tiempo (trazados a color). De forma superpuesta se representa, en blanco, la media calculada a partir de las ocho áreas analizadas por tiempo. Cada perfil presenta dos crestas claramente diferenciables que corresponden a la señal recogida del soma y de la terminal axónica de las células bipolares de bastón.

Con el fin de analizar cuantitativamente las diferencias de marcaje, se escogió un punto de máxima intensidad para cada cresta, dentro de cada tiempo. Los valores a los distintos tiempos permiten observar una periodicidad en la expresión y/o síntesis de PKC α (**Figura 34**). No obstante, esta ritmicidad en la variación de intensidad no difiere entre soma y terminal axónica para cada ZT.

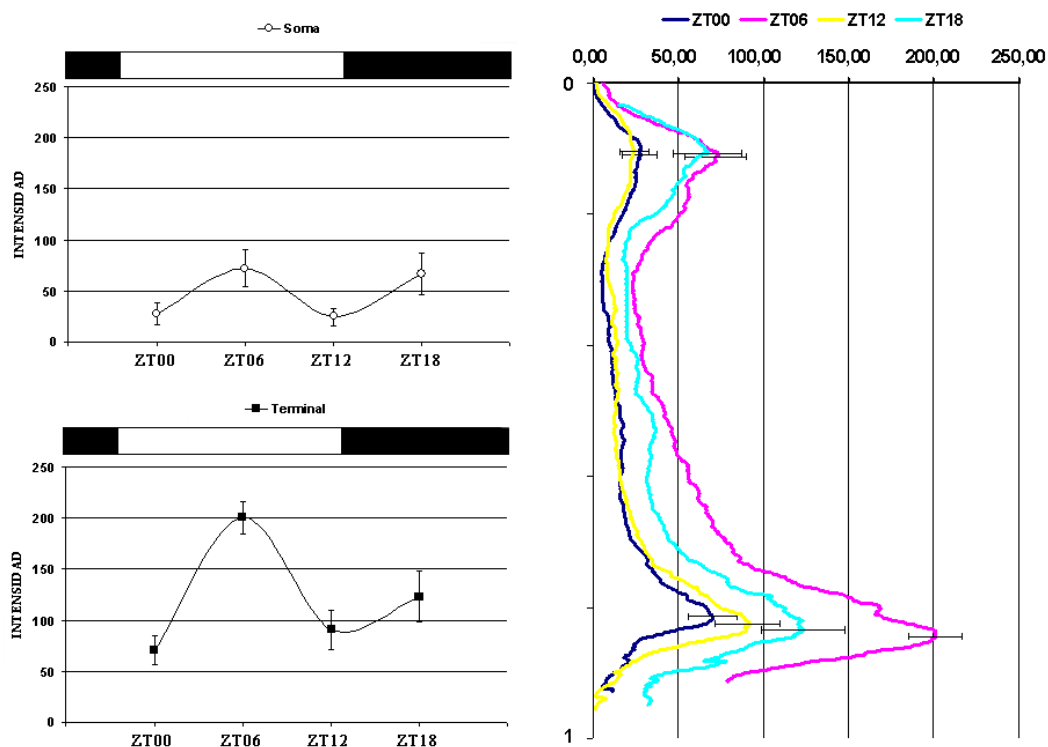


Fig34. Representación gráfica de la inmunorreactividad en soma y terminal axónica de PKC α en animales control. A la derecha de la figura se muestran las gráficas de la cuantificación de la inmunorreactividad de PKC α a los distintos ZT, en soma y terminal. A la derecha, medias de las mediciones realizadas para cada tiempo. Se representa junto a la Desviación Estándar (DE) un valor máximo en soma y otro en terminal axónica. La ritmicidad de la expresión de PKC α es patente tanto en soma como en terminal.



El análisis estadístico de los resultados permite observar que:

- Las diferencias estadísticas del marcaje en los somas de las células bipolares fueron *extremadamente significativas* al comparar ZT00 vs ZT06, ZT00 vs ZT18, ZT12 vs ZT06, ZT12 vs ZT18; sin embargo, no mostraron diferencias significativas los enfrentamientos ZT06 vs ZT18 y ZT00 vs ZT12 (resultados para el test de *Comparaciones Múltiples de Tukey-Kramer* y para un análisis con el test *t de Student con corrección de Welch*). Realizado el *ANOVA una vía* el resultado fue extremadamente significativo ($p < 0,0001$).

Grupos	Tukey-Kramer /t de Student	p
ZT00vsZT06	Extremadamente significativo	<0,001
ZT00vsZT12	No significativo	>0,05
ZT00vsZT18	Extremadamente significativo	<0,001
ZT06vsZT12	Extremadamente significativo	<0,001
ZT06vsZT18	No significativo	>0,05
ZT12vsZT18	Extremadamente significativo	<0,01

Tabla XI. Resumen de la relación estadística de los grupos a nivel del soma.

- En la cuantificación de la intensidad en la terminal axónica también encontramos un máximo en ZT06. De la misma manera, el segundo valor máximo de intensidad corresponde a ZT18. Al realizar la estadística las relaciones y diferencias entre grupos se dispusieron como sigue:

Grupos	Tukey-Kramer /t de Student	p
ZT00vsZT06	Extremadamente significativo	<0,001
ZT00vsZT12	No significativo	>0,05
ZT00vsZT18	Extremadamente significativo	<0,001
ZT06vsZT12	Extremadamente significativo	<0,001
ZT06vsZT18	Extremadamente significativo	<0,001
ZT12vsZT18	Muy significativo	<0,01

Tabla XII. Resumen de la relación estadística de los grupos a nivel de la terminal.



El patrón de expresión rítmica o cíclica parece ser el mismo para los dos extremos de la célula. El momento del ciclo luz/oscuridad donde esa expresión es máxima corresponde al ZT06 tanto en soma como en terminal axónico.

La intensidad de la inmunofluorescencia puede ser analizada con el fin de conocer las diferencias en el *transporte* de la proteína desde el soma a los pies de la célula en cada tiempo (**Figura 35**). En los ratones control se observa un marcaje de PKC α que es siempre algo superior en la terminal axónica con respecto al soma. Para todos los grupos, las diferencias estadísticas entre la intensidad del soma frente a la intensidad de la terminal son *extremadamente significativas* ($p < 0,001$ mediante *t de Student, Welch*). Aunque con el mismo resultado estadístico que en el resto de grupos, ZT06 presenta la mayor diferencia entre los extremos.

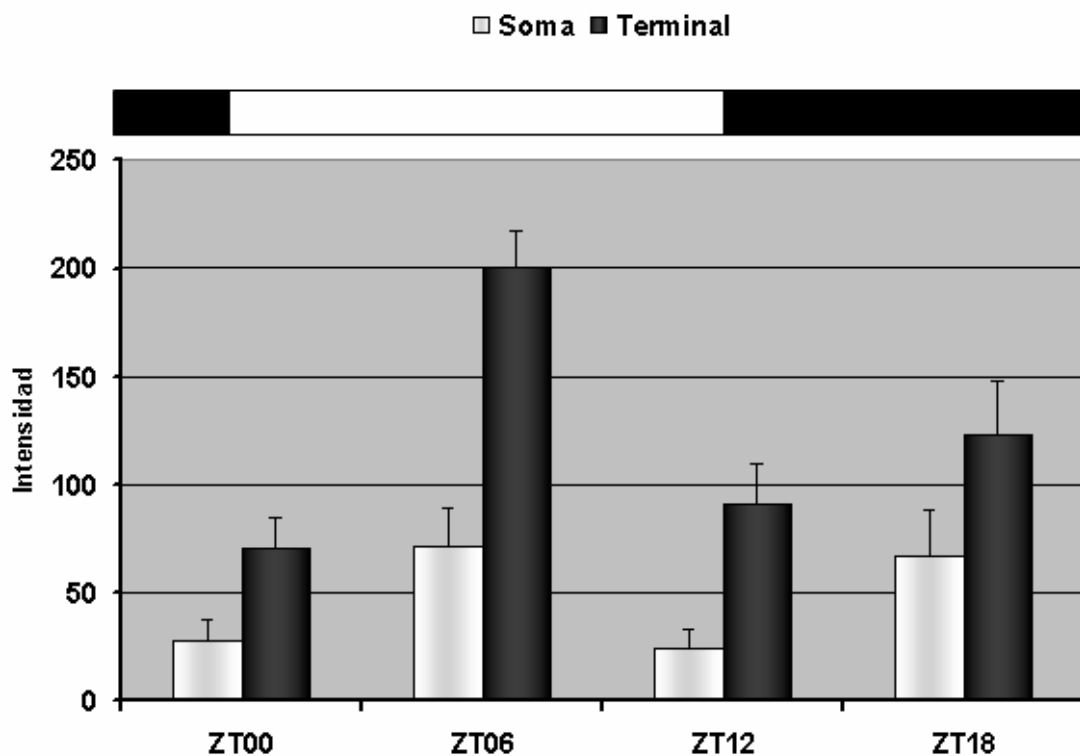


Fig35. Comparación de la inmunoreactividad entre soma y terminal axónica de PKC α en animales control. Barras blancas, intensidad máxima de la media en la medición de la inmunoreactividad de PKC α en el soma. Barras negras, intensidad máxima de la media en la medición de la misma en terminal axónica. En este modelo animal, la intensidad entre soma y terminal siempre presenta relevancia estadística.

1.2.2. Western blot para PKC α en el ratón control.

La *translocación* de la proteína a membrana se analizó mediante Western blot (WB), separando la proteína presente en citosol de la ubicada en membrana, para cada tiempo de estudio. Cada muestra, que corresponde a un ZT distinto, posee una fracción de membrana y una fracción citosólica. La proporción de proteína presente en la fracción de membrana fue hallada teniendo en cuenta la existencia de PKM. Así, la suma de las bandas del WB, para PKC α y PKM en membrana, representa la proteína activa que posee la célula en los diferentes ZT del ciclo luz/oscuridad. Se utilizó como control de carga la bomba Na²⁺-K⁺ ATPasa para determinar la cantidad de proteína presente en membrana en cada ZT. El Western blot para PKC α en este modelo animal ofrece una expresión rítmica en los diferentes tiempos (**Figura 36**). Los experimentos de WB se llevaron a cabo por duplicado, obteniendo resultados similares en ambos experimentos. El uso del anticuerpo de la Na²⁺-K⁺ ATPasa nos facilitó la estimación de la pureza de la fracción de membrana.

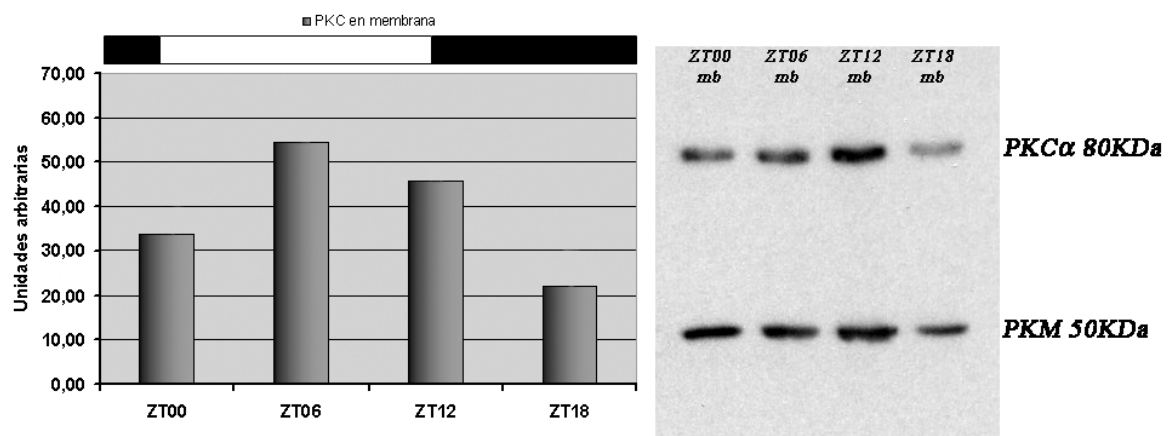


Fig36. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en animales control. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de la PKC α presente en membrana en los diferentes ZT. Cada columna es la suma de la densitometría realizada de la banda de PKC α y la de PKM, en la fracción de membrana del Western blot. A la derecha, imagen de un WB representativo de la fracción de membrana con las bandas para PKC α a 80KDa y PKM a 50KDa.



La cuantificación del tanto por ciento de proteína que se transloca a membrana respecto al total de la misma en ese tiempo, fue realizada mediante el uso del anticuerpo contra Hsc70. Para una *n* igualmente de dos, los datos muestran un % mayor de proteína translocada en las horas de luz (**Figura 37**).

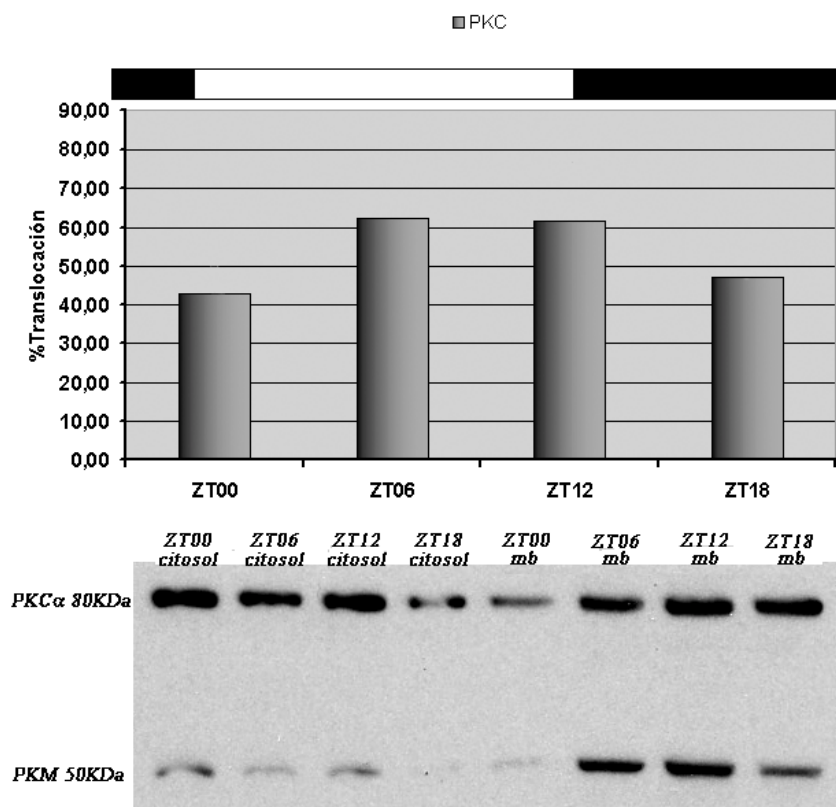


Fig37. Análisis del tanto por ciento de Translocación de PKC α . El histograma representa la translocación a membrana de la proteína, con respecto del total de la misma, en cada tiempo. Este proceso es más destacado en las horas de luz del ciclo de 24 horas. Por debajo de la gráfica se muestra una imagen de Western blot representativa con las bandas para PKC α a 80KDa y PKM a 50KDa.

El estudio de la PKC α activa, a través del análisis de ésta en membrana, nos indica una mayor necesidad de la proteína en las horas de luz. De la misma manera, el tanto por ciento translocado de proteína desde el citosol a membrana es igualmente superior en esas horas de luz. Las necesidades de diferentes elementos para la activación de la PKC α , como la célula despolarizada, son reforzadas por nuestros resultados.

1.2.3. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón distrófico Rd10.

Al igual que en el modelo animal anterior, en el ratón distrófico Rd10 también se procedió a cuantificar la intensidad de la inmunorreactividad para PKC α en los cuatro tiempos ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. Las determinaciones realizadas para cada ZT se representan en la *lámina 8*. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que existe también para el ratón Rd10 un patrón de expresión dependiente de las horas del día (**Figura 38**). No obstante, se aprecia un desfase en el tiempo de la expresión máxima, analizada por inmunofluorescencia, con respecto al patrón de expresión observado en ratones control. Para el ratón distrófico, el momento de mayor expresión de PKC α se produce en el tiempo ZT12, tanto en el soma como en la terminal axónica.

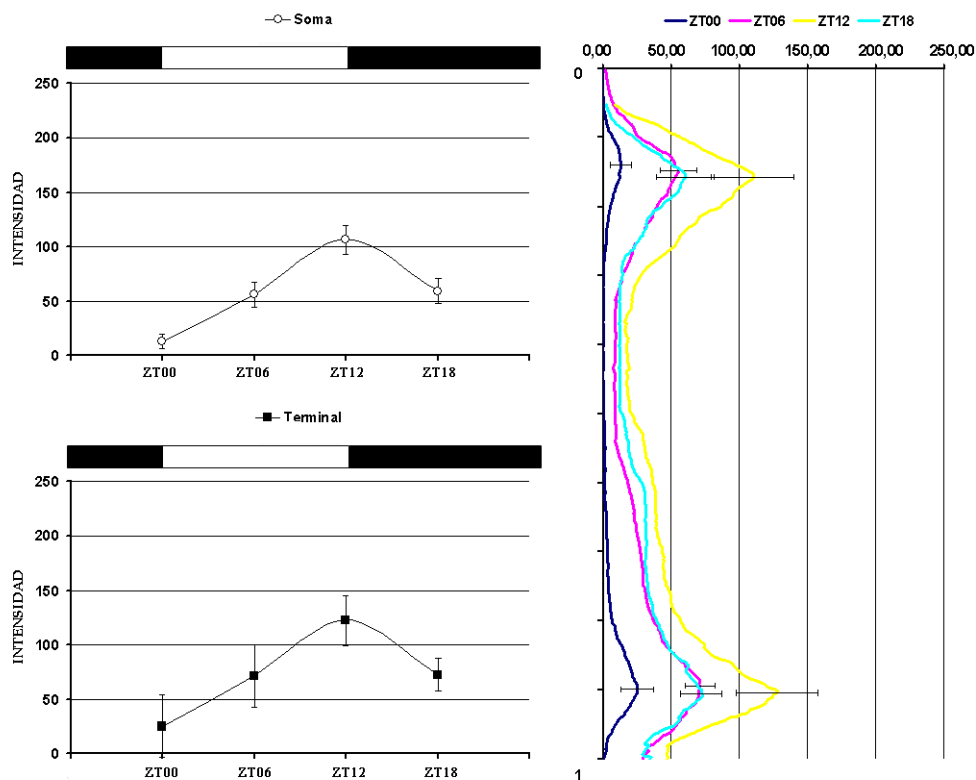


Fig38. Representación gráfica de la inmunorreactividad en soma y terminal axónica de PKC α en Rd10. A la derecha de la figura se muestran las gráficas de la cuantificación de la inmunorreactividad de PKC α a los distintos ZT, en soma y terminal. A la derecha, medias de las mediciones realizadas para cada tiempo. Se representa junto a la Desviación Estandar (DE) un valor máximo en soma y otro en terminal axónica. La ritmicidad de la expresión de PKC α es patente tanto en soma como en terminal, con un desfase del pico máximo en el tiempo con respecto a los animales control.



Las diferencias estadísticas entre los cuatro tiempos son *extremadamente significativas* (*ANOVA one way*, $p < 0,0001$). Con el test de *Comparaciones Múltiples de Tukey-Kramer* la comparación del ZT00 frente al resto de tiempos presenta diferencias *extremadamente significativas* para todos los casos ($p < 0,001$). Lo mismo ocurre con la comparación de ZT12 con ZT06 y ZT18. Únicamente el enfrentamiento ZT06 vs ZT18 muestra diferencias *no significativas*. Los mismos resultados estadísticos se dan al comparar grupos dos a dos por el test *t de Student* (corrección de *Welch*). La estadística ofrece las mismas diferencias comparando entre sí la señal emitida por los somas de los 4 grupos, que las resultantes a la comparación de la señal entre las terminales axónicas.

El análisis del *transporte* de la $PKC\alpha$ desde soma a terminal axónica muestra una clara diferencia con el ratón sano. En este caso la inmunofluorescencia captada en soma no presenta diferencias significativas con respecto a aquella medida en el terminal, para ninguno de los tiempos. (**Figura 39**).

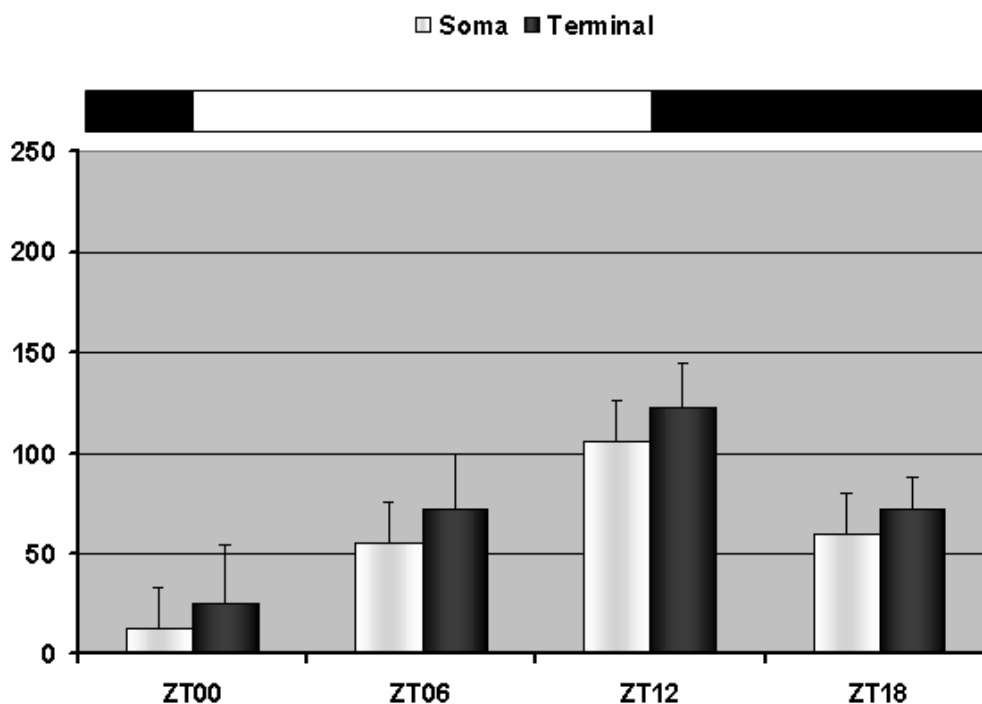


Fig39. Comparación de la inmunorreactividad entre soma y terminal axónica de $PKC\alpha$ en Rd10. Barras blancas, intensidad máxima de la media en la medición de la inmunorreactividad de $PKC\alpha$ en el soma. Barras negras, intensidad máxima de la media en la medición de la misma en terminal axónica. En este modelo animal, la intensidad entre soma y terminal en ningún caso presenta relevancia estadística.



La ausencia de diferencias en el grado de inmunorreactividad observada entre soma y terminal axónica parece indicar una disminución en el transporte de la PKC α en los ratones distróficos. Debido a la ausencia de los fotorreceptores en estos animales, podríamos postular que el transporte de la PKC α es un fenómeno derivado de la activación de conos o preferentemente bastones; sin embargo, dado que la expresión de PKC α sigue presentando un comportamiento circadiano, parece que la información procedente de ipRGC sería la responsable de dicho comportamiento.

1.2.3. Western blot para PKC α en el ratón Rd10.

La *translocación* de la proteína a membrana en células bipolares de bastón también fue analizada por Western blot. Los resultados muestran una mayor cantidad de proteína activa en el tiempo ZT12. Este análisis permite observar un desfase en la activación de la enzima con respecto al ratón control, similar al que acabamos de describir para los estudios de inmunorreactividad (**Figura 40**).

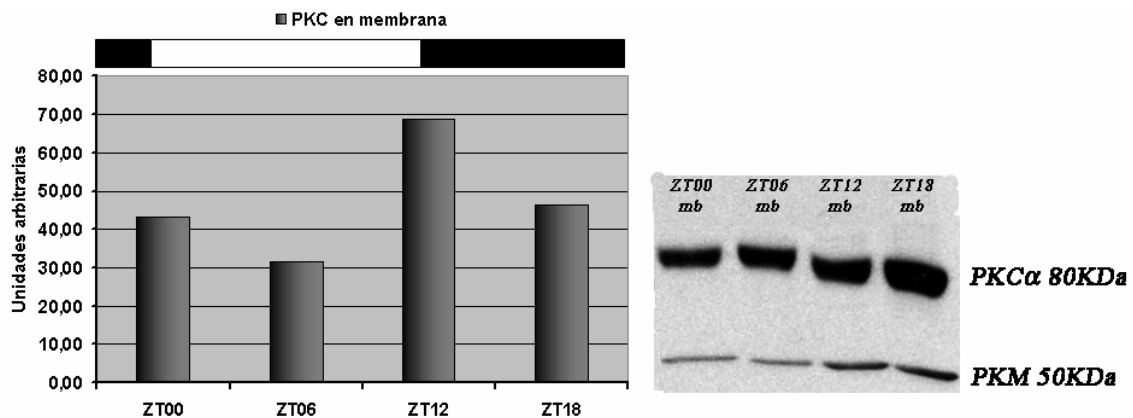


Fig40. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en Rd10. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de la PKC presente en membrana en los diferentes ZT. Cada columna es la suma de la densitometría realizada de la banda de PKC α y la de PKM, en la fracción de membrana del Western blot. A la derecha, imagen de un Western blot representativo de la fracción de membrana con las bandas para PKC α a 80KDa y PKM a 50KDa.



Como en el ratón control, se determinó el porcentaje de *traslocación* de la proteína PKC α , referida al total de proteína para cada ZT. Se pudo observar que dicha *traslocación* presenta unos valores mayores para los tiempos ZT12 y ZT18 (**Figura 41**). Los experimentos de Western blot con retina de ratones Rd10 también fue realizado por duplicado, si bien la cuantificación mediante los controles de carga sólo pudo ser ejecutada en una de las membranas (n=1).

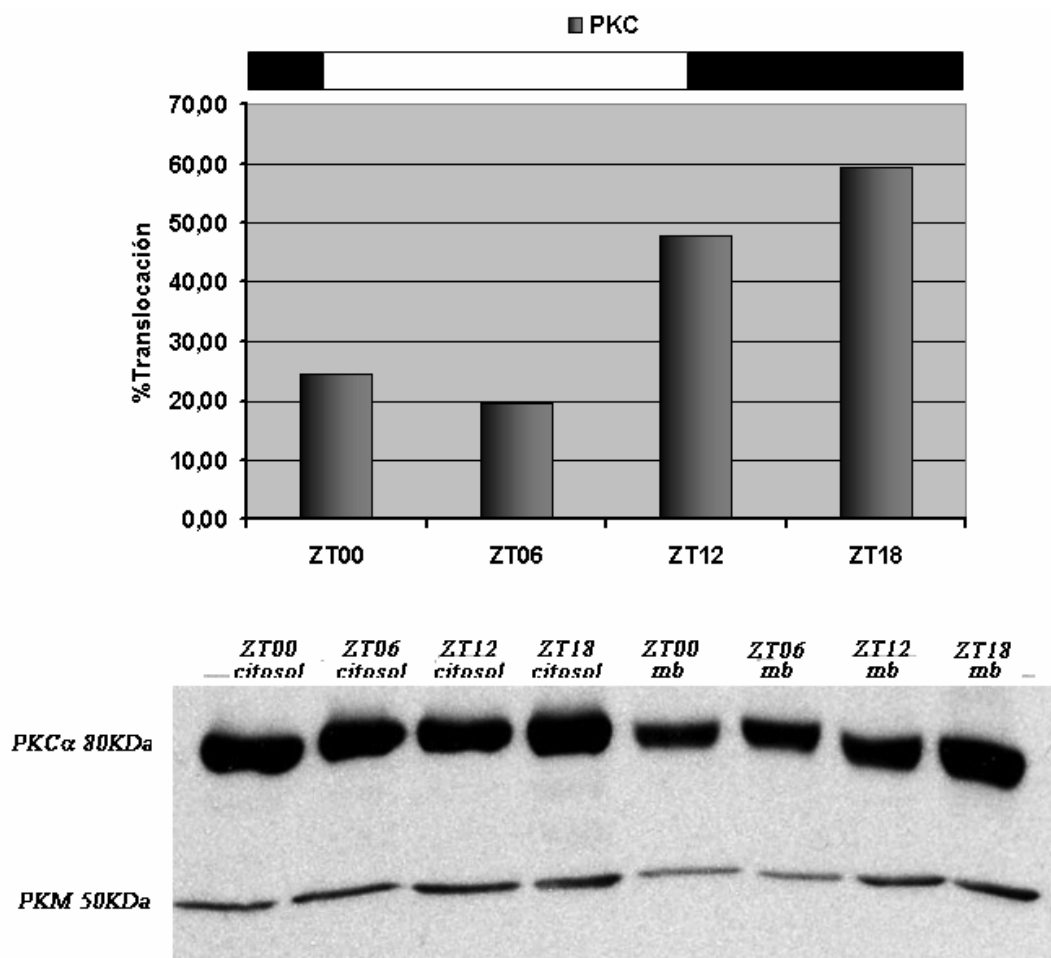


Fig41. Análisis del tanto por ciento de *Translocación* de PKC α en Rd10. El histograma representa la *translocación* a membrana de la proteína, con respecto del total de la misma, en cada tiempo. Este proceso se encuentra desfasado con respecto al % de *translocación* observado en animales control. Por debajo de la gráfica se muestra una imagen de Western blot representativa con las bandas para PKC α a 80KDa y PKM a 50KDa.



1.2.5. Inmunorreactividad para PKC α en el ratón *Opn4 Knock Out*.

La determinación de la señal de PKC α en un modelo animal carente de células portadoras de Melanopsina nos permite relacionar el papel relativo a los fotorreceptores, conos y bastones, con la ritmicidad de la expresión de PKC α .

En la *lámina 9* se representan las medidas de intensidad para los tiempos ZT06 y ZT18 en los ratones *Opn4 KO*. El experimento de cuantificación del grado de inmunofluorescencia de PKC α en el modelo animal *Knock Out* del gen *Opn4*, fue realizado conjuntamente con nuevas preparaciones de los ratones control y Rd10. Las determinaciones fueron realizadas para cada tiempo, tomando un total de tres fotografías en los animales control y Rd10 y cuatro fotografías en los animales *Opn4 KO*.

Al disponer sólo de dos tiempos para el análisis de la inmunorreactividad de PKC α en el ratón *Opn4 KO*, no podemos determinar si existe un comportamiento cíclico en la síntesis o expresión de la proteína. No obstante, al comparar los datos obtenidos en el ratón *Opn4 KO* con los de ratones control y distróficos, observamos que el análisis cuantitativo de la inmunorreactividad para PKC α en los animales *Opn4 KO* se asemeja más al de los ratones Rd10.

Asimismo, se cuantificó la señal de soma y terminal axónica para cada tiempo, pudiendo así determinar el *transporte* de la proteína dentro de cada uno de los dos ZT (**Figura 42**). De la misma manera que ocurrió en el Rd10, la estadística no ofrece diferencias significativas.

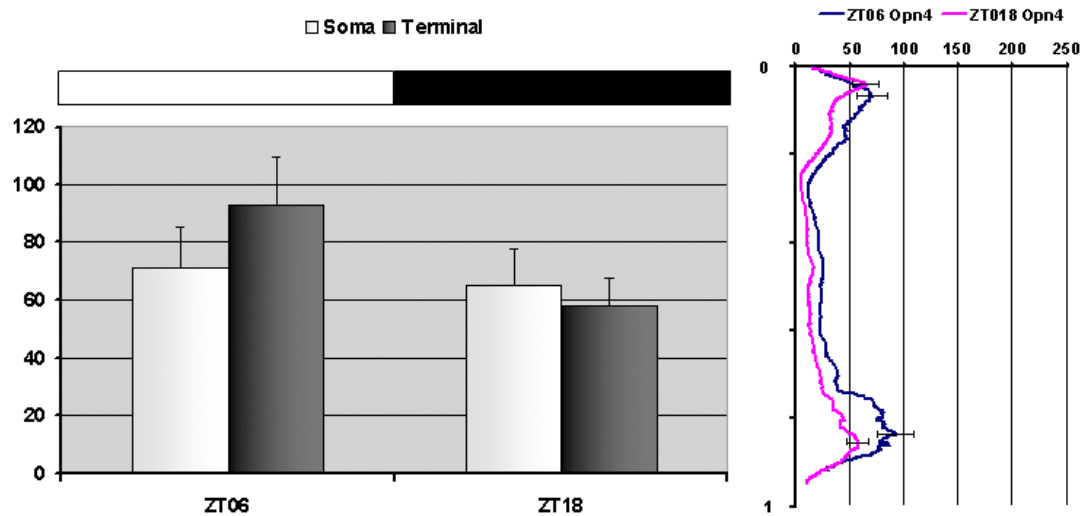


Fig42. Comparación de la inmunorreactividad entre soma y terminal axónica de PKC α en Opn4KO. A la derecha de la figura se muestra la gráfica de la cuantificación de la inmunorreactividad de PKC α a ZT06 y ZT18, en soma y terminal. A la derecha, medias de las mediciones realizadas para cada tiempo. Se representa junto a la Desviación Estándar (DE) un valor máximo en soma y otro en terminal axónica. No aparecen diferencias significativas en la inmunorreactividad de PKC α en soma y terminal axónica dentro de cada tiempo.

El análisis de las intensidades máximas del soma y terminal axónica para el ratón control, mostró las mismas diferencias significativas que las ya explicadas en el apartado 1.1.1 (ANOVA *one way*, $p < 0,0001$). La comparación, entre soma y terminal, por el test de *Tukey-Kramer* presenta diferencias *extremadamente significativas* para el tiempo ZT06 ($p < 0,001$) y *muy significativas* para ZT18 ($p < 0,01$). La estadística mediante el test *t de Student* ofrece diferencias con $p < 0,01$ para ZT06 y ZT18 analizando entre sí soma y terminal de cada grupo. En el ratón Rd10 las diferencias estadísticas fueron *muy significativas* (ANOVA, $p < 0,01$). El análisis entre soma y terminal para ZT06 mostró diferencias *no significativas*, al igual que el tiempo ZT18 (*Tukey-Kramer*). Al igual que este último modelo animal, el Opn4 KO presenta diferencias *no significativas* entre soma y terminal axónica para ZT06 y ZT18 (ANOVA $p < 0,05$; *Tukey-Kramer* y *t de Student* $p > 0,05$)

1.2.6. Western blot en el ratón Knock Out para *Opn4*.

Para este modelo animal el análisis de la *translocación* de la proteína se realizó con la banda de PKC α a 80 KDa de la fracción de membrana. No apareció señal en la película para el peso de 50 KDa (PKM). La tendencia en la expresión de PKC α para el ratón *Opn4* KO en dos membranas diferentes es igual para los tiempos ZT06 y ZT18; existe menor expresión en el primer tiempo con respecto al segundo (**Figura 43**). La normalización con el control de carga Na²⁺-K⁺ATPasa sólo se pudo realizar en uno de los experimentos.

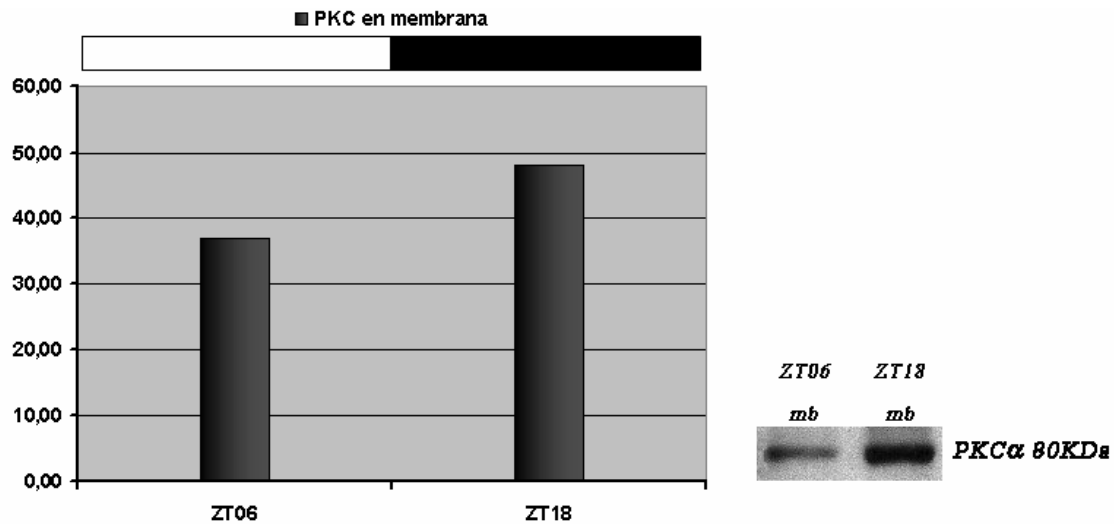


Fig43. Cuantificación de la PKC α presente en membrana en *Opn4*KO. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de la PKC α presente en membrana en los diferentes ZT. La densitomertría sólo fue realizada para la banda de 80KDa PKC α en la fracción de membrana del Western blot. A la derecha, imagen de un Western blot representativo de la fracción de membrana.

Del mismo modo que en el análisis de la inmunorreactividad, los experimentos de Western blot tampoco nos permitieron responder a la pregunta de cuál y cómo será el patrón circadiano de la expresión de la proteína PKC α en el *Opn4* KO. Tampoco podemos comparar los resultados de este WB con los realizados en los otros modelos animales, al no haberse corrido las muestras conjuntas en el mismo gel. Sin embargo,



este experimento si que aporta el dato de conocer cómo la expresión de la proteína en este ratón parece mayor en las horas de oscuridad, con respecto a las horas de luz.

Tomados de forma conjunta, los experimentos de análisis de la proteína PKC α nos permiten afirmar que esta proteína mantiene una expresión circadiana en los modelos animales estudiados, siempre y cuando exista un tipo de célula fotosensible en sus retinas.

- Los estudios conjuntos de inmunocitoquímica y Western blot en el ratón control refuerzan los datos bibliográficos sobre la activación de la proteína en horas de luz. Las necesidades de fosfolípidos y calcio de la proteína, y por ende de la despolarización de la célula para la apertura de canales de ese catión, explican la presencia mayoritaria de PKC α en terminal axónica, en las horas representativas de la fase de luz del ciclo de 24 horas.
- En el ratón Rd10 existe también una expresión circadiana de la proteína que, sin embargo, se encuentra desfasada con respecto al ratón control. Esto parece indicar una modulación por la luz por parte del único fotorreceptor presente, la melanopsina, pero que sin embargo no permite mantener una ritmicidad similar a la que presentaría de poseer los fotorreceptores clásicos. Respecto al transporte de la proteína a la terminal, no encontramos diferencias entre soma y terminal axónica para ninguno de los tiempos analizados. Según estos resultados parece que la presencia de conos y bastones es fundamental para el transporte de la PKC α .
- Al analizar el ratón carente de melanopsina, Opn4 KO, encontramos que pese a poseer conos y bastones no existe una diferencia entre los extremos de la célula bipolar. Respecto a la expresión de la proteína activa en los modelos murinos Rd10 y Opn4KO, encontramos un resultado semejante, observándose los valores mayores para esa activación en horas de oscuridad.



1.3- *COTRANSPORTADOR Na⁺-K⁺-CL⁻ (NKCC1).*

El cotransportador de Sodio-Potasio/Cloro (NKCC) se expresa en somas y prolongaciones dendríticas de células horizontales de la retina de ratón, así como en las células bipolares de tipo *ON* (véase *Introducción*). Gracias a dicho cotransportador, las células horizontales y bipolares introducen el ión cloro en el interior de la célula, ayudando a mantener el potencial de equilibrio para el cloro más positivo que el potencial de membrana (Blanco et al, 1996; Varela et al, 2005a; 2005b). Las células ganglionares fotosensibles, ya sea de forma directa o indirecta, podrían modular la expresión de NKCC en retina, regulando de esta forma un aspecto funcional del procesamiento retiniano de la información visual.

El cotransportador de iones, NKCC, se localiza en las dendritas de células bipolares de tipo *ON*. Estas células son la segunda célula en la línea de transmisión de la información sensorial visual. En las células bipolares, el transportador NKCC1 colocaliza con el receptor metabotrópico de glutamato (mGluR6) en la porción más apical de las dendritas de las células bipolares *ON* (Vardi et al, 2000; Li et al, 2008).

El estudio que ahora se presenta sobre el cotransportador Sodio-Potasio / Cloro se ha llevado a cabo con un anticuerpo contra la isoforma NKCC1 de dicho cotransportador. La dificultad generada por el marcaje de esta molécula obligó a un tratamiento agresivo con detergentes de los tejidos a estudiar (ver *Materiales y Métodos*).

Con el fin de asegurar el correcto marcaje de la sección retiniana, se llevó a cabo una doble tinción; además del anticuerpo contra NKCC1, se utilizó simultáneamente otro para calbindina, que en el ratón marca selectivamente las células horizontales de la retina. La *lámina 10* muestra la expresión del cotransportador NKCC1 y de la calbindina a nivel de la CPE. El análisis de las muestras permitió observar que el marcaje para NKCC1 se localiza exclusivamente en la membrana celular, dejando sin tinción el soma de las células horizontales.



1.3.1. Inmunorreactividad de NKCC1.

El marcaje del cotransportador de Sodio-Potasio/Cloro en el ratón sano adulto permite observar una gran expresión de dicha molécula a nivel de las CPE, abarcando procesos de células horizontales y posiblemente de células bipolares tipo *ON*. La estructura y disposición de las células horizontales, observadas con este doble marcaje, así como la distribución cuantitativa de ellas, se mantuvo en los cuatro tiempos a los que fue estudiada la expresión de esta proteína en el ratón sano control: ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. En la *lámina 11* se presentan las imágenes para cada tiempo en este modelo animal. El anticuerpo contra la subunidad NKCC1 se presenta en color verde y se localiza de forma específica en la capa plexiforme externa. El marcaje de los somas y procesos de células horizontales obtenido con el anticuerpo anti-Calbindina muestra la confluencia con el marcaje del cotransportador. El estudio llevado a cabo en las distintas fases de actividad circadiana no mostró diferencias con respecto al grado de inmunorreactividad.

Posteriormente, se realizó el mismo análisis en los ratones Rd10. En este caso, el análisis de la inmunorreactividad para NKCC1 mostró una diferencia notable con respecto a los ratones control. En la *lámina 12* se muestra el doble marcaje con anticuerpos anti-NKCC1 y anti-Calbindina, en cada una de las cuatro fases de actividad circadiana (ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18). La señal emitida por este anticuerpo es prácticamente nula en cada uno de los ZT. Las células positivas para calbindina muestran un marcaje extremadamente tenue para NKCC1, que parece circunvalar la periferia de las células horizontales en cada ZT.

Con el fin de comparar el grado de inmunorreactividad para NKCC1 en retina de ratón *Opn4* KO con los otros dos modelos animales, se realizó un nuevo experimento con secciones de los tres tipos de ratones. La señal para los tiempos ZT06 y ZT18 es prácticamente tan intensa en el modelo animal carente de Melanopsina como en el ratón sano; sin embargo, el marcaje anti-calbindina en el ratón distrófico es mucho más débil (*Láminas 13 y 14*, para ZT06 y ZT18 respectivamente).



En estas láminas se muestran también algunas células a nivel de la CNI y la capa ganglionar (CG) positivas a la presencia de este canal. La presencia de ambos anticuerpos, NKCC1 y Calbindina, a nivel de estas capas de la retina puede tratarse de una colocalización de ambas proteínas en células horizontales desplazadas y/o células amacrinas.

Se analizó, de la misma manera, la IR frente a esta proteína a distintas edades del modelo Rd10. En la **lámina 15** se muestra la señal emitida por el anticuerpo secundario Cy2 para las edades p19, p31, p46, p61, p90, p118 y p240. Encontramos células positivas a la edad de p19 y en p31 y p46; sin embargo, estas dos últimas edades ya presentan una menor intensidad. A partir de la siguiente edad, p61, la señal es reducida drásticamente a niveles ínfimos de marcaje, con correspondencia al propio por calbindina. Junto a estas edades de Rd10 se incorporó un C57 a p203 para comprobar si la disminución de la intensidad era consecuencia de una subregulación del transportador a edades adultas. La presencia de NKCC en esta última muestra fue positiva (dato no mostrado). Para todas las fotos se utilizó los mismos parámetros de obtención de imágenes, en el microscopio confocal.

1.3.2. Western blot de NKCC1.

Los datos obtenidos del análisis de la inmunofluorescencia fueron corroborados con la cuantificación de proteína a los diferentes tiempos en los modelos animales controles y distróficos. La expresión de NKCC1 mediante esta técnica mostró, en el animal control, una banda más o menos uniforme para las cuatro fases de actividad circadiana (ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18); En estos experimentos, realizados por duplicado, la expresión de la proteína se produce únicamente en la fracción de membrana (**Figura 44**). Los experimentos realizados en ratones distróficos Rd10 (n=2) no permiten vislumbrar marcaje alguno de la membrana de nitrocelulosa, para ese tamaño molecular. Por tanto, y sin necesidad de análisis cuantitativo, podemos afirmar que la expresión del transportador NKCC1 es muy débil en ratones con degeneración retiniana.

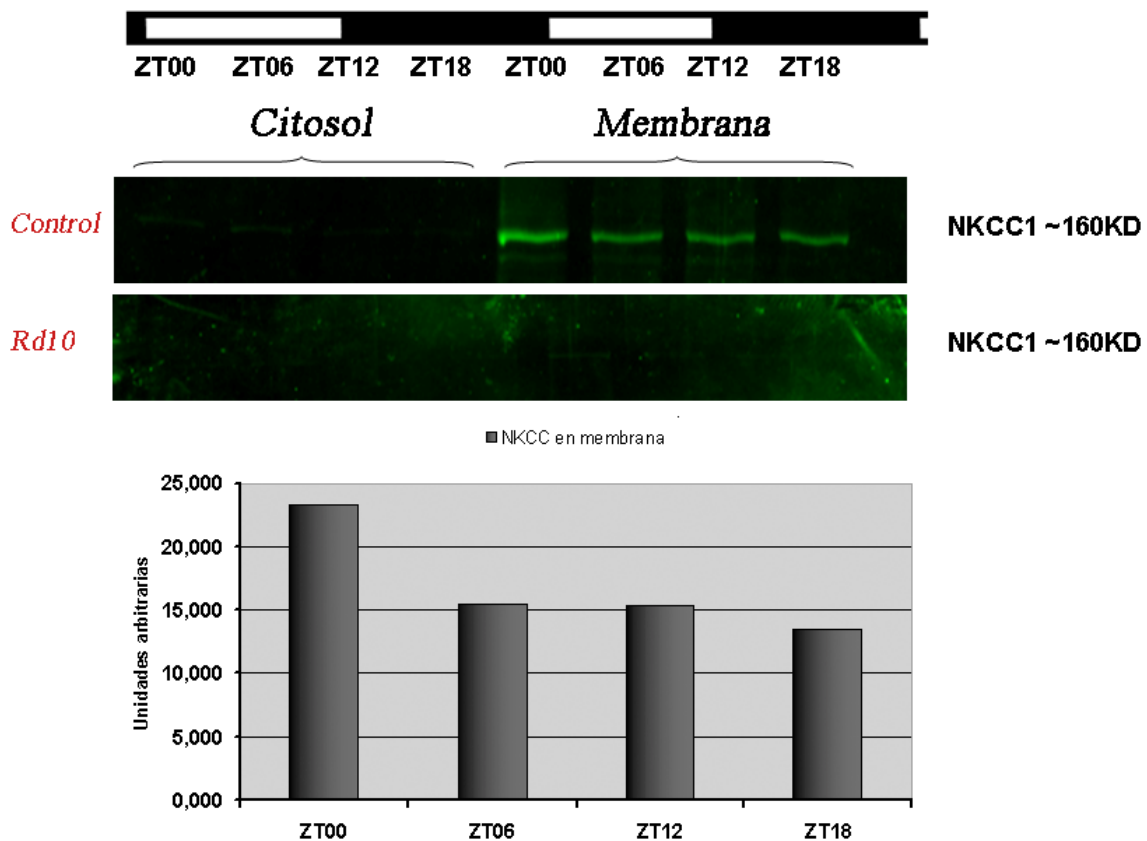


Fig44. Análisis por Western blot de la presencia de NKCC1 en citosol y membrana de ratón control a diferentes periodos del ritmo circadiano. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de NKCC1 presente en membrana en los diferentes ZT. El anticuerpo secundario utilizado se encuentra marcado con una molécula fluorescente. Para el revelado de estas membranas de nitrocelulosa se expusieron, en un lector *Odyssey LICOR software vs3.0*, a 800nm. Como control de carga fue empleada una banda inespecífica, presente en citosol y membrana, que aparecía a ~70KDa en ambos modelos animales (no mostrada). La representación gráfica mediante columnas atiende a los valores, analizados por densitometría, del modelo mudo control.

La inmunorreactividad del cotransportador NKCC1 no parece presentar diferencias en función del momento del ciclo luz/oscuridad analizado. En los animales control se observó una clara expresión de NKCC1 a nivel de la Capa Plexiforme Externa (CPE) y la membrana de células horizontales para todos los tiempos. En el modelo mudo Rd10, en edades superiores a los 100 días postnatales (p100), la expresión del cotransportador fue prácticamente inapreciable por el análisis de la inmunofluorescencia. Estos resultados fueron confirmados con los datos de Western



blot. El modelo Opn4KO presenta un marcaje positivo de NKCC1 en la CPE pero una más difícil observación del mismo a nivel de las membranas de las células horizontales.

1.4- TIROSINA HIDROXILASA.

Asimismo, las células amacrinas que sintetizan dopamina (células Amacrinas Dopaminérgicas [AD] y ciertas células interplexiformes) lo hacen gracias a la enzima limitante Tirosina Hidroxilasa (TH). La secreción de dopamina presenta un pico de liberación en horas de luz, que se ha relacionado con las señales recibidas desde conos y bastones (Iuvone et al, 1978). Sin embargo, el papel de las ipRGC como potenciadoras de la difusión de dopamina aún es poco claro.

La producción de importantes aminas depende enteramente de la disponibilidad de la enzima Tirosina Hidroxilasa. Su regulación, en base al número y actividad enzimática, es por tanto el principal controlador de la síntesis de la predominante catecolamina en la retina, la dopamina. Varios mecanismos han sido propuestos para la regulación de esta enzima: por sus propios productos, por modulación alostérica de la actividad enzimática y/o mediante fosforilaciones necesarias para esa activación (Iuvone et al, 1982; Kumer y Vrana, 1996; Dunkley et al, 2004). Existe un amplio rango de proteínas quinasas y fosfatasa con capacidad de fosforilación en los residuos de serina que dispone la TH para su regulación (Ser8, Ser19, Ser31 y Ser40). Dentro de estas Kinasas encontramos, ejerciendo ese papel regulador, a la PKC α (Albert et al, 1984; Vulliet et al, 1985; Haycock et al, 1990)

1.4.1. Inmunoreactividad a TH.

La señal positiva utilizando el anticuerpo anti-TH la encontramos en una baja densidad de células en las retinas de los modelos animales control, Rd10 y Opn4 KO. Las células así marcadas se localizaron en el borde de la capa plexiforme interna (CPI) y en la capa nuclear interna (CNI). Sus finas dendritas aparecen marcadas formando un plexo uniforme en la capa más distal de la sublámina 1 de la CPI. También se aprecia, en contadas ocasiones, un marcaje de procesos que ascienden hacia la capa plexiforme externa.



1.4.2. Western blot de TH.

El análisis de los cuatro tiempos en el ratón control ofrece un patrón claramente circadiano. Las bandas aparecen fuertemente en la fracción citosólica. La normalización de la densidad se hizo utilizando como control de carga Hsc70, presente en ambas fracciones. La tendencia de la expresión de TH (n=3) se observa en la **Figura 45**. Tras la normalización de la señal se aprecia una mayor expresión de la proteína a tiempos ZT00 y ZT06; siendo esta misma menor para los restantes tiempos.

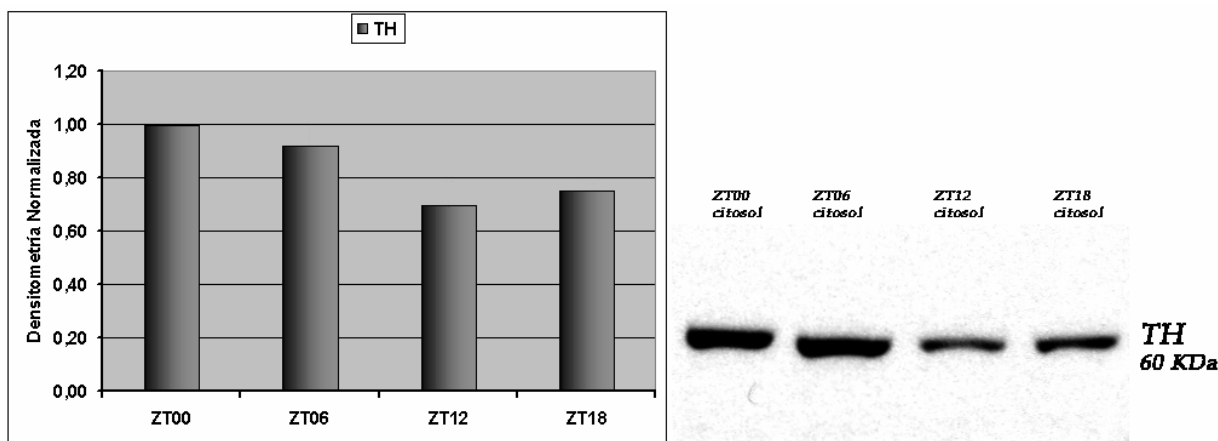


Fig45. Cuantificación de TH en el modelo animal control. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de TH presente en citosol en los diferentes ZT. Se realizó el análisis de la densitometría de las bandas del Western blot presentes a 60KDa. A la derecha, Western blot representativo de los resultados obtenidos para el modelo animal control.

En el caso del modelo múrido Rd10 la enzima TH (n=2) expone también un comportamiento circadiano, el patrón de expresión sigue la misma tendencia que en el ratón sano. En ZT00 se observa la máxima densidad de proteína, dándose a partir de ese momento el inicio del descenso de su expresión. También aquí se utilizó Hsc70 como control de carga (**Figura 46**).

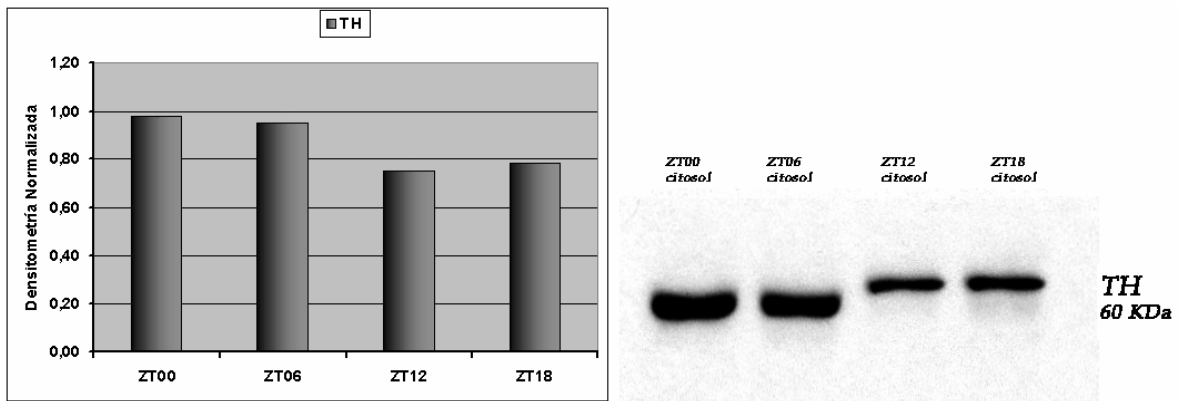


Fig46. Cuantificación de TH en el modelo animal Rd10. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de TH presente en citosol en los diferentes ZT. El análisis de la densitometría de las bandas del Western blot presentes a 60KDa se muestran a la izquierda de la figura. A la derecha, Western blot representativo de los resultados obtenidos para el modelo mürido con degeneración retiniana, Rd10.

El ratón *knock out* para melanopsina (Opn4 KO) presenta una expresión similar para ambos tiempos de estudio (ZT06 y ZT18). El experimento se realizó por duplicado constatándose el mismo resultado (n=2). En la **Figura 47** se representa la expresión de la proteína TH en este modelo mürido para los dos tiempos mencionados.

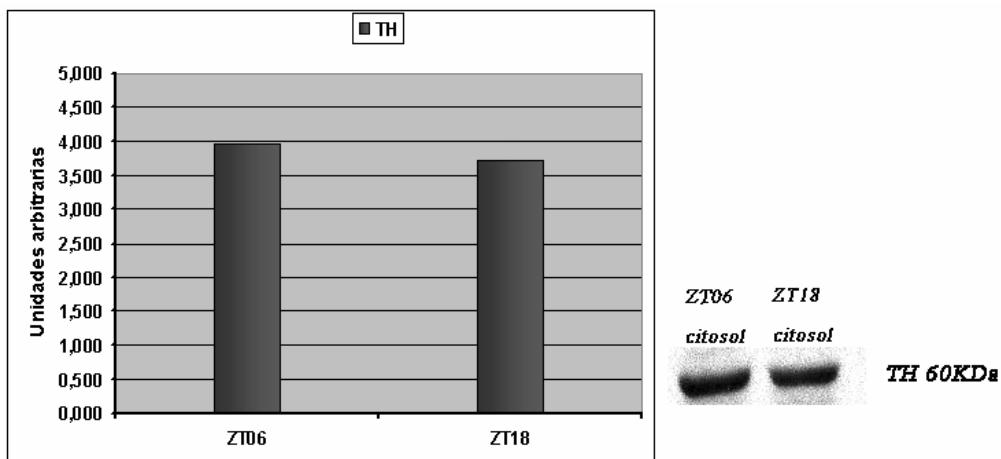


Fig47. Cuantificación de TH en el modelo animal Opn4 KO. La representación gráfica en columnas muestra la distribución de TH presente en citosol en los diferentes ZT. El análisis de la densitometría de las bandas del Western blot presentes a 60KDa se muestran a la izquierda de la figura. A la derecha, Western blot representativo de los resultados obtenidos para el modelo mürido carente de melanopsina, Opn4 KO.

Iconografía

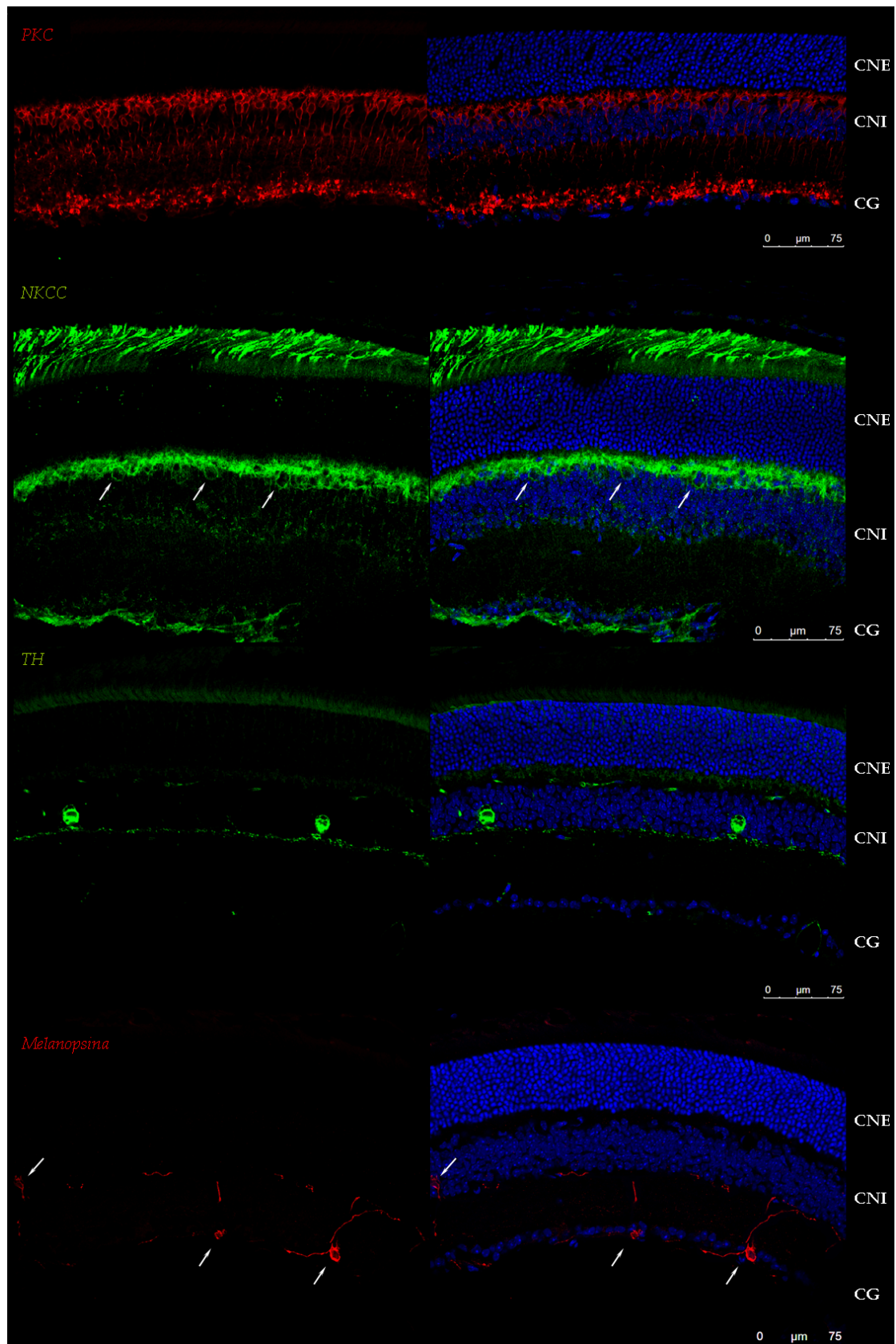


Lámina 1. Tipos celulares. Cortes sagitales de retina de ratón control donde se muestra el marcaje selectivo de células de la retina mediante Ac contra *PKC* (en rojo), *NKCC* (en verde), *TH* (en verde) y *Melanopsina* (en rojo). En la columna de la izquierda se muestra en azul el marcaje nuclear con DAPI. Se indica junto a las imágenes de microscopía confocal de la derecha los nombres de las capas de cuerpos celulares: Capa Nuclear Externa (CNE), Capa Nuclear Interna (CNI), Capa de células Ganglionares (CG). Las flechas señalan distintos tipos celulares (véase texto, página 56)

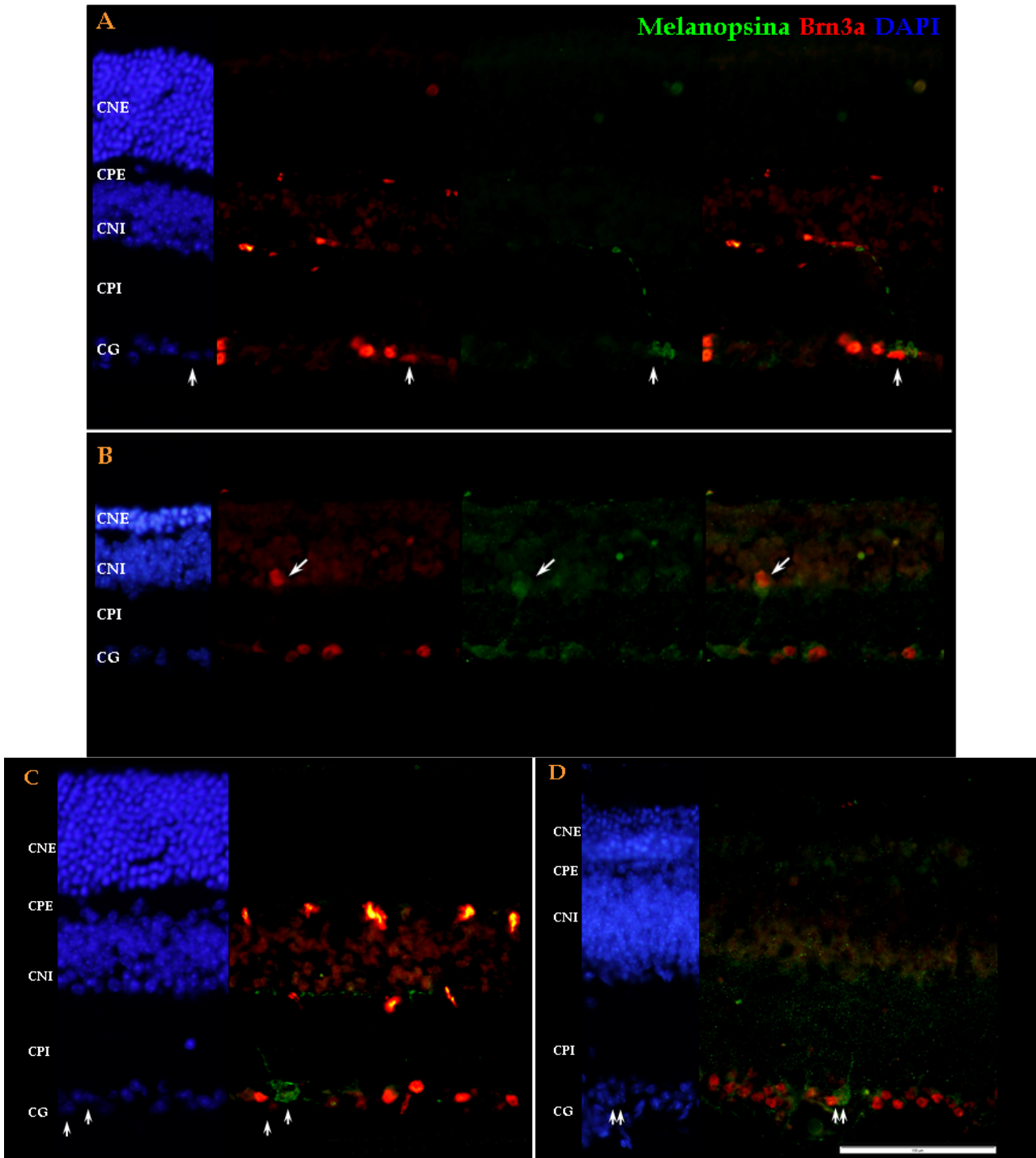
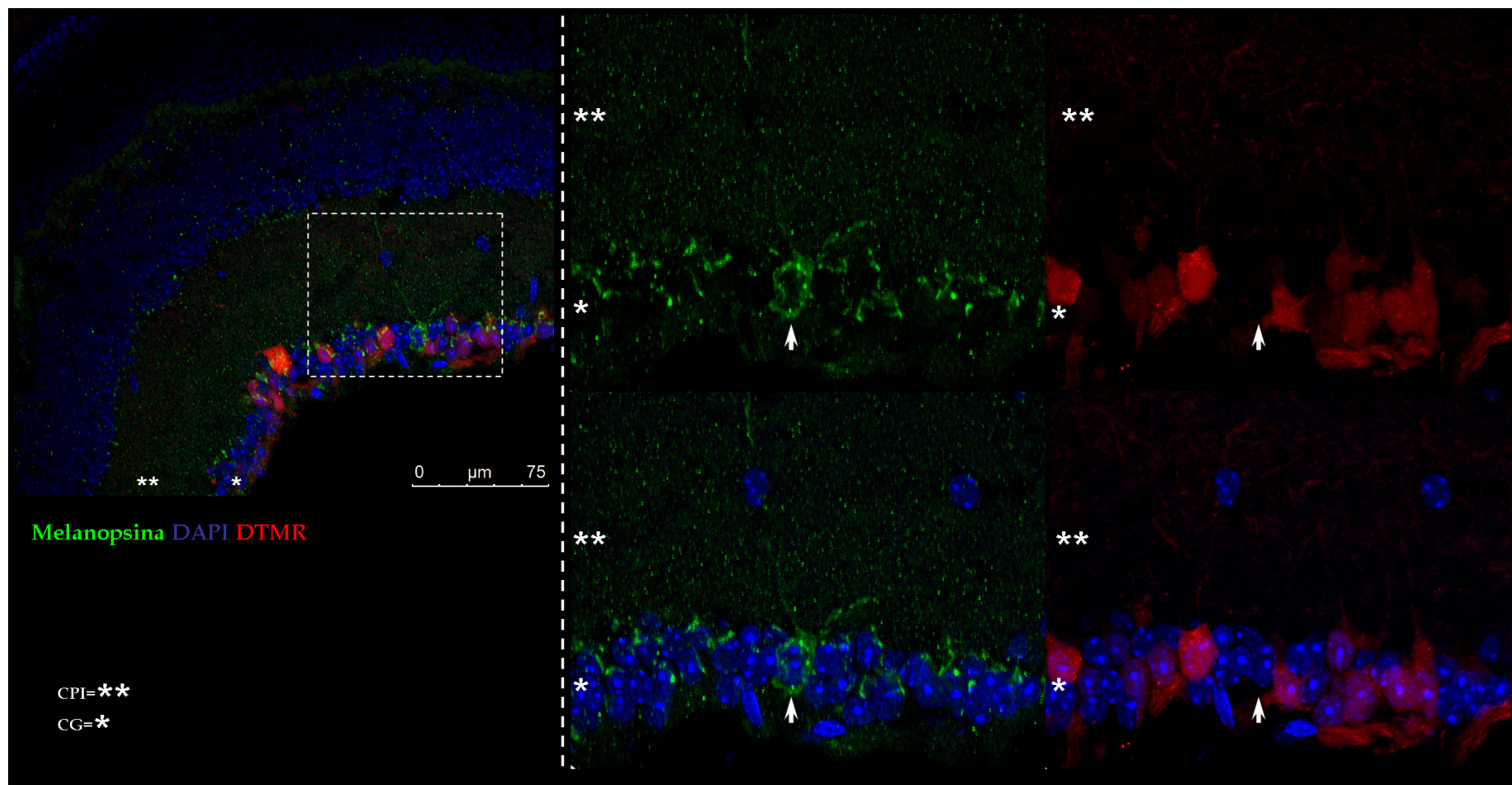


Lámina 2. Ejemplos de confluencia positiva y no confluencia entre melanopsina y Brn3a en C57BL6J y Rd10. La fluorescencia emitida por la excitación de Cy3 (rojo) representa la presencia de Brn3a. La melanopsina se observa en color verde (Cy2). Los núcleos se muestran en azul por la fluorescencia del intercalador de ADN, DAPI. **A-** Célula portadora de melanopsina en la Capa Ganglionar (CG) que muestra Brn3a en su soma en un animal control (flechas). **B-** En retina de ratón Rd10, se muestra una célula desplazada portadora de melanopsina (Capa Nuclear Interna, CNI) que presenta confluencia con la señal de Brn3a (flechas). En la capa ganglionar podemos encontrar células positivas a melanopsina entre somas positivos a Brn3a sin que exista confluencia entre estas señales. **C-** Ratón *wt* con célula melanopsínica no positiva a Brn3a. **D-** Retina de ratón Rd10 con célula melanopsínica no positiva a Brn3a. Escala 100µm, para todas las imágenes. Situamos las células portadoras de melanopsina en la capa ganglionar con flechas blancas.



Lámin 3. Doble tinción de células de la capa ganglionar (CG) con DTMR y anticuerpos anti-Melanopsina.

Imagen de microscopía Confocal a 40x de una retina de ratón control. Se observan las células ganglionares en rojo (DTMR) y las células portadoras de melanopsina en verde; los núcleos son teñidos con DAPI. En el lado derecho zoom $\sim 2,5\times$ de la zona recuadrada con línea discontinua. La célula melanopsínica y las células ganglionares (DTMR) se presentan en las dos imágenes superiores; por debajo la confluencia de dichas tinciones con los núcleos de la CG (DAPI).

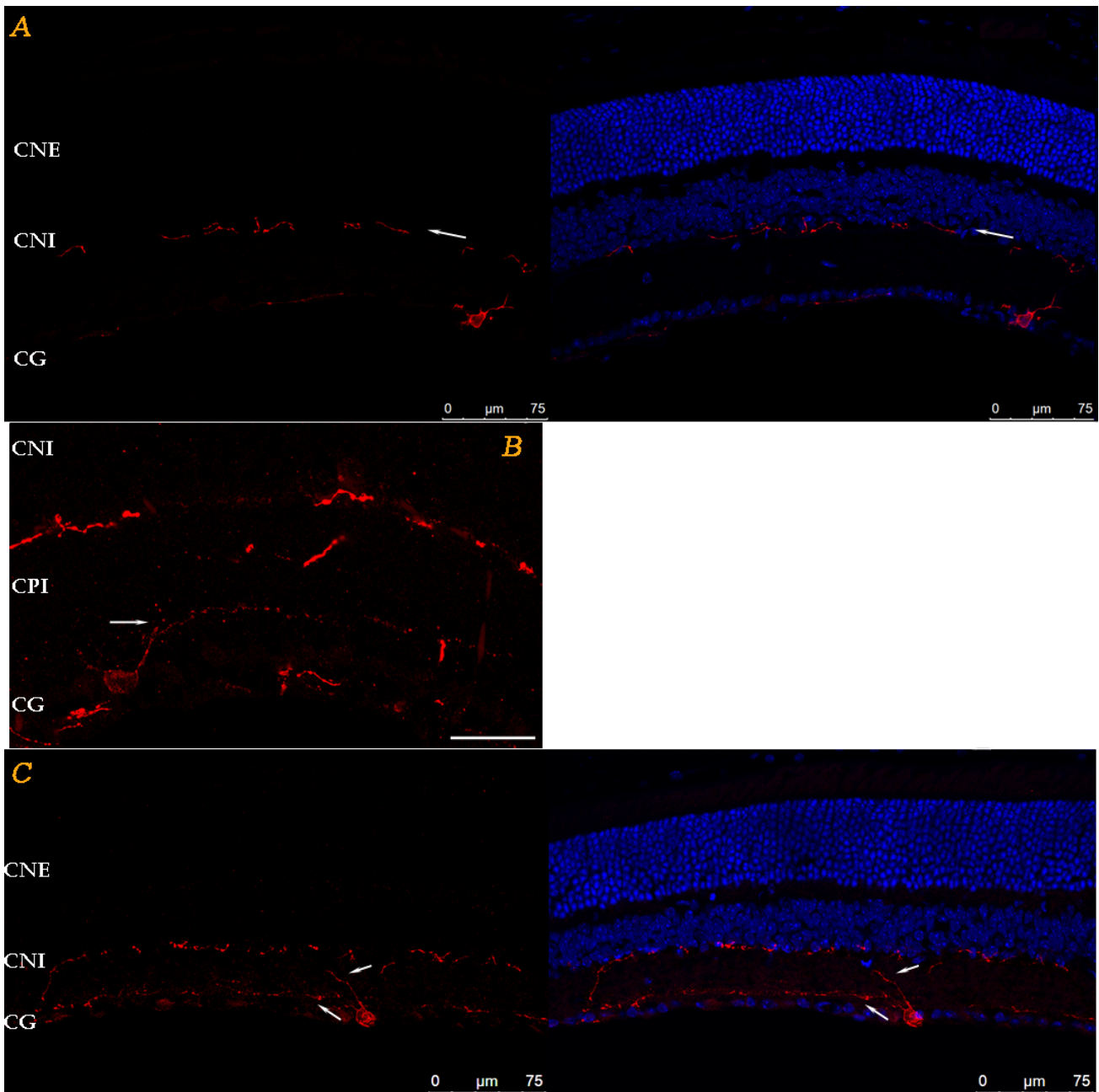


Lámina 4. Tipos de ipRGCs en base a la arborización de sus procesos dendríticos. Se muestra en esta lámina, de arriba a abajo, los tipos de células ganglionares clasificados por los nombres M1, M2 y M3.

A- Células con proyección hacia la parte más externa de la Capa Plexiforme Interna (CPI), en el límite con el comienzo de la Capa Nuclear Interna (CNI). Son las mayoritarias dentro de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) y tienen una alta fotosensibilidad. Se denominan M1. **B-** Célula cuya proyección parece extenderse únicamente a nivel de la zona media de la CPI. Por encima de esta célula se aprecian otras proyecciones de color más intenso a nivel del comienzo de la CNI, posiblemente pertenecientes a otra célula. La barra de escala en la esquina inferior derecha representa 50 μm. Son células con menor sensibilidad que las anteriores pero al igual que las M1 presentan una larga latencia de actividad. Se denominan M2. **C-** Se muestra una célula ipRGC que presenta los dos tipos de proyecciones ya comentados, tanto hacia sublámina *On* como sublámina *Off* de la CPI. Las ipRGCs muestran en color rojo (Cy3) sus somas y procesos; los núcleos de los diferentes estratos retinianos se muestran en color azul (DAPI). Las flechas blancas señalan las diferentes proyecciones que presentan estos tres tipos de células ganglionares.

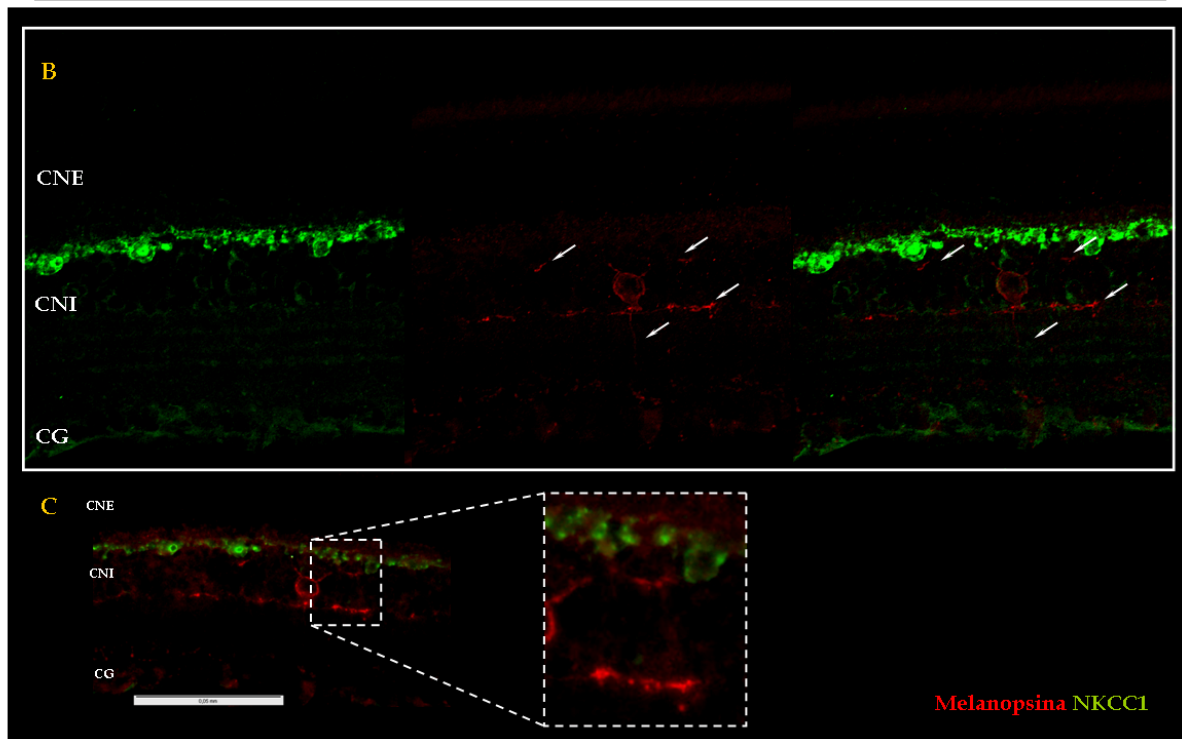
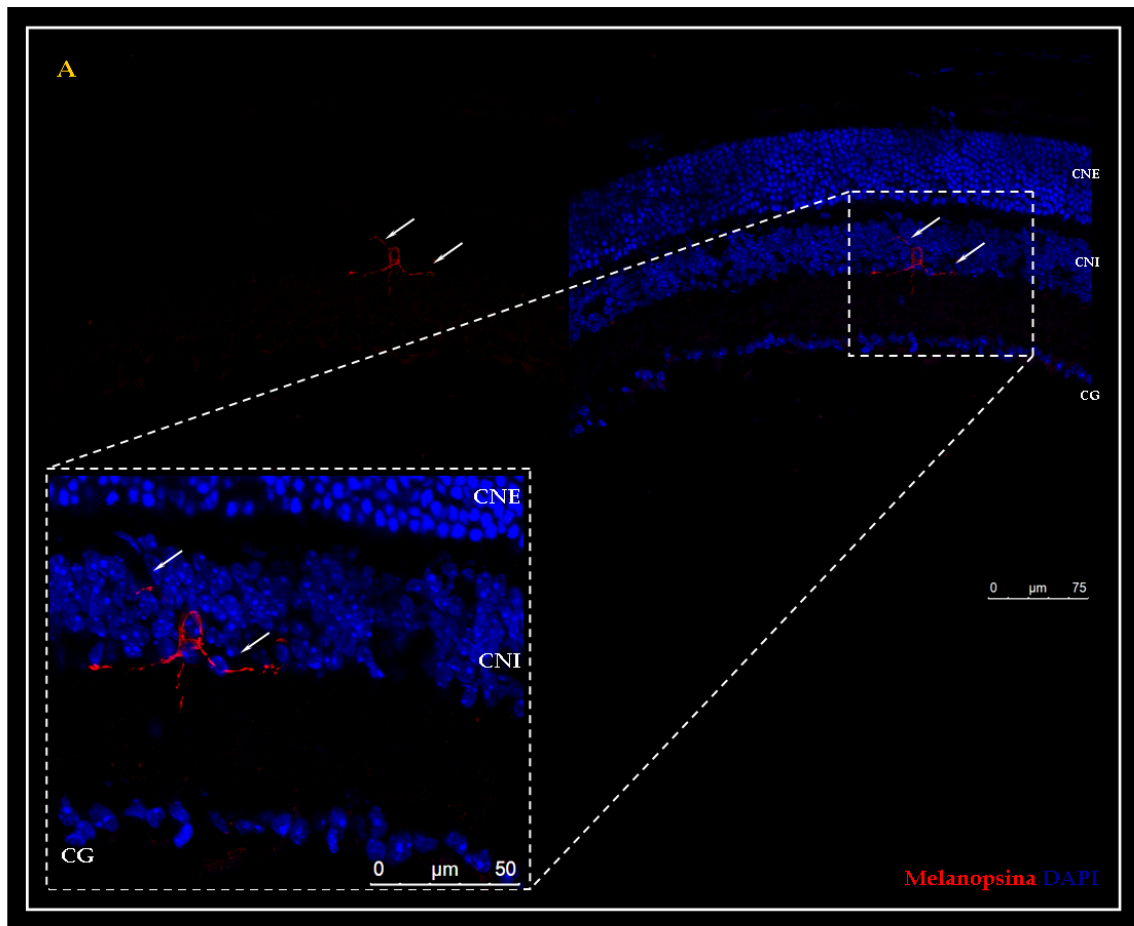
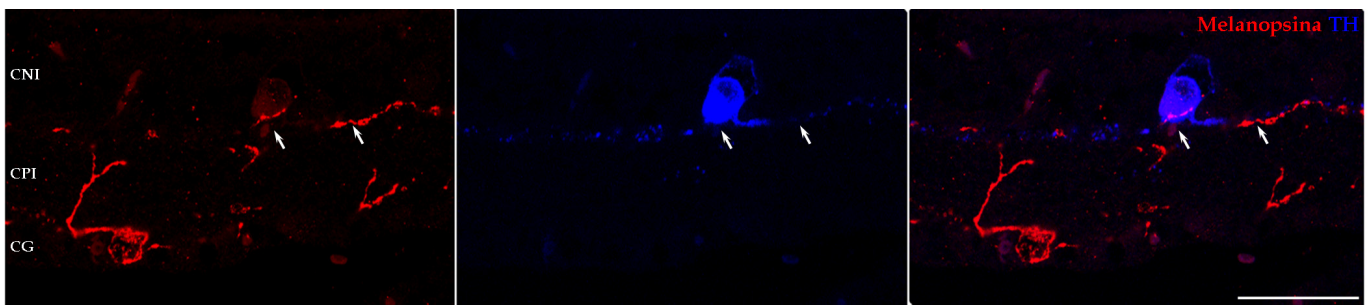


Lámina 5. Tipos de ipRGCs en base a la arborización de sus procesos dendríticos (II). Dos ejemplos de células positivas a melanopsina con soma desplazado en la CNI. **A-** Se muestra en azul el marcaje con DAPI y en rojo (Cy3) el marcaje de células Melanopsínicas. **B,C-** Se muestra en rojo (Cy3) el marcaje de las Melanopsínicas y en verde (Cy2) el marcaje de NKCC1. Las flechas blancas indican las proyecciones.

A



B

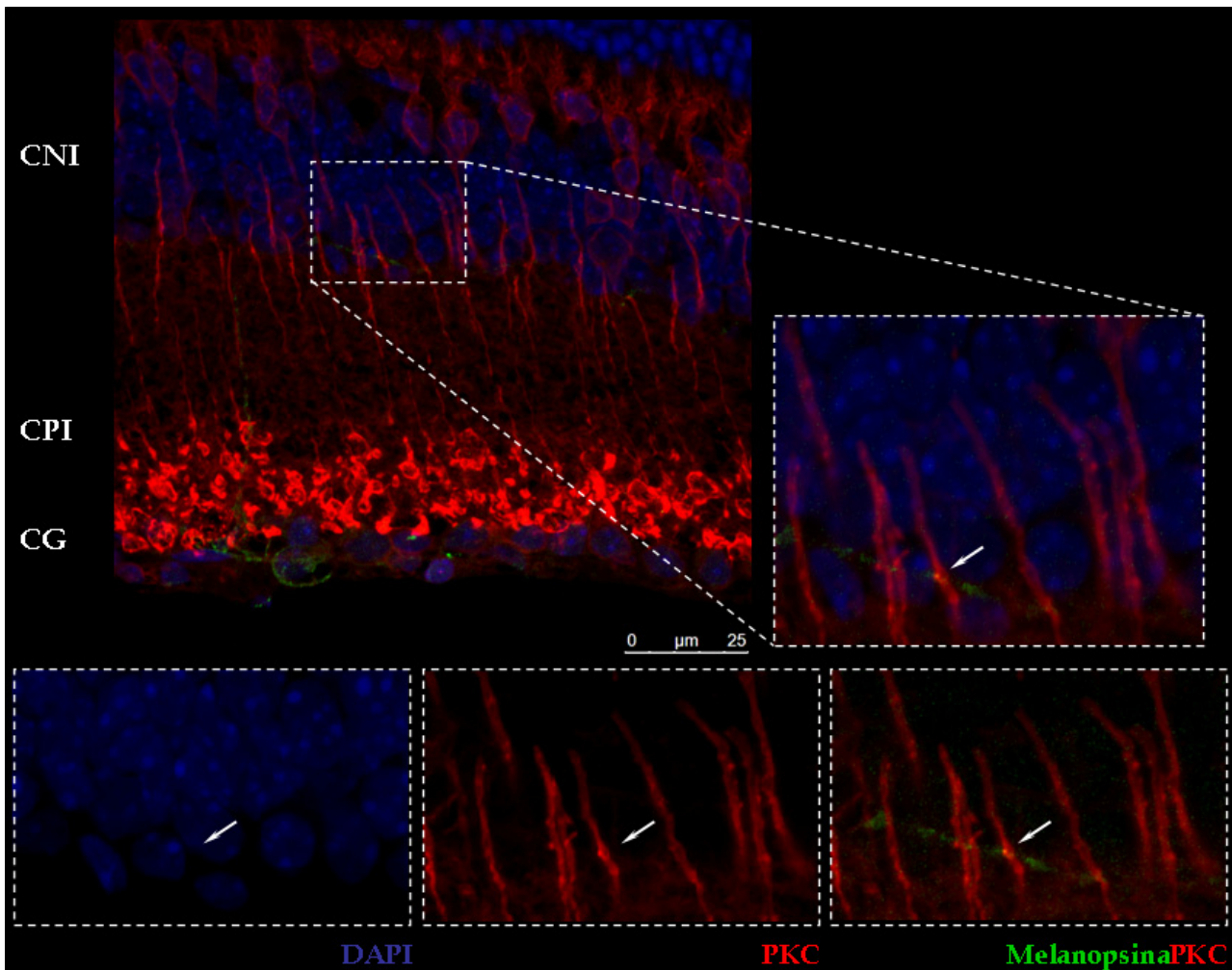


Lámina 6. Colocalización del marcaje positivo de Melanopsina con TH y PKC. A- Los procesos de las células amacrinas dopaminérgicas (AD) se extienden a lo largo del límite entre la Capa Nuclear Interna (CNI) y la Capa Plexiforme Interna (CPI). Las células portadoras de melanopsina pueden proyectar sus procesos a través de ese mismo límite. Las flechas señalan aquellas prolongaciones de ipRGC que se localizan discurriendo paralelamente a los procesos de amacrinas dopaminérgicas; además se señala el contacto de un proceso de célula melanopsínica con el soma de una AD. La inmunofluorescencia emitida por la excitación de Cy3 representa la presencia de melanopsina. En color azul se señalan las células AD. La barra de escala representa 50 μm B- Células bipolares de bastón marcadas con anticuerpos anti-PKC (Cy3, rojo) y CG melanopsínicas (Cy2, verde). En el recuadro, imagen ampliada de una confluencia en la señal de PKC y melanopsina.

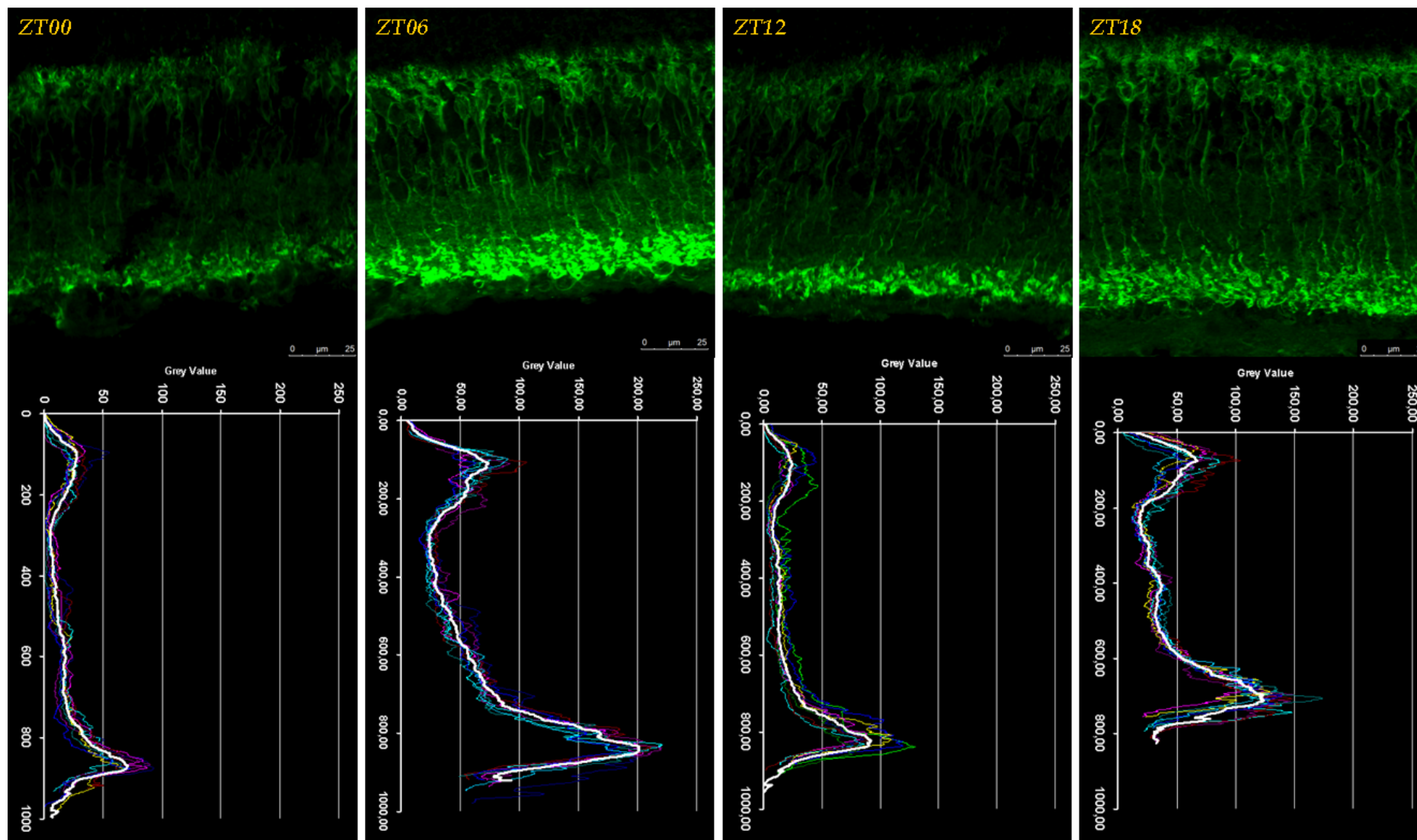


Lámina 7. Expresión de PKC en células bipolares de ratones C57BL6J. Imágenes de secciones sagitales de retina de ratón control marcada con anticuerpos anti-PKC α en los tiempos ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. Se muestra una foto representativa (n=8) para cada ZT. El nivel de expresión de la proteína difiere entre los distintos tiempos. Se puede observar diferencias entre soma y terminal axónico dentro de cada tiempo. Las gráficas mostradas debajo de cada imagen corresponden al análisis cuantitativo del grado de inmunoreactividad en una escala arbitraria de grises (Grey Value) para cada tiempo. En las gráficas aparecen con líneas de colores los análisis individuales de las 8 mediciones realizadas y en trazo más blanco más grueso su valor promediado.

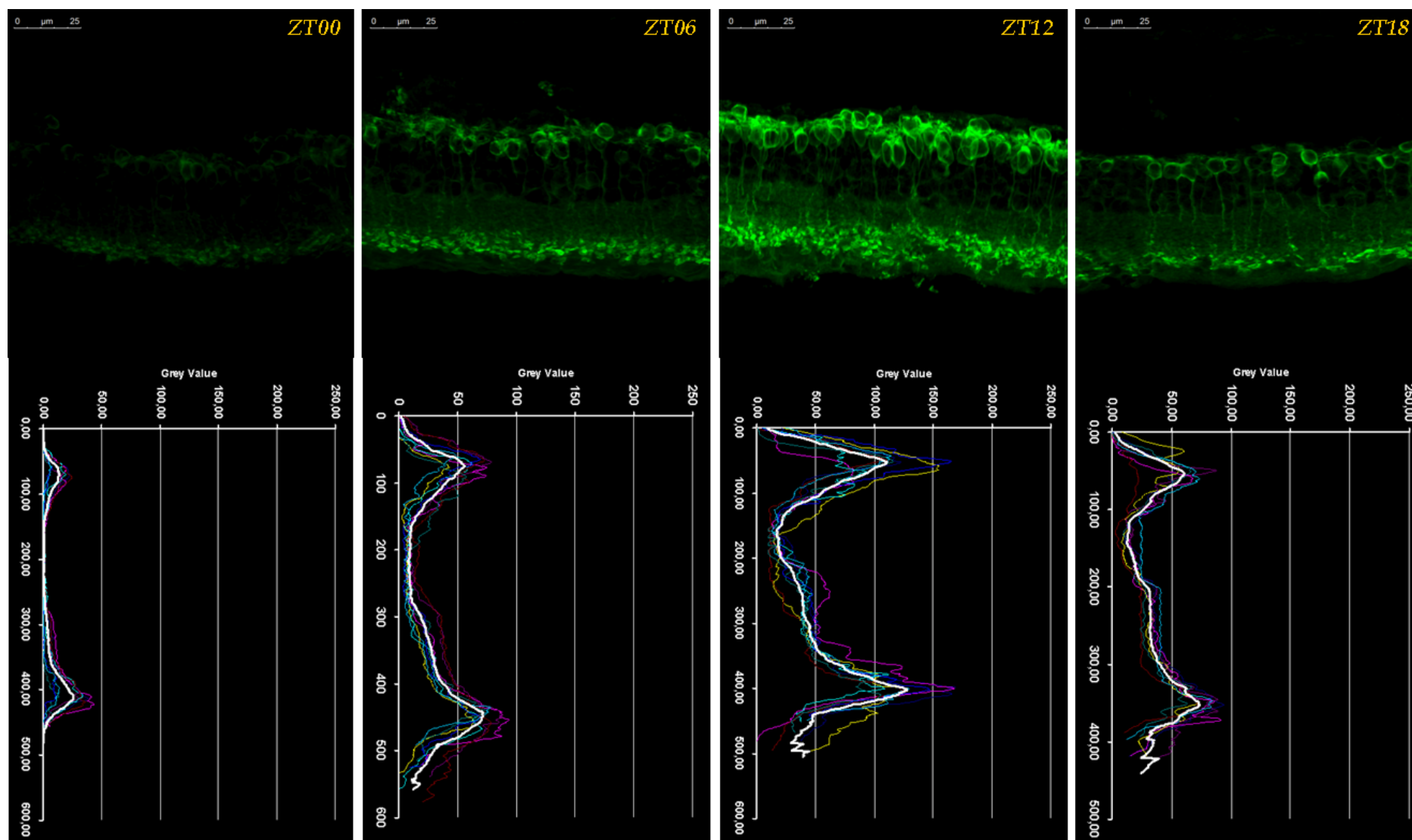


Lámina 8. Expresión de PKC en células bipolares de ratones Rd10. Imágenes de secciones sagitales de retina de ratón Rd10 marcada con anticuerpos anti-PKC α en los tiempos ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. Se muestra una foto representativa (n=8) para cada ZT. El nivel de expresión de la proteína difiere entre los distintos tiempos. Se puede observar diferencias entre soma y terminal axónico dentro de cada tiempo. Las gráficas mostradas debajo de cada imagen corresponden al análisis cuantitativo del grado de inmunoreactividad en una escala arbitraria de grises (Grey Value) para cada tiempo. En las gráficas aparecen con líneas de colores los análisis individuales de las 8 mediciones realizadas y en trazo más blanco más grueso su valor promediado.

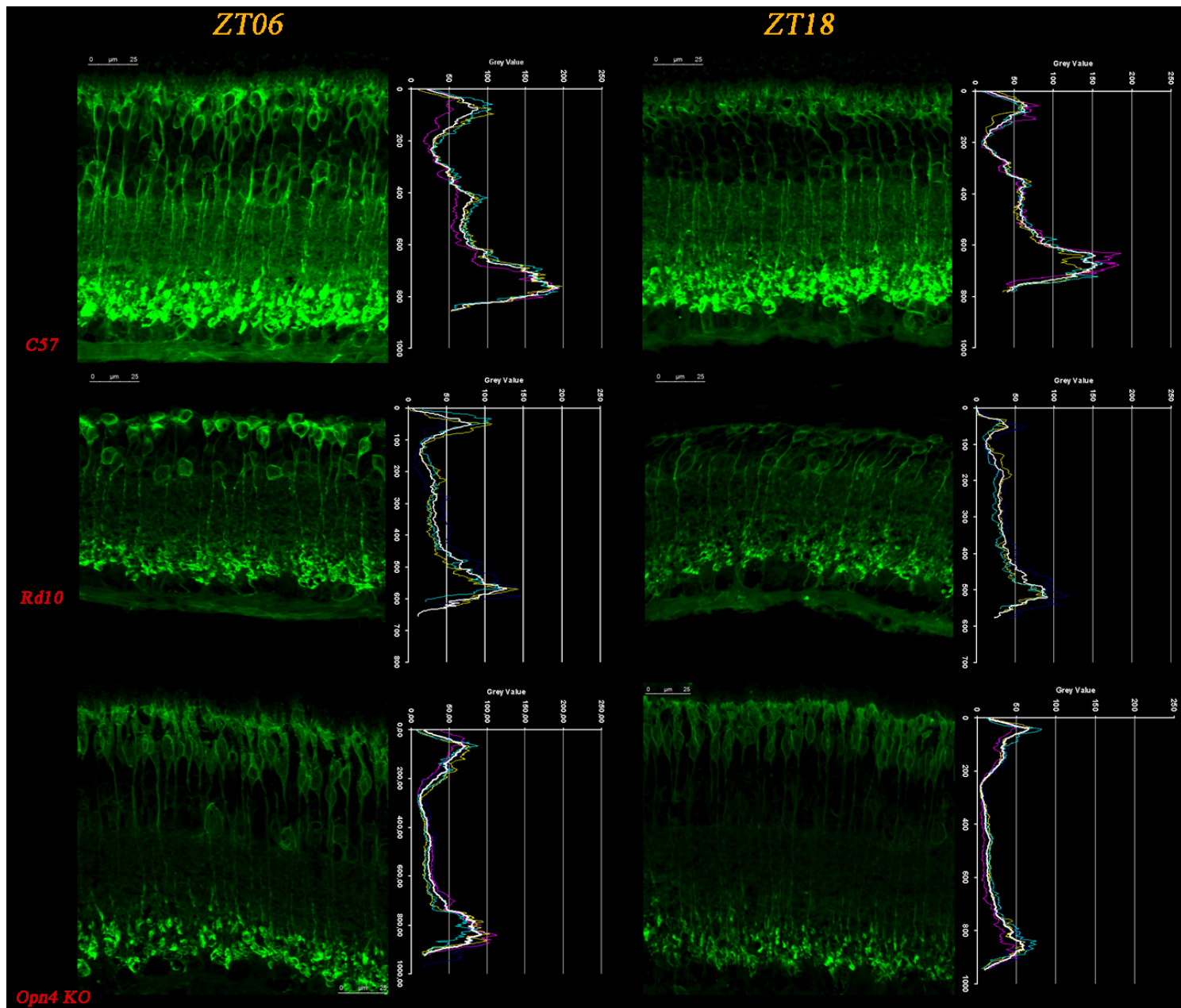


Lámina 9.
 Expresión de PKC en células bipolares de animales control (C57), Rd10 y Opn4 KO. Se muestran secciones sagitales de retinas marcadas con Ac anti-PKC α en los tres modelos animales a los tiempos ZT06 y ZT18.

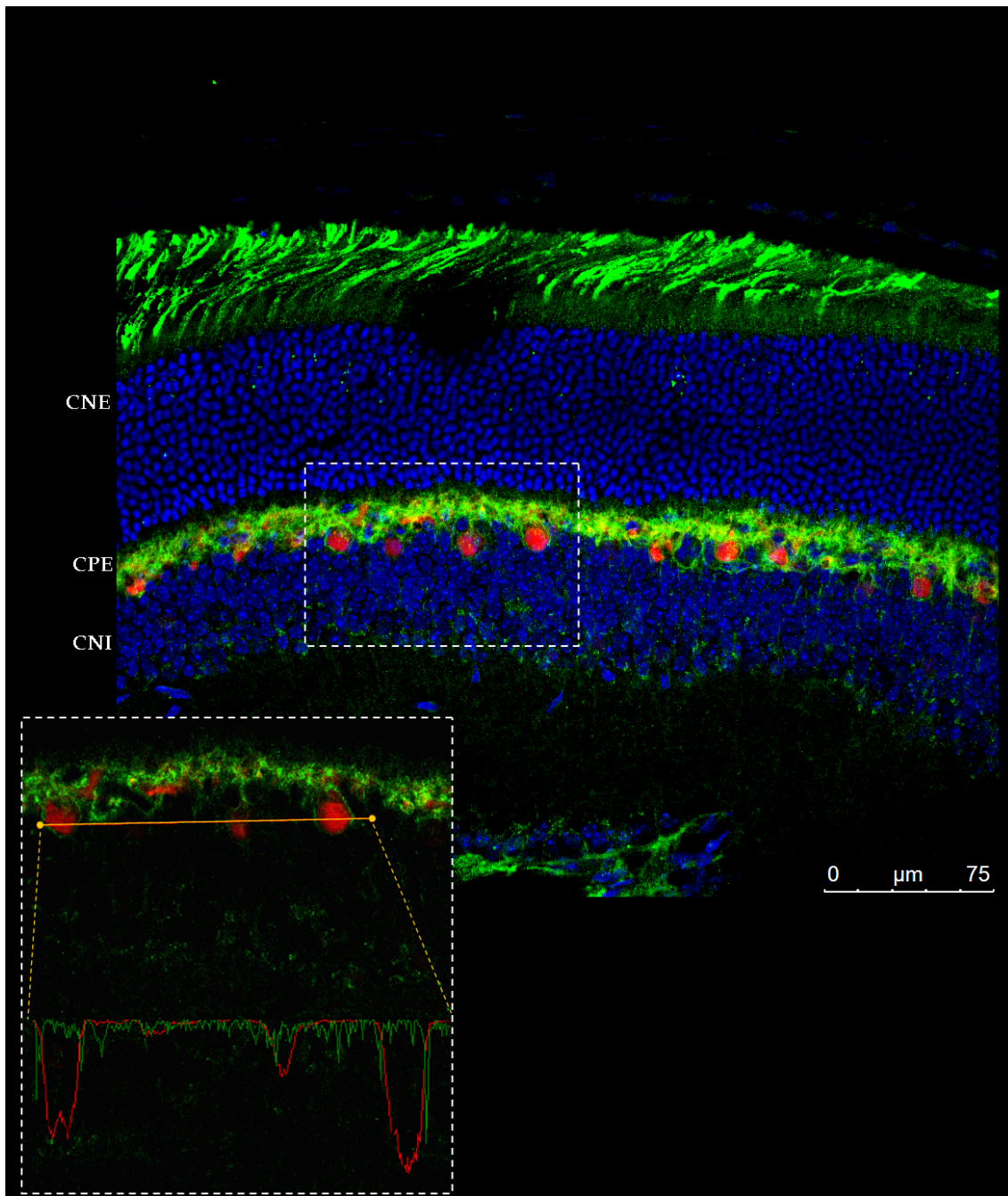


Lámina 10. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en soma de células horizontales.

Sección derretida de ratón control marcada inmunohistoquímicamente con anticuerpos anti-NKCC1 (Cy2, verde) y anti-Calbindina (Cy3, rojo). Los somas de células horizontales, positivas para ambos anticuerpos, se sitúan a nivel de la capa nuclear interna (CNI) y sus procesos se extienden a lo largo de la capa plexiforme externa (CPE). Los núcleos se presentan teñidos con DAPI (en azul). Las dificultades del anticuerpo anti-NKCC1 nos obligaron a realizar experimentos controles de doble tinción con calbindina. Para corroborar que la señal emitida por NKCC1 no se debía a señal cruzada con la señal procedente del marcaje con anti-calbindina se realizó un análisis de intensidad de la fluorescencia con separación de los canales de color. En la imagen inferior se muestra, a más aumentos, el recorrido de la línea extendida sobre las células marcadas, representándose por debajo las curvas correspondientes a la intensidad emitida por la calbindina (línea roja) y NKCC1 (línea verde). Se puede observar la correspondencia de máximas intensidades de rojo con el soma celular y verde con la periferia.

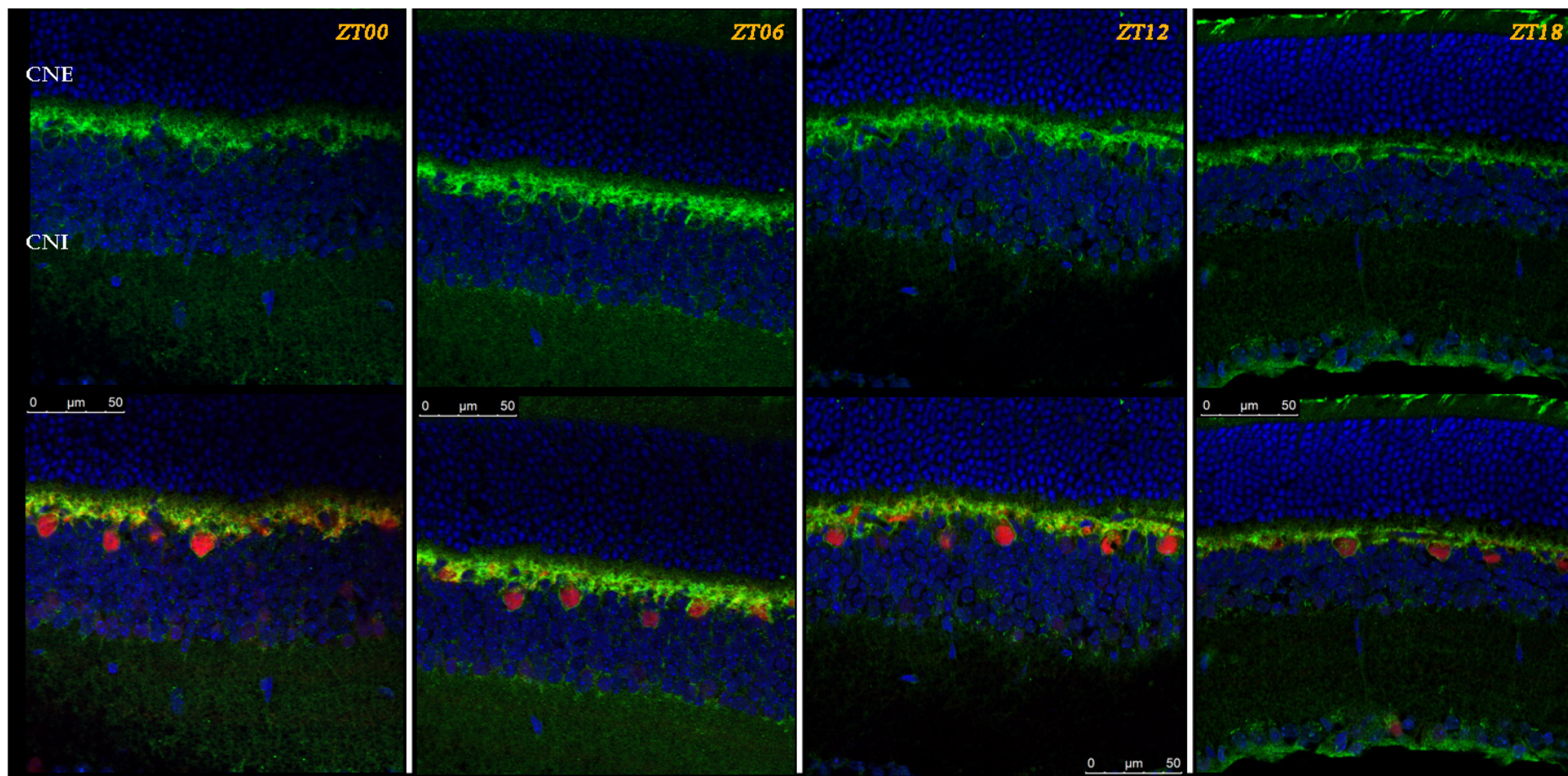


Lámina 11. Expresión de NKCC1 en células horizontales en retina de ratones control. Secciones sagitales de retina de ratón control marcadas inmunocitoquímicamente a los tiempos ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. La expresión del anticuerpo anti-NKCC1 (Cy2, verde) permite observar los procesos de células horizontales y bipolares ON en la capa plexiforme externa (CPI). La región periférica de los somas de las células horizontales también son inmunoreactivos a este anticuerpo. Para reconocer el marcaje positivo sobre los somas de las células horizontales se expusieron las muestras a anti-Calbindina (Cy5, color rojo). Los núcleos resaltan en color azul por la tinción con DAPI.

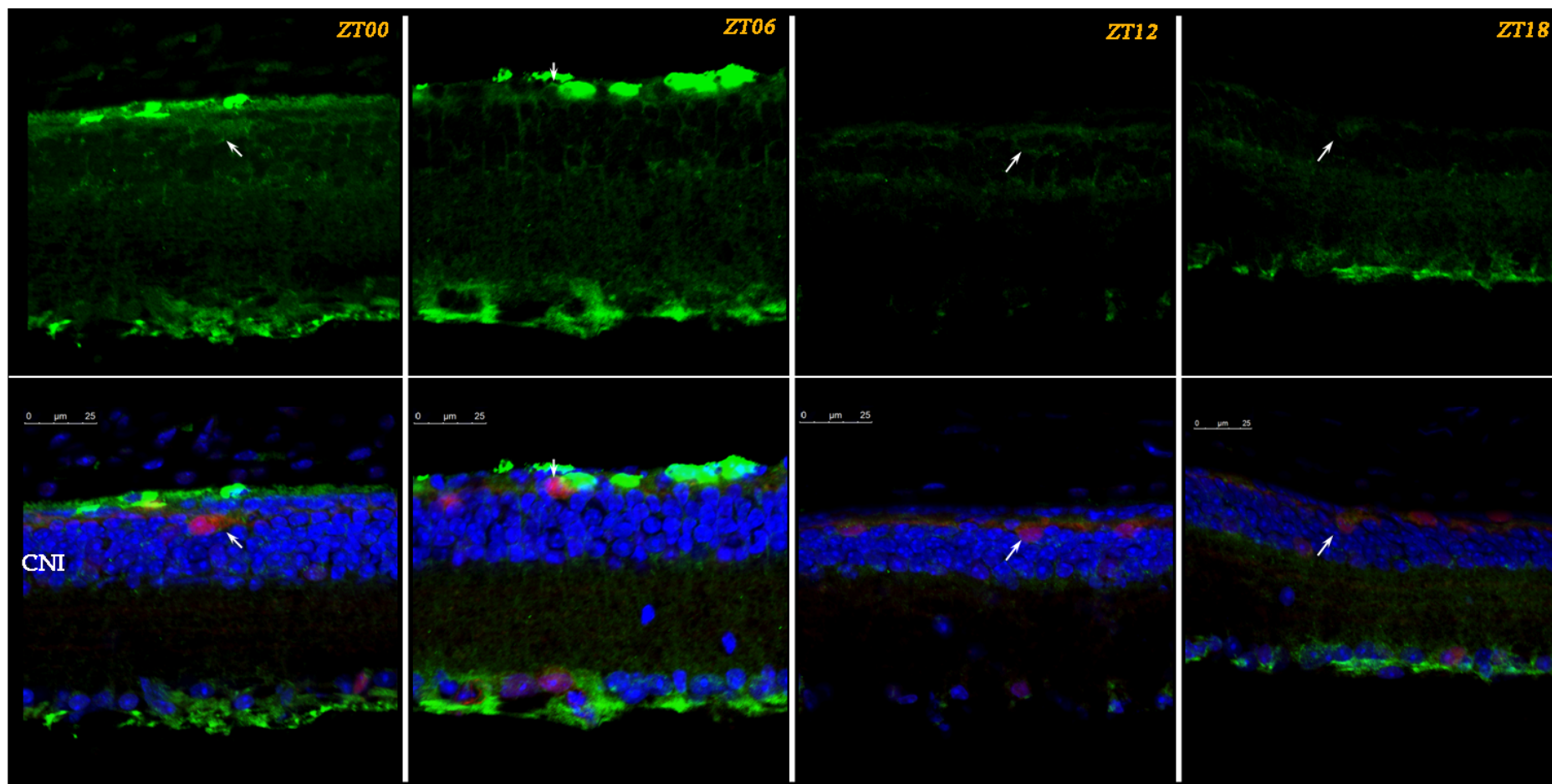


Lámina 12. Expresión de NKCC1 en células horizontales en retina de ratones Rd10. Secciones sagitales de retina de ratón Rd10 marcadas inmunocitoquímicamente a los tiempos ZT00, ZT06, ZT12 y ZT18. La expresión del anticuerpo anti-NKCC1 (Cy2, verde) aparece difusamente a nivel de la capa nuclear interna (CNI). Las flechas señalan el marcaje positivo en soma de células horizontales. Para reconocer las células horizontales se expusieron las muestras a anticuerpos anti-Calbindina (Cy5, rojo). La presencia de calbindina confirma la presencia de células horizontales.

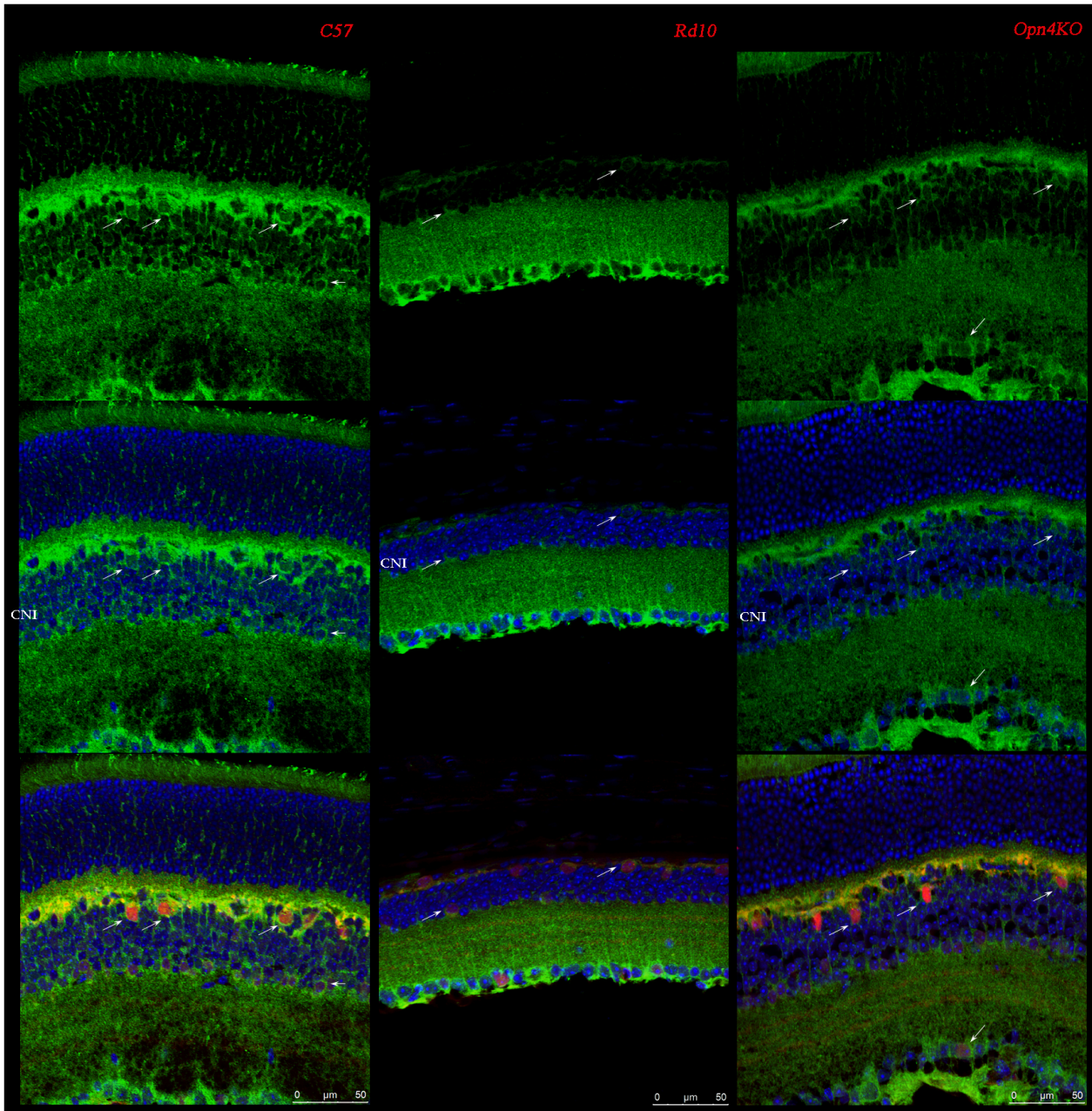


Lámina 13. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en ratones control (C57), Rd10 y Opn4KO.

Secciones sagitales de retina de animales sacrificados a ZT06, marcados inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-NKCC1 (Cy2, verde) y anti-Calbindina (Cy5, rojo). Los parámetros de exposición de las muestras y captura de imágenes en el microscopio confocal fueron tomadas en base a la inmunorreactividad en el modelo Rd10, manteniéndose estables para el resto de fotos. Las flechas blancas indican, para cada caso, la localización de somas celulares positivos a calbindina y de su periferia a NKCC1. El marcaje a nivel de la CPE es más intenso en los animales control y Opn4 KO y prácticamente imperceptible en el ratón Rd10. Se muestra en azul el marcaje nuclear con DAPI.

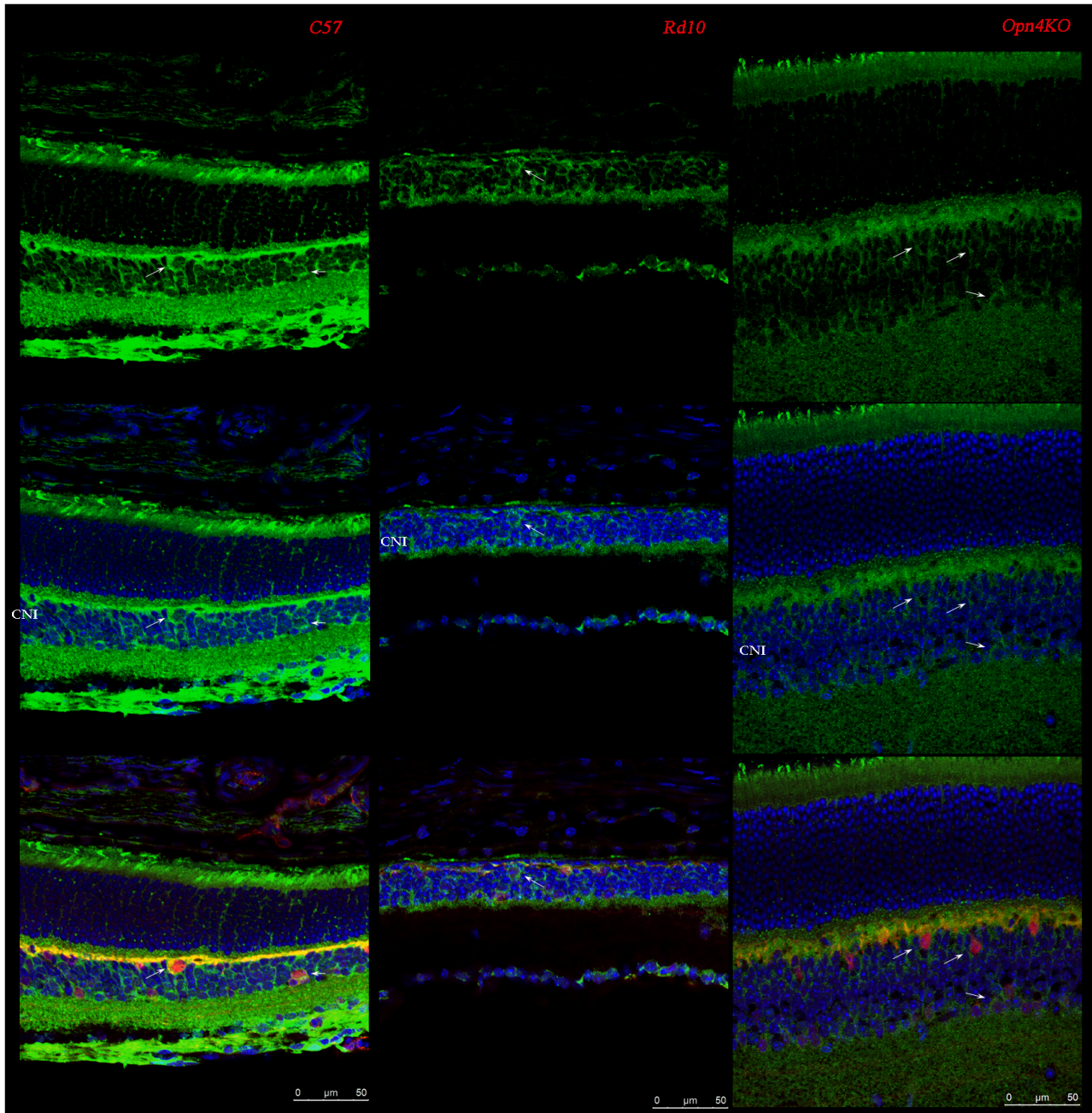


Lámina 14. Colocalización de NKCC1 con Calbindina en ratones control (C57), Rd10 y Opn4KO.

Secciones sagitales de retina de animales sacrificados a ZT18, marcados inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-NKCC1 (Cy2, verde) y anti-Calbindina (Cy5, rojo). Los parámetros de exposición de las muestras y captura de imágenes en el microscopio confocal fueron tomadas en base a la inmunorreactividad en el modelo Rd10, manteniéndose estables para el resto de fotos. Las flechas blancas indican, para cada caso, la localización de somas celulares positivos a calbindina y de su periferia a NKCC1. El marcaje a nivel de la CPE es más intenso en los animales control y Opn4 KO y prácticamente imperceptible en el ratón Rd10. Se muestra en azul el marcaje nuclear con DAPI.

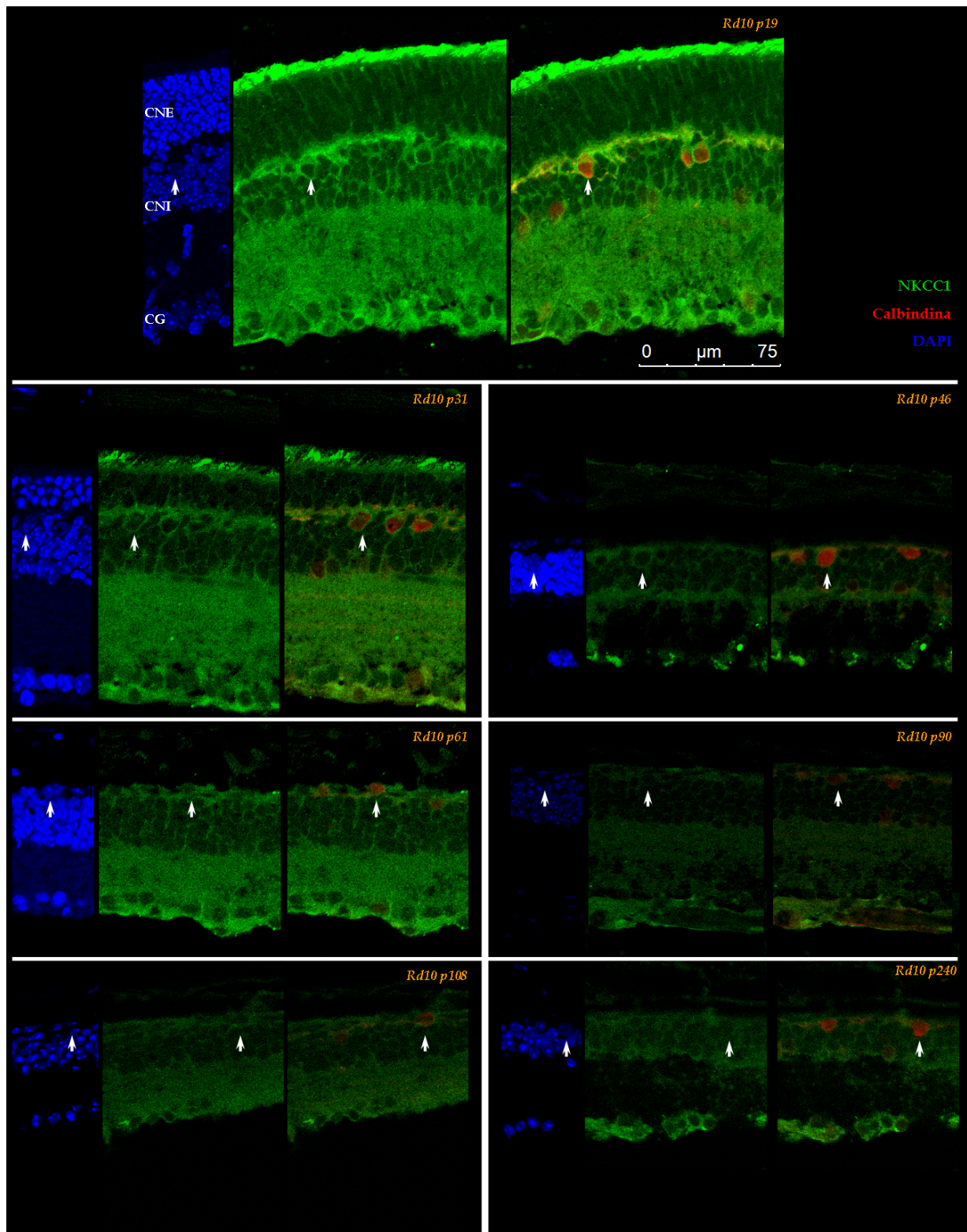


Lámina 15. Expresión de NKCC1 en retinas de Rd10 a diferentes edades del desarrollo postnatal. Secciones de retina periférica de ratones Rd10 de diferentes edades postnatales marcadas inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-NKCC1 (Cy2, verde) y anti-calbindina (Cy3, rojo). La expresión de NKCC1 en células horizontales es distinguible hasta la edad de 46 días postnatales (p19, p31, y p46) no observándose el marcaje con dicho anticuerpo para edades superiores (p61, p90, p108 y p240). La inmunorreactividad a calbindina se mantiene a todas las edades. Las flechas blancas indican un ejemplo de célula horizontal con mayor o menor presencia de inmunorreactividad a NKCC1 para cada edad.



CAPÍTULO 2: Electrorretinografía.

1.1- ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS EN EL ESTUDIO FUNCIONAL FOTÓPICO DE LA RETINA, EN DIFERENTES CONDICIONES LUMÍNICAS DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD.

La inmensa mayoría de los seres vivos presenta como principal regulador de sus ritmos circadianos la luz ambiental, y sabemos que, para que el individuo pueda ajustarse a estos ciclos es perentoria la presencia de células con capacidad fotosensible. Como ya ha sido comentado, existe una cierta diversidad de los modelos dispuestos en la naturaleza para la ubicación de estas células. Si nos centramos en el taxón de los mamíferos, hasta hoy, los ojos complejos son las únicas estructuras definidas como portadoras de células fotosensibles.

La acción de conos y bastones desencadena la respuesta eléctrica de la retina, y esta información sensorial es la encargada de regular los ritmos diurnos desde un aspecto fisiológico y anatómico. La luz, por tanto, es la directora de orquesta en los numerosos procesos que ocurren en el organismo a lo largo del día. Para conocer el momento, el intervalo de tiempo, de activación o inactivación de esos procesos por efecto de la luz utilizamos la terminología descrita en *Materiales y Métodos*. Tomando esa luz como *zeitgeber*, es decir, como elemento externo regulador de los ciclos endógenos, el ciclo luz/oscuridad de 24 horas comenzará en la fracción de tiempo indicada como ZT00 (*zeitgeber time*) con la aparición de la luz; la mitad del día se anotará como ZT06 y el comienzo de la fase de oscuridad como ZT12. Sin embargo, el organismo cuenta con una regulación endógena de los procesos metabólicos y hormonales. Este ciclo endógeno es de aproximadamente 24 horas pero no existe ningún elemento externo regulador que lo ajuste, es el propio organismo el encargado de realizar dichas tareas. Por ello, para acotar el momento de su activación o inactivación no emplearemos la nomenclatura anteriormente descrita sino que utilizaremos las siglas CT (*circadian time*) para designar una hora concreta en este ciclo; siendo CT00 el inicio, CT12 la mitad del mismo, etc...



Podríamos nombrar otros zeitgeber que también pueden realizar una función reguladora en el comportamiento animal; sin embargo, es la luz la que acapara más relevancia por el importante papel que ostenta entre la gran diversidad de seres vivos. A pesar de ello, como tácticas de supervivencia, muchos animales han elegido la ausencia de luz, fase de oscuridad, para comenzar su actividad biológica. A lo largo de la evolución las presas de animales eminentemente carnívoros, han aprendido a sortear los numerosos peligros con la complicidad de la noche. Pero este cambio en el comportamiento no implica siempre un drástico reajuste de sus receptores fotosensibles. Existen mejoras evolutivas en muchos animales de hábitos nocturnos, pero la estructura básica sigue siendo general en cada grupo. El ratón es un animal que presenta estos hábitos nocturnos y para desenvolverse de forma más hábil en esas condiciones ha potenciado de forma notable sus receptores táctiles a nivel de las vibrisas, con respecto a otros mamíferos diurnos. Pero, aparte de eso, en la retina se mantiene la estructura global de todos los mamíferos.

En la obtención de los resultados, que se muestran a continuación, la realización de experimentos en momentos concretos de su ciclo luz/oscuridad podían seguir o no las condiciones lumínicas naturales. De esta manera, las fracciones de tiempo en las que se realiza el experimento se denominan como ZT, si mantienen las condiciones lumínicas que corresponden a ese momento del ciclo, o como CT si no lo hacen. Véase el esquema explicativo de la **Figura 48**.

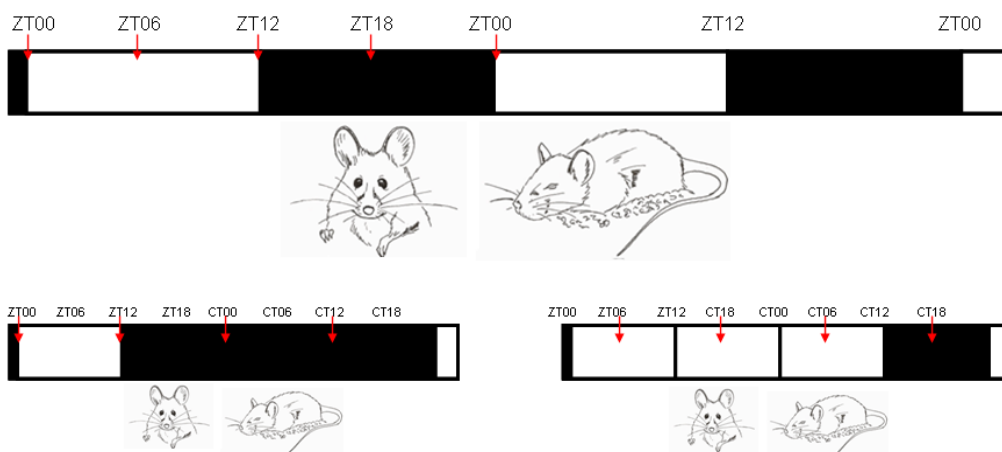


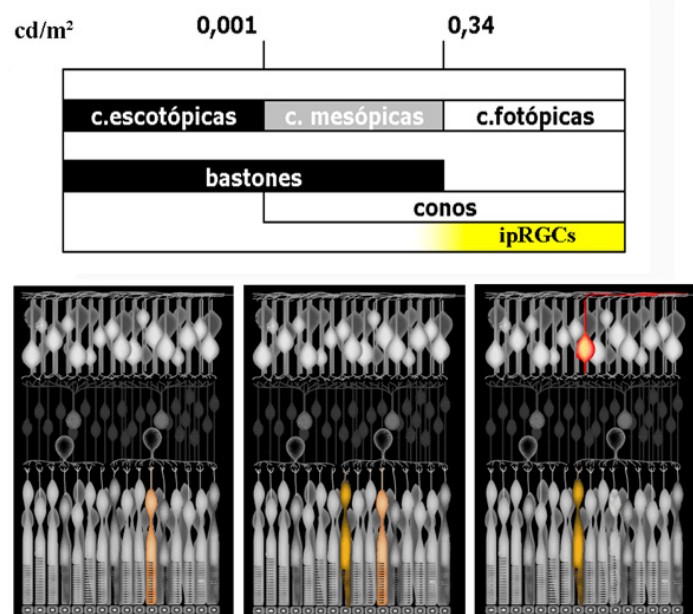
Fig48.
Nomenclatura en el ciclo diurno de 24 horas.
ZT sincronía de la actividad con el medio externo y CT falta de la misma.



La importancia de la presencia de ambas células fotosensibles, conos y bastones, viene determinada por su sensibilidad ante estímulos luminosos. Ya hemos analizado el papel principal de los bastones en situaciones con incidencia de intensidad ínfima de luz, o condiciones *escotópicas*; además de la absoluta necesidad de los conos para una correcta agudeza visual durante la visión diurna (véase *Introducción*). Los conos requieren de mayor intensidad lumínica para ser estimulados, estas condiciones se denominan *fotópicas*. En el intervalo entre ambas condiciones lumínicas, se definen las condiciones *mesópicas* o de intensidad media. La intensidad luminosa es una característica de la fuente de radiación y viene dada por el flujo luminoso emitido por unidad de ángulo sólido, en una dirección específica. El Sistema Internacional de Unidades incorporó la candela para definir dicha intensidad. Por tanto, podemos indicar la intensidad de una fuente de luz sobre un área determinada como candelas por m^2 (cd/m^2).

En poco más de 10 años se han venido sucediendo diversas investigaciones para conocer y entender el papel del tercer tipo de célula fotosensible descrito en la retina de mamíferos, además de otras ubicaciones en otros grupos animales. Estas células fueron determinadas como células ganglionares, así, son denominadas células ganglionares intrínsecamente fotosensible (ipRGCs) se convirtieron en la primera célula fotosensible de la retina interna. En la **Figura 49** se pretende relacionar, esquemáticamente, los tipos de células fotoestimulables con las distintas condiciones lumínicas.

Fig98. Condiciones lumínicas y tipos de células fotosensibles. Si la intensidad del estímulo luminoso es muy baja, las células con capacidad de excitación son los bastones. En condiciones mesópicas, los conos realizan la fototransducción y los bastones pueden seguir estimulados. En escenarios de muy alta intensidad lumínica podremos contar con conos e ipRGCs. Modificado Forns, 2008 y www.acodea.org.





Registro electroretinográfico estándar.

Al registrar la actividad de la retina, las condiciones lumínicas ambientales y la intensidad del estímulo luminoso aplicado determinarán el tipo de respuesta a analizar. En la **Figura 50** se representan las respuestas electroretinográficas obtenidas ante una batería de estímulos a diferentes intensidades. Estas son las respuestas de un animal control de aproximadamente 35 días postnatales ($\sim p35$). En el caso de realizarse el registro del animal en condiciones escotópicas, las respuestas las podemos obtener empleando las dos fuentes de aplicación de estímulo descritas en *Materiales y Métodos*, la Campana de Gandzfeld o el LED. Estos registros se corresponden con la actividad desencadenada por la vía de los bastones. Para los estímulos de más baja intensidad se utiliza la campana, y obtenemos las ondas presentadas en la columna izquierda de la figura 50. La **onda b** ofrece una mayor amplitud a medida que la intensidad del estímulo aumenta progresivamente. Para una intensidad de $0.01 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ($-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) se puede observar la respuesta escotópica máxima. Cuando las condiciones pasan de escotópicas a mesópicas, hemos de tener en cuenta la participación de los conos a la respuesta registrada. Para alcanzar la intensidad necesaria para que esa respuesta sea mixta hemos empleado el LED como fuente de iluminación. La aparición de la **onda a** se inicia ante estímulos de aproximadamente $-1 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Para una intensidad de $30 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ($\sim 1,5 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) se registra la respuesta mixta máxima, o registro para el que la **onda b** alcanzan valores máximos. La columna central de la figura 50 muestra dichos registros.

Sin embargo, el desarrollo de los protocolos, empleados en el estudio electroretinográfico de la presente Tesis Doctoral, se basan en el análisis de la respuesta fotópica. En la misma figura, en la columna derecha, se muestran las respuestas registradas de la retina del ratón control adaptado a la luz. La **onda b fotópica** también aumenta gradualmente en amplitud a medida que incrementamos la intensidad del estímulo. Para conseguir una perfecta adecuación del animal a la luz, el animal fue sometido a una luz de fondo de $\sim 200 \text{ cd}/\text{m}^2$ de intensidad. Tras el blanqueo de los bastones, por la acción de esa luz de fondo, se observan todos los registros de conos cuya máxima respuesta se obtiene a una intensidad de $\sim 2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$.

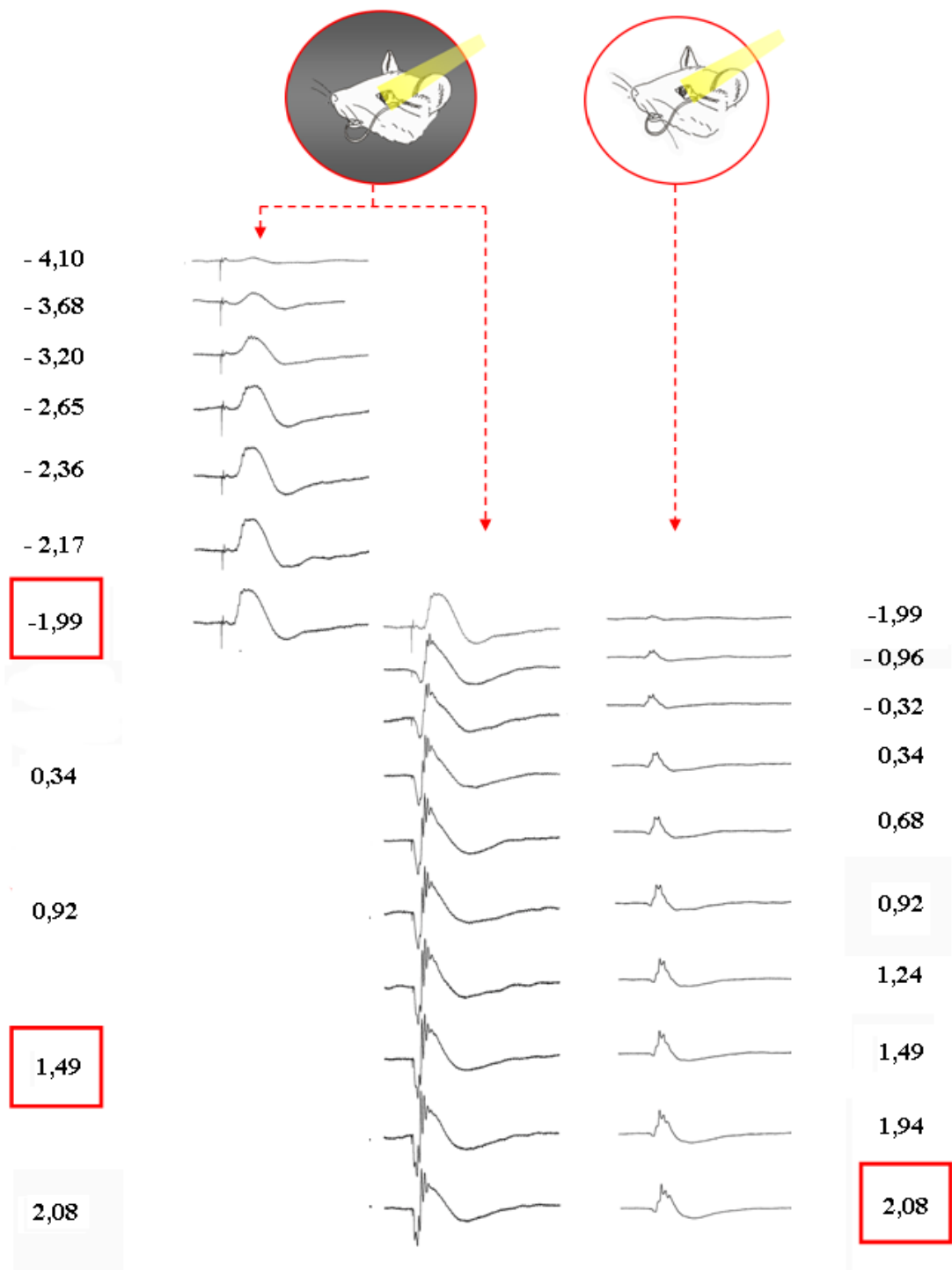


Fig50. Esquema de las respuestas electroretinográficas ante estímulos de intensidad creciente. Mediante la técnica de ERG aplicamos un estímulo luminoso para la obtención de respuestas funcionales de la retina. Círculo con fondo negro: Registro en condiciones escotópicas y respuestas de bastones (columna izquierda); con el mismo escenario podremos observar respuestas mixtas por el aumento en la intensidad del estímulo (columna central). Círculo con fondo blanco: Registro en condiciones fotópicas a diferentes intensidades de estímulo (columna derecha). Los valores numéricos de intensidad se exponen en $\log cd \cdot s \cdot m^{-2}$ a derecha e izquierda de los registros.



Todos esos registros son analizados midiendo la amplitud máxima de cada onda. Los datos son enfrentados a las intensidades de estímulo empleadas, obteniéndose la curva intensidad/respuesta. En la **Figura 51** se representan las amplitudes de las ondas de los registros electroretinográficos obtenidos en condiciones fotópicas y escotópicas.

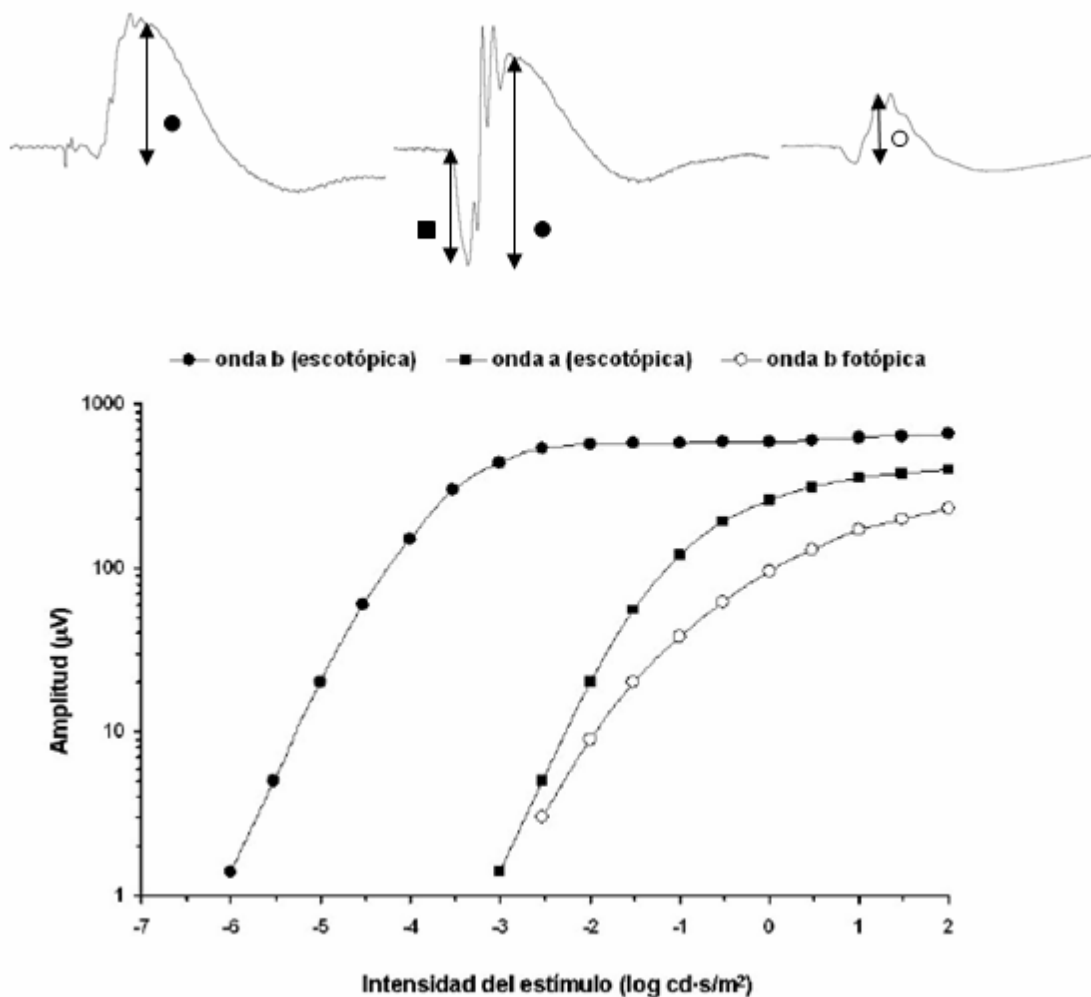


Fig51. Representación gráfica del análisis de las amplitudes. Los registros mostrados en la parte superior de la gráfica corresponden, de izquierda a derecha a la respuesta de bastones, al registro de la respuesta mixta y a la respuesta de conos. Las amplitudes de las ondas son tomadas para las diferentes intensidades de estímulo aplicadas. La gráfica presenta las 3 curvas obtenidas de enfrentar la amplitud medida tras estimular con una intensidad determinada. La *onda b* escotópica comienza registrándose a valores de intensidad muy bajos por la acción de los bastones y se puede seguir analizando a intensidad mucho mayores por el concurso de los conos. Modificado de Barhoum, 2006.



1.1.1. Registro en condiciones lumínicas naturales.

Se realizó el registro electroretinográfico de la actividad de los conos para dos grupos de ratones C57BL/6J (sanos) en dos escenarios distintos, el correspondiente al registro en su fase de luz (ZT08) y el correspondiente al mismo en su fase de oscuridad (ZT20).

El primer grupo fue registrado en tiempo ZT08, es decir, ocho horas después del inicio de la fase luz. Los resultados de este grupo son los correspondientes al registro fotópico de un grupo de ratones en su fase de luz del ciclo día/noche. A todos los animales del grupo se les aplicó una luz de fondo durante un tiempo de 5 minutos, para la adecuación a las condiciones fotópicas. Los ondas registradas para cada intensidad en cada uno de los miembros del grupo, $n=8$, fue promediada y las respuestas de todas las ondas fueron representadas en la curva intensidad/respuesta. La curva de la gráfica presenta un comportamiento ascendente debido a que, como decíamos antes, la amplitud de la onda aumenta a la par que la intensidad de estímulo (**Figura 52**).

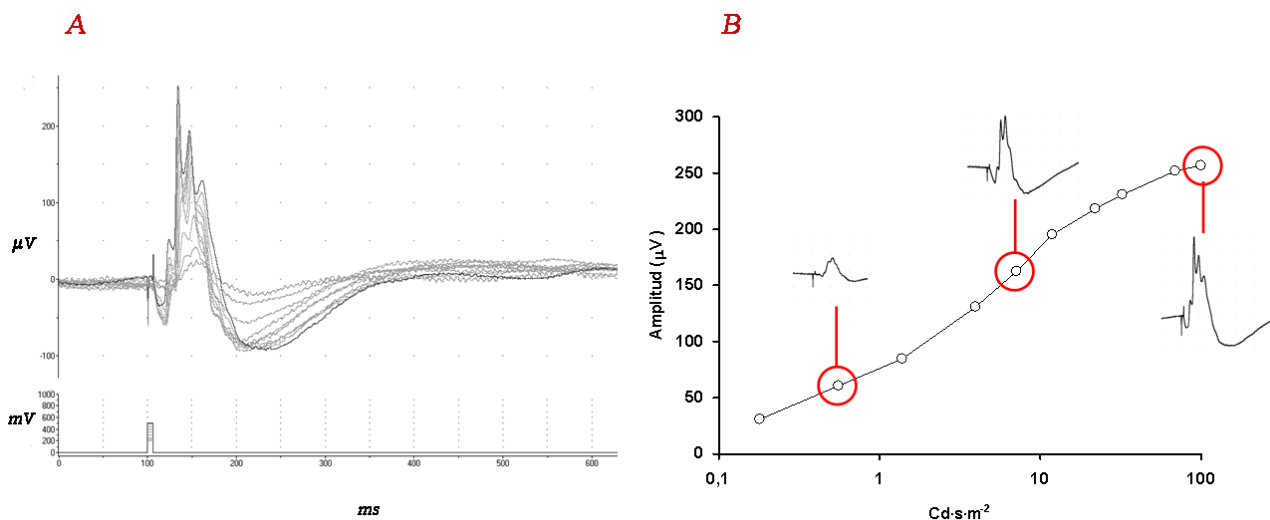


Fig52. Respuestas electroretinográficas fotópicas ante estímulos de intensidad creciente. A- Se muestran de forma superpuesta las ondas generadas en condiciones fotópicas ante estímulos de intensidad creciente, registradas en una animal control. El tiempo de estimulación se representa en la línea inferior. B- las amplitudes de las ondas se representan en la gráfica Intensidad/Respuesta (I/R). Señalamos tres ejemplos de ondas dentro de la curva, con el fin de indicar como va variando la morfología de dicha onda y como corresponde a un punto más alto en la curva al presentar mayor amplitud.



Para la obtención de las respuestas fotópicas en los animales que aún se encuentran en su fase de oscuridad, se aplicó el mismo protocolo (con los 5 minutos de adecuación a las condiciones fotópicas) a un grupo de ratones, $n=8$, a las 8 horas de comenzar su noche (ZT20). De la misma manera que en el grupo anterior, se midió la amplitud máxima de la *onda b* para cada estímulo. La representación de estas medidas muestra una curva intensidad/respuesta con un progreso igualmente ascendente.

Al comparar los resultados electroretinográficos de ambos grupos, se observa una clara diferencia en la amplitud de las ondas registradas, ante todo a las intensidades de estímulo más altas (**Figura 53**). La curva representativa del grupo ZT08 presenta valores mayores de amplitud que la curva del grupo ZT20. La actividad funcional de la retina es significativamente diferente entre ambos grupos para la excitación de la vía de los conos.

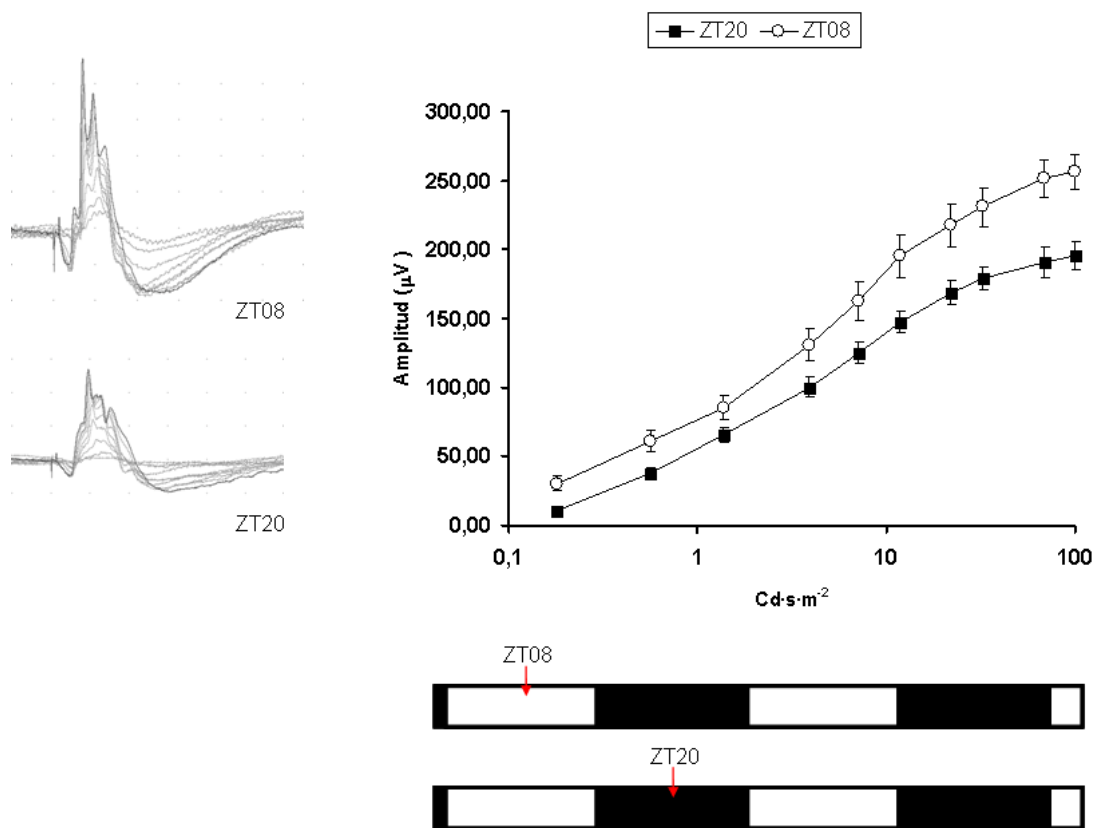


Fig53. Resultados del análisis electroretinográfico a tiempos ZT08 y ZT20. Un ejemplo de las ondas para cada grupo se muestran superpuestas a la izquierda del gráfico. Las curvas resultantes del análisis de las amplitudes son diferentes entre los dos ZT. Se muestra bajo la gráfica el esquema del momento de registro en cada grupo.



1.1.2. Registro en condiciones lumínicas subjetivas.

La diferencia en amplitudes ante grupos obtenidos en momentos distintos del ciclo luz/oscuridad (24 horas), parece indicar un papel importante de las condiciones lumínicas ambientales para la magnitud de las respuestas. Para conocer si esto es debido a la influencia del ambiente se realizaron los registros de dos nuevos grupos.

Estos grupos mantienen el tiempo circadiano en el que se realiza el registro pero cambian las condiciones lumínicas. Así el primer grupo, $n=8$, fue registrado a ocho horas de comenzar su fase de luz, pero sin que esta luz hubiese sido encendida. Denominamos a este nuevo grupo CT08. Tras preparar al animal en oscuridad, para la obtención de las respuestas, se aplicaron los 5 minutos de adecuación fotópica con la luz de fondo. El siguiente grupo, también con una n de 8, comprendía animales registrados a las ocho horas de comenzar su noche circadiana pero con la presencia de luz. El grupo se etiquetó con las siglas CT20.

El análisis de los datos de estos grupos muestra como, aquella curva correspondiente al grupo CT08 presenta unas respuestas, para cada estímulo, menores que la susodicha para el grupo CT20. Comparando las curvas de ZT08, ZT20, CT08 y CT20 se observa la existencia de dos grupos configurados por la semejanza de la luminosidad ambiental recibida, y no por la fase de su ritmo circadiano en que fue realizado el registro (**Figura 54**).

Las diferencias existentes entre las amplitudes máximas de los cuatro grupos, para una intensidad máxima de estímulo fueron analizadas realizando un test *t de Student* para datos desapareados con la corrección de *Welch*. Las diferencias estadísticas del grupo ZT08 con el grupo ZT20 fueron consideradas en el test como muy significativas. Para la comparación de los grupos CT08 y CT20 el resultado fue significativo. El grupo ZT08 también fue analizado enfrentado con CT08 y el análisis destacó, al igual que la comparación entre ZT20 y CT20, diferencias estadísticamente muy significativas. Para la estadística entre los grupos que comparten las mismas condiciones lumínicas las diferencias estadísticas fueron no significativas, tanto para ZT08vsCT20 como para CT08vsZT20.

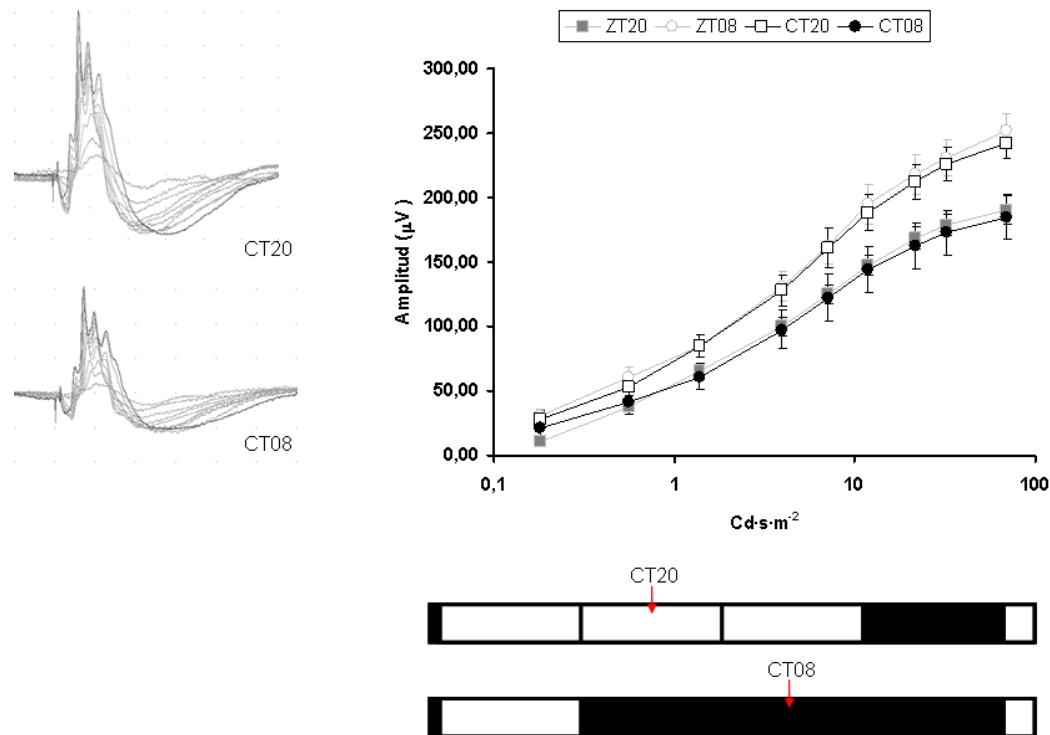


Fig54. Resultados del análisis electroretinográfico a tiempos CT08 y CT20. Un ejemplo de las ondas para cada grupo se muestran superpuestas a la izquierda del gráfico. Las curvas resultantes del análisis de las amplitudes son diferentes entre los dos CT. La gráfica muestra los resultados correspondientes a los análisis realizados a CT08 y CT20 de forma superpuesta a los de los grupos ZT08 y ZT20. Se muestra bajo la gráfica el esquema del momento de registro en los grupos CT08 y CT20.

La **Figura 55** muestra, en forma de histograma de barras, la amplitud de la onda b fotópica para la intensidad de estímulo de $\sim 100 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. La relación entre todos los grupos fue analizada bajo un test de *ANOVA de una vía*, seleccionando como post-test la comparación de *Bonferroni*. El **p valor** fue inferior a 0,01 considerándose las diferencias muy significativas.

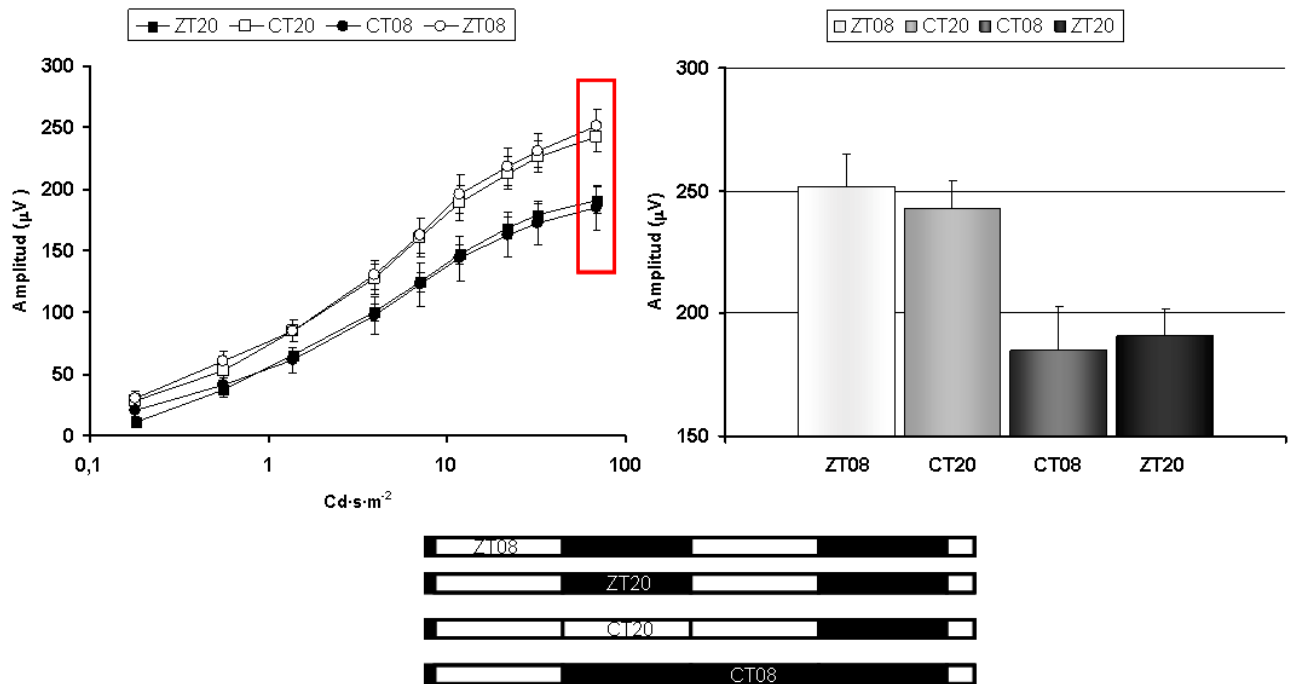


Fig55. Análisis comparativo de las respuestas de los cuatro grupos experimentales. Sobre la gráfica I/R de la figura se señala con un recuadro rojo los datos sometidos a análisis estadístico. El histograma de barras muestra la similitud de valores de los grupos sometidos a las mismas condiciones lumínicas que presentaba el ciclo del animal en el momento del registro. Se muestra bajo la gráfica el esquema del momento de registro en los grupos ZT08, ZT20, CT20 y CT08.

Las células ganglionares fotosensibles (ipRGCs) presentan una serie de importantes diferencias con los fotorreceptores “clásicos”, entre ellas destacamos la menor sensibilidad que posee en contraposición a conos y bastones (Hattar et al, 2002; Lucas et al, 2003; Panda et al, 2003). Esta menor sensibilidad implica la necesidad de mayor intensidad en la luz incidente para su excitación. Estudios de actividad circadiana (AC) realizados por la Dra Forns (Forns, 2008), señalan la participación de las ipRGC en el mantenimiento de la actividad motora en ratones ciegos (Rd10) hasta intensidades lumínicas en la fase de luz de $\sim 300 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$, perdiéndose cuando la intensidad de esa fase de luz disminuía a valores de $30 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$. Cabe ahora preguntarse si la activación de las ipRGCs, es responsable de las diferencias observadas en los cuatro grupos estudiados.

1.1.3. Registros en condiciones lumínicas naturales, con cambios en la intensidad de la luz expuesta.

Los valores de intensidad necesaria para la activación de las ipRGCs es un punto que aún ofrece discusión. Nos centramos en los trabajos de la Tesis Doctoral de la Dra. N. Forns para determinar la intensidad de la luz del día a la cual las células portadoras de melanopsina no están estimuladas. Así, en los nuevos experimentos los animales fueron sometidos a un ciclo día/noche cuya fase de luz se mantenía a una intensidad de $5-10 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$. Con esa intensidad de luz aseguramos la participación de los conos sin la influencia de las “noveles” ipRGCs. De igual manera a los grupos ya presentados, realizamos los registros de los grupos en su día con luz (ZT08'), su noche con oscuridad (ZT20), su día con oscuridad (CT08) y su noche con luz (CT20'); con una iluminación tenue en todas las fases de luz (**Figura 56**).

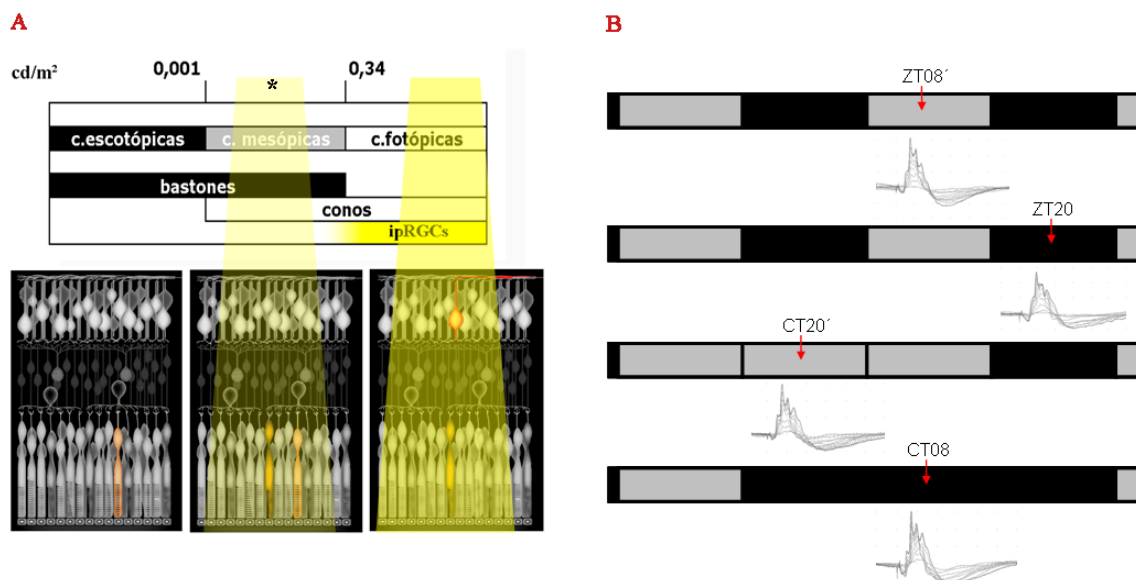


Fig56. Resultados del análisis electroretinográfico a tiempos ZT08', ZT20, CT20' y CT08 con fase de luz de baja intensidad lumínica. A- Esquema de las diferentes condiciones lumínicas y las células fotosensibles con capacidad de llevar a cabo la fototransducción. Con un asterisco (*) representación de la intensidad de la luz empleada en esta nueva serie experimental. B- Esquema de los cuatro escenarios con un ejemplo de las repuestas registradas. La intensidad lumínica a la que los animales fueron mantenidos en sus jaulas, corresponde a la representada con el asterisco en el apartado A. Los grupos que serán registrados en la fase de luz (ZT08' y CT20') presentan una intensidad de la luz ambiental, luz en la estabulación, insuficiente para la estimulación de las ipRGCs. Esta nueva condición lumínica no afecta a las respuestas obtenidas en ZT20 y CT08 ya que son animales registrados en su fase de oscuridad.



Las medias de las magnitudes obtenidas para cada intensidad, dentro de cada grupo, se representan en la gráfica intensidad/respuesta. Estas curvas se disponen, en este caso, sin escisión en grupos; la curva correspondiente a cada grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los otros (**Figura 57**). Como en el apartado anterior, se representa el histograma de barras de la respuesta ante estímulos de máxima intensidad. La estadística fue realizada de la misma manera que en el experimento anterior; para la comparación entre grupos se empleó la *t de Student* con la corrección de *Welch* y para la comparación de todos ellos el Análisis de la Varianza (*ANOVA una vía*) con el *post-test de Bonferroni*. Para todos los análisis las diferencias estadísticas fueron no significativas.

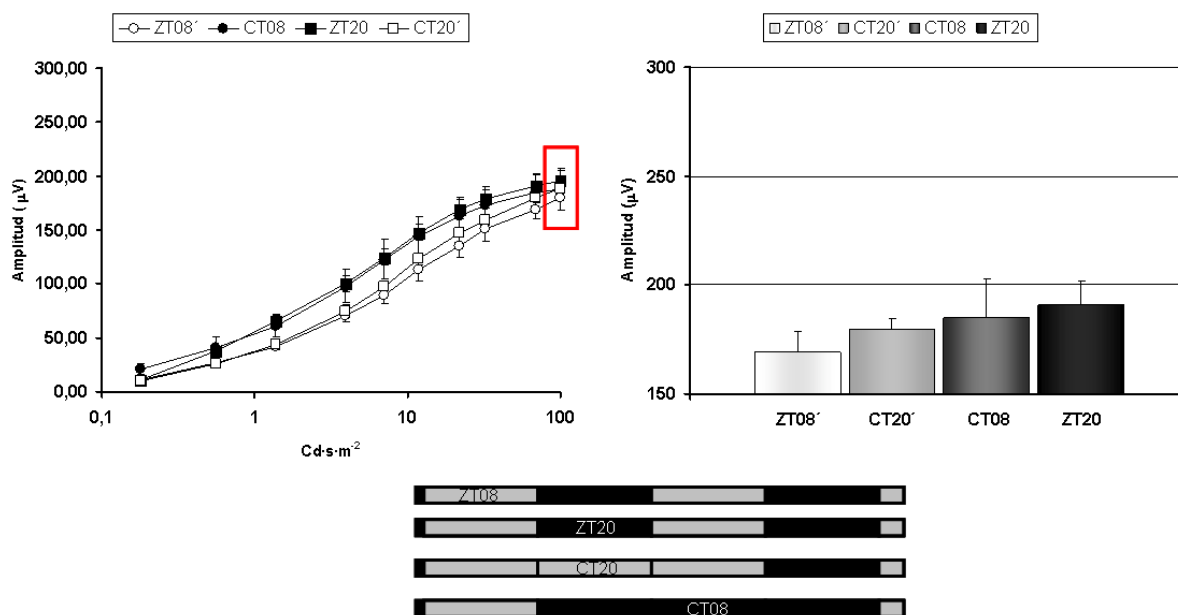


Fig57. Análisis comparativo de las respuestas de los cuatro grupos experimentales. Sobre la gráfica I/R se señala con un recuadro rojo los datos sometidos a análisis estadístico. El histograma de barras no muestra diferencias entre los valores analizados. Se muestra bajo la gráfica el esquema del momento de registro en los grupos ZT08, ZT20, CT20 y CT08.



Con los datos expuestos podemos decir que la respuesta electroretinográfica de la retina se ve modificada en función de la actuación de las ipRGCs (**Figura 58**). Las diferencias estadísticas existentes entre los mismos grupos ZT08, desacordes únicamente en la intensidad de la luz ambiental, son consideradas altamente significativas. Para el valor de $\sim 100 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$, las barras muestran esa gran diferencia entre ZT08 y ZT08', mientras que éste último presenta diferencias no significativas con ZT20.

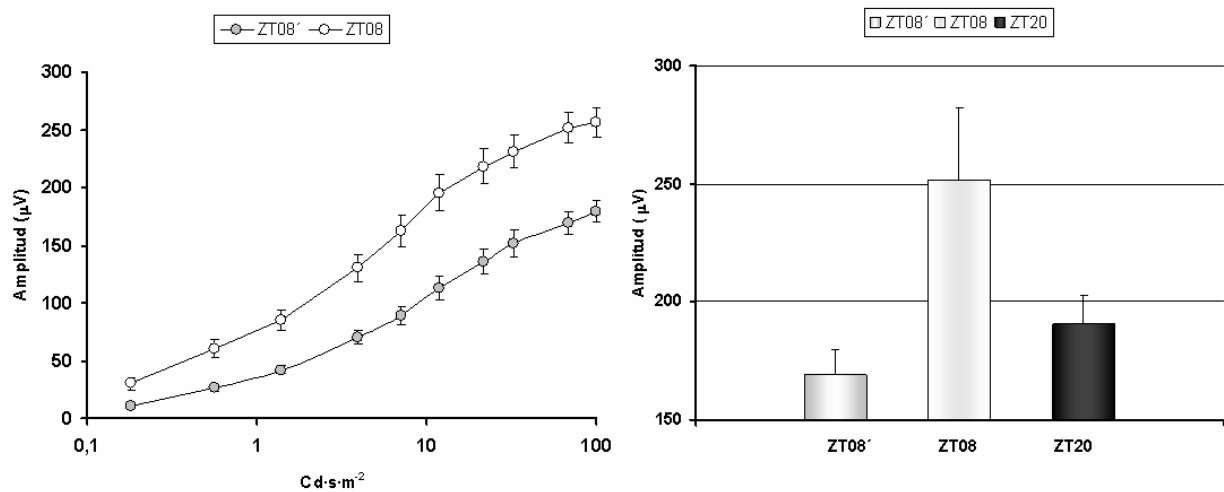


Fig58. Análisis comparativo de los resultados obtenidos. A la izquierda de la figura se muestra la representación gráfica I/R. En ella se comparan las curvas obtenidas del análisis de los registros electroretinográficos para los grupos ZT08 y ZT08'. Ambos grupos presentan respuestas a un registro funcional de la retina realizado en la fase de luz. La diferencia entre ellos reside en la intensidad lumínica a la que el animal era acondicionado en su estabulación, $\sim 300 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$ para ZT08 y $\sim 10 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$ para ZT08'. A la derecha se muestran, mediante histogramas, las diferencias en la amplitud de la respuesta para un estímulo concreto ($\sim 100 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) en los grupos ZT08, ZT08' y ZT20.



1.2- ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS ANTE UN ESTÍMULO BREVE E INTENSO, CON DIFERENCIAS EN LAS CONDICIONES LUMÍNICAS DE INICIO Y FIN DE CADA EXPERIMENTO.

En relación a los resultados anteriores, que demuestran que las células portadoras de melanopsina modulan la actividad eléctrica de la retina, la pregunta inmediata ha de hacerse en base al mecanismo por el cuál éstas podrían desencadenar dicho efecto. Podemos plantear un papel directo de las ipRGCs en este proceso; sin embargo, las interacciones que presentan con otros tipos celulares nos indican la posibilidad de que pueda existir un *modus operandi* indirecto.

La confirmada existencia de sinápsis entre ipRGCs y un tipo de células amacrinas (Amacrinas Dopaminérgicas, AD) (Belenky et al, 2003; Østergaard et al, 2007) y la reciente demostrada capacidad de proporcionar excitación de las primeras a las segundas (Zhang et al, 2008), presentan como un firme candidato, en esa acción indirecta de las ipRGCs, al neurotransmisor Dopamina. La dopamina es sintetizada y liberada por las AD, y tiene un demostrado papel en los ciclos circadianos (Nir et al, 2000). Existe, pues, la posibilidad de que las señalizaciones iniciadas en estos nuevos pigmentos afecten a la funcionalidad del sistema de la dopamina en la retina (Witkovsky, 2004).

Como ya sabemos, las ipRGCs necesitan de una elevada intensidad de luz (mínimo 100-300 $\text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$) para ser estimuladas y las consecuencias de esta activación son diversas acciones a nivel de procesos no visuales. Sin embargo, hemos comprobado, a través del electroretinograma, cómo estas células actúan también modulando la sensibilidad retiniana en condiciones fotópicas.

Utilizando la misma técnica que en los resultados anteriormente presentados, en una serie de experimentos decidimos analizar las respuestas electroretinográficas en cuatro nuevos grupos experimentales. En ellos, tratamos de observar el efecto modulador de las células portadoras de melanopsina diseñando nuevos escenarios. En estos escenarios, existen diferencias en las intensidades de la luz ambiental del ciclo, así como en el momento de realización del registro.



La luz que incide sobre las jaulas donde habitan los animales, (**luz ambiental**) puede ser ajustada en el momento del registro (**luz de fondo**). Las diferentes intensidades que podemos emplear en la *luz ambiental* o en la *luz de fondo* han de ser suficientes para obtener un registro fotópico. En nuestros experimentos, hemos empleado unas intensidades de $200 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$ y $20 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$ para la luz ambiental y/o para la luz de fondo.

En la **Figura 59** se representan esquemáticamente los cuatro grupos experimentales. Los ratones C57BL/6J analizados de un primer grupo fueron obtenidos en su fase de oscuridad, realizando los registros a ZT20; este grupo viene de una situación de ausencia de iluminación ambiental y el experimento se realiza con una luz de fondo intensa ($\sim 200 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$). Para designarlo utilizamos: las siglas ZT más la hora a la cual el animal se somete al experimento; la intensidad de luz que presenta en ese momento del ciclo; y la intensidad empleada en la luz de fondo. De esta manera este primer grupo será denominado **ZT20 0_200**. El resto de grupos fueron analizados en su fase de luz y el registro, en cada uno, comenzó aproximadamente a las 8 horas del comienzo del ciclo luz/oscuridad, por tanto, todos serán ZT08. El primero de ellos es un grupo que presentaba una fase de luz ambiental intensa, mientras que el registro fue realizado con un fondo de baja intensidad (**ZT08 200_20**); en el siguiente grupo los ratones proceden de una fase de luz cuya luz ambiental era de una intensidad baja, sin embargo, a la hora de registrar los animales, la luz de fondo fue la más intensa (**ZT08 20_200**); el último grupo, al igual que el anterior, procede de una fase de luz del ciclo día/noche baja y en este caso la luz de fondo en el registro lo fue también (**ZT08 20_20**).

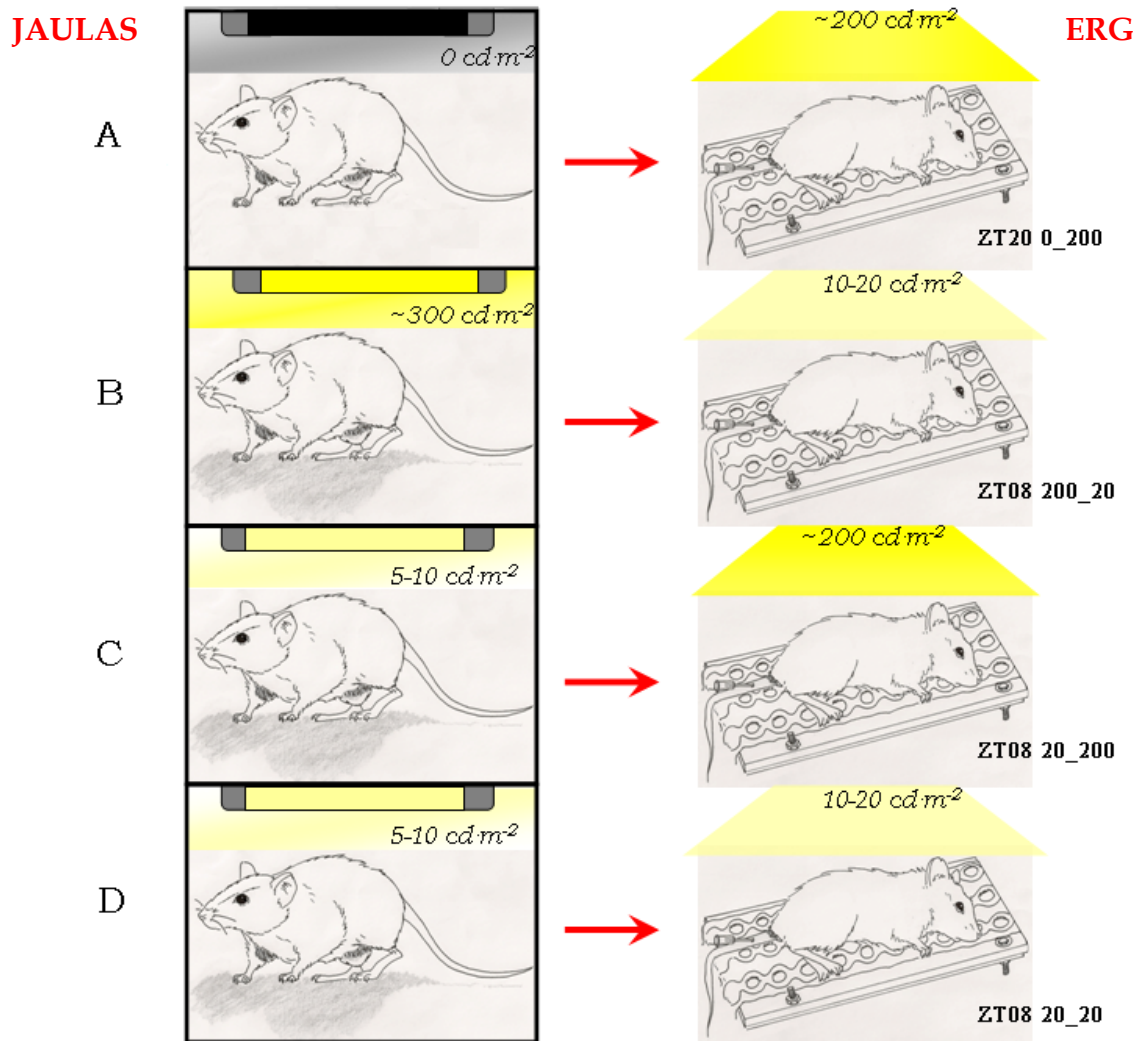


Fig59. Grupos Experimentales. A- Animales procedentes de su fase de oscuridad en los que se realizó el ERG bajo una luz de fondo intensa (ZT20 0_200). B- Animales procedentes de su fase de luz y ERG en condiciones de baja intensidad lumínica (ZT08 200_20). C- Animales procedentes de una fase de luz tenue y ERG en condiciones de alta intensidad lumínica (ZT08 20_200). D- Animales procedentes de una fase de luz tenue y ERG en condiciones de baja intensidad lumínica (ZT08 20_20).

Registro electroretinográfico estándar.

Como ya quedó descrito en el apartado de *Introducción*, el ERG fotópico consta de una *onda a* de escasa amplitud y una *onda b* que puede llegar a alcanzar una amplitud máxima de unos 250 μV . La deflexión negativa, u *onda a*, se debe en gran medida a la actividad eléctrica generada por la fototransducción. La *onda b* fotópica es



debida a las compensaciones, entre efectos despolarizantes e hiperpolarizantes, de diferentes tipos celulares activados en la vía de los conos.

De acuerdo a los resultados descritos en el grupo de experimentos anterior, el análisis de la *onda b* permite esperar un efecto potenciador de la respuesta en condiciones de máxima luz de fondo con respecto a un registro a intensidades más débiles. De los registros obtenidos analizaremos, en este nuevo punto, las amplitudes de la *onda a* y *onda b*. (**Figura 60**).

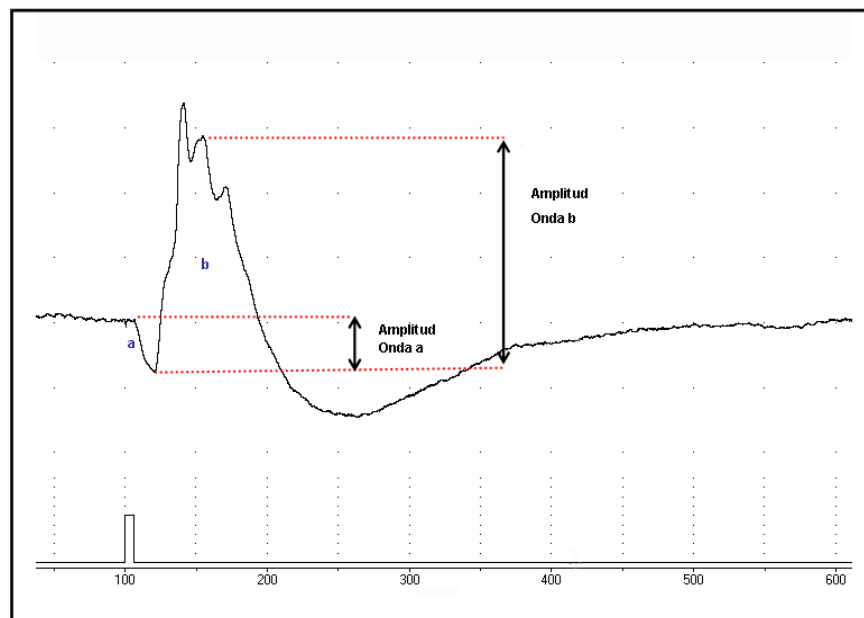


Fig60. Estimación de las amplitudes de la *onda a* y *onda b*. Se muestra sobre un trazado electroretinográfico obtenido en condiciones fotópicas las mediciones efectuadas para la estimación de la *onda a* y *onda b*. La amplitud de dichas ondas aparecen acotadas por líneas discontinuas rojas.

Los animales de cada grupo serán adaptados durante 5 minutos, para su registro fotópico, con la intensidad de luz de fondo correspondiente para cada caso. Tras este tiempo dio comienzo el protocolo de registro, cuyo tiempo completo de realización fue de una hora. El protocolo inicialmente consta de una serie de estímulos lumínicos de intensidad creciente, entre $-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ a $2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ para, a continuación y con una latencia de 10 minutos, aplicar estímulos únicos de $1,94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$, finalizando



con una nueva serie de estímulos como la batería inicial; completándose así una hora de protocolo (7 registros por animal) (**Figura 61**).

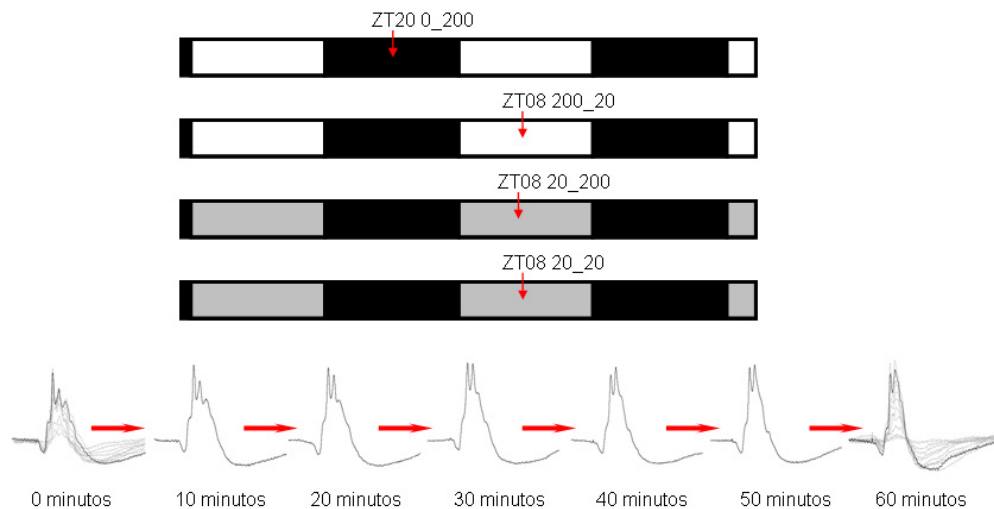


Fig61. Esquema de los grupos de estudio y registros electroretinográficos realizados. Se muestran los grupos experimentales de acuerdo a la nomenclatura ya mencionada (ZT20 0_200, ZT08 200_20, ZT08 20_200; ZT08 20_20). La porción inferior de la figura muestra un ejemplo de los registros electroretinográficos realizados a cada animal. Los tiempos 0 y 60 minutos presentan una batería de estímulos que aporta una serie de respuestas. Las respuestas de los tiempos intermedios son debidas a la aplicación de un único estímulo

1.2.1. Análisis de la Onda b.

1.2.1.1. ZT20 0_200.

Los primeros registros analizados en este experimento fueron los correspondientes al grupo ZT20 0_200. Los animales, $n=5$, proceden de su ciclo de oscuridad, por lo que sus células ganglionares fotosensibles (ipRGC) no están inicialmente estimuladas. En la adecuación del animal a las condiciones de luz aplicamos 5' de un fondo de una intensidad de $\sim 200 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$; a continuación, con la luz de fondo continuamente encendida, comienza el protocolo. Pretendemos observar la evolución de la respuesta electroretinográfica como consecuencia de la estimulación mantenida de las ipRGCs. El protocolo de registro de una hora de duración persigue

demostrar si en una hora de iluminación mantenida de la retina, las ipRGC producen modificaciones de la sensibilidad lumínica (amplitud de la *onda b* del ERG). La amplitud de la *onda b* del registro electroretinográfico ante el estímulo de $1,94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ de intensidad fue estimada a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos desde el comienzo del registro. Conviene recordar que la amplitud de la *onda b* en los 0 y 60 minutos procede del estímulo de la intensidad referida pero no han sido aplicados aisladamente, sino en una sucesión de estímulos creciente.

Se observa como la tendencia de la gráfica es la de ir aumentando en amplitud (μV) a medida que aumenta el tiempo en el que las ipRGC del animal están siendo iluminadas. Las diferencias estadísticas entre el tiempo *Cero* y el tiempo 60 son extremadamente significativas ($p= 0,0001$). El test empleado fue una *t de Student* con corrección de *Welch* (**Figura 62**).

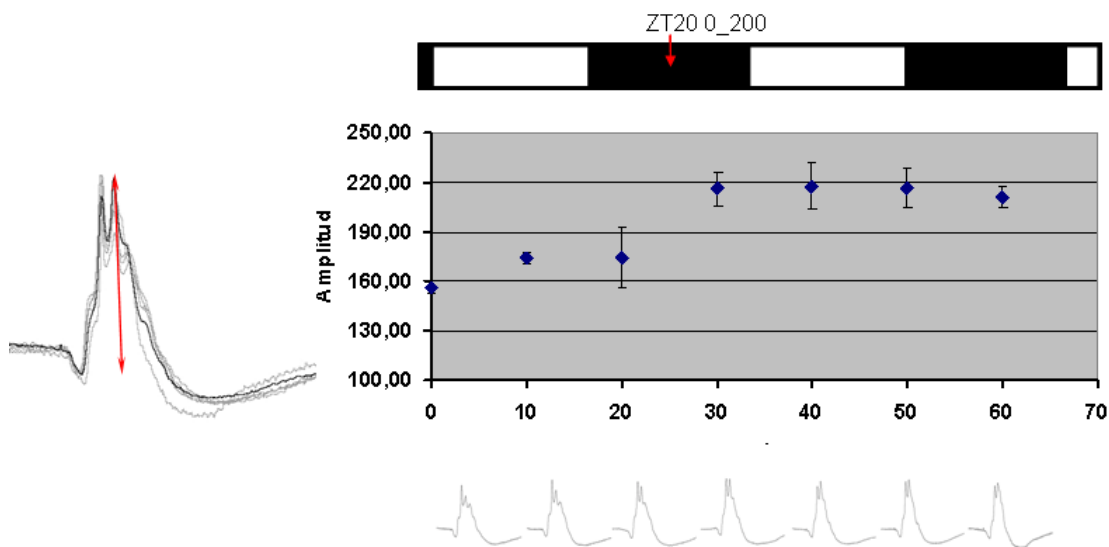


Fig62. Resultados de la *onda b* en los experimentos del grupo ZT20 0_200. A la izquierda de la figura se muestran las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda b* en cada intervalo de 10 minutos. Se aprecia un incremento en la amplitud de la onda electroretinográfica a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz de fondo. Estos resultados son el promedio de 5 animales registrados. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el error estándar de la media (EEM). Debajo de cada tiempo de la gráfica se muestra el registro obtenido de un animal ejemplo del grupo experimental.



1.2.1.2. ZT08 200_20.

En el segundo grupo experimental, los animales, $n=5$, presentan una intensidad de la luz ambiente suficiente como para mantener estimuladas las ipRGCs. Por el contrario, la luz de fondo es de una intensidad demasiado débil para mantener esa excitación. Así, si la duración total del protocolo es la adecuada cabría esperar una disminución en la amplitud de las respuestas electroretinográficas.

Como en el grupo anterior, en este grupo también analizamos las respuestas a una sola intensidad de estímulo, aplicado a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. La representación gráfica de los registros muestra como la amplitud de la *onda b* del electroretinograma se mantiene estable a lo largo de los 60 minutos de duración del experimento, si bien, la comparación del primer (0 minutos) y último dato (60 minutos) presenta diferencias estadísticas significativas (*t de Student, Welch*; $p < 0,01$, **Figura 63**).

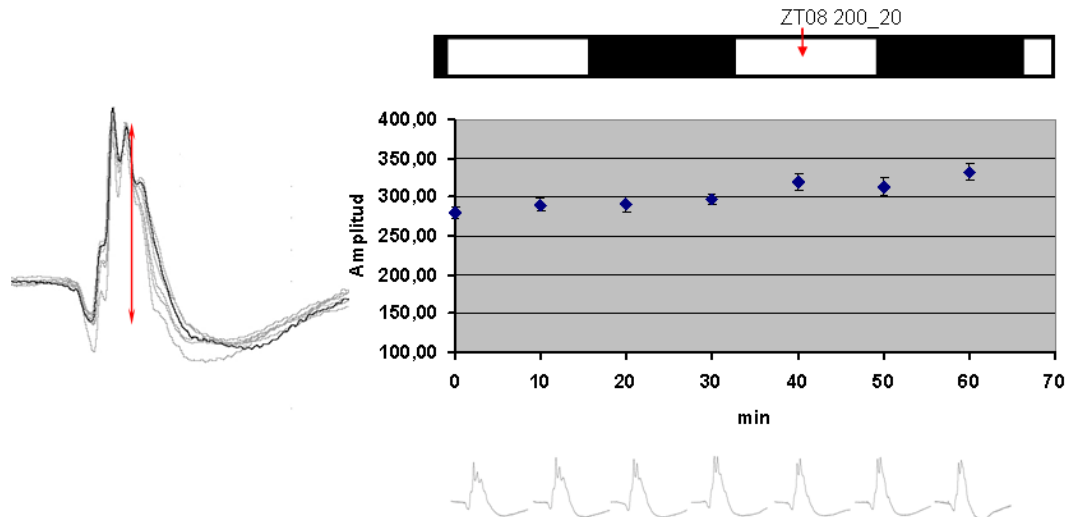


Fig63. Resultados de la *onda b* en los experimentos del grupo ZT08 200_20. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda b* en cada intervalo de 10 minutos. No se aprecia incremento en la amplitud de la onda electroretinográfica a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz de fondo de escasa intensidad. Estos resultados son el promedio de 5 animales registrados. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el EEM.

1.2.1.3. ZT08 20_200.

El tercer grupo experimental ofrece unas condiciones similares a las del primer grupo, en el sentido de que los animales proceden de unas condiciones de no excitabilidad de las ipRGCs, mientras que el registros de los animales, $n=7$, se efectuó con luz de fondo intensa. Destacamos que este experimento se realizó a las ocho horas de comenzar su fase de luz (cuya intensidad era insuficiente para la estimulación de las ipRGCs), mientras que los animales registrados del primer grupo procedían de su fase de oscuridad, por tanto, sin presencia de luz que pudiese estimular cualquiera de las células fotosensibles. La representación gráfica de los resultados obtenidos muestra una clara tendencia a que la amplitud de la *onda b* del electroretinograma incremente con el tiempo en que las ipRGC de los animales están siendo iluminadas. El análisis estadístico de los resultados (*t de Student, Welch*) comparando el primer (0 minutos) y último registro (60 minutos) presenta resultados muy significativos ($p < 0,01$; **Figura 64**).

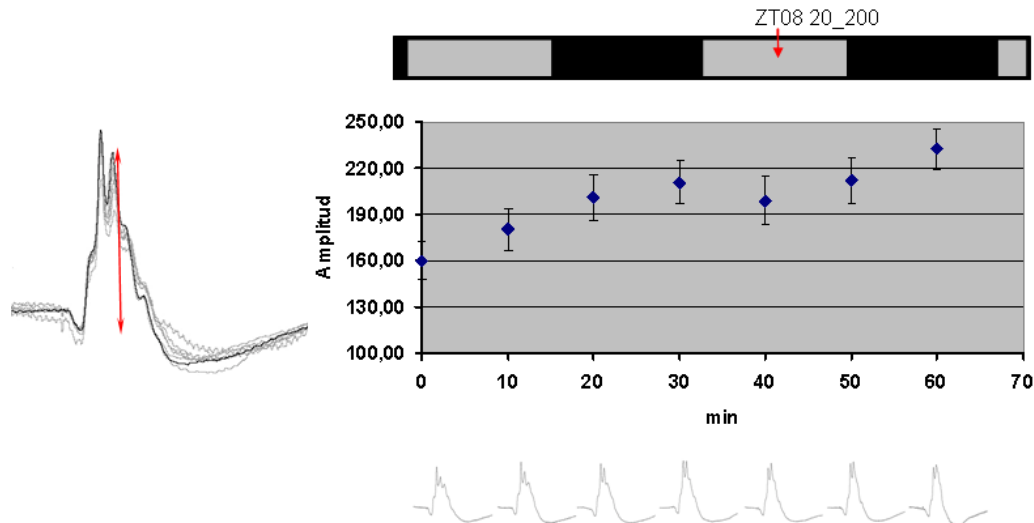


Fig64. Resultados de la *onda b* en los experimentos del grupo ZT08 20_200. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda b* en cada intervalo de 10 minutos. Se aprecia incremento en la amplitud de la onda electroretinográfica a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz de fondo de gran intensidad. Estos resultados son el promedio de 7 animales registrados. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el EEM.



1.2.1.4. ZT08 20_20.

El último grupo experimental, $n=5$, plantea un escenario en el que ni la luz ambiental ni la luz de fondo es suficiente como para estimular a las ipRGCs. Tanto la intensidad de la luz ambiental de su ciclo día/noche, como la luz de fondo empleada en el ERG no superan las $20 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$.

Debido a las características lumínicas expuestas tanto en la jaula del animal como en el momento de registro, lo esperado sería encontrar unas respuestas electroretinográficas sin cambios, comparando el inicio y el fin del experimento. Sin embargo, los resultados muestran que las amplitudes de la *onda b* tienden de nuevo a aumentar a lo largo de los 60 minutos de iluminación con luz tenue (**Figura 65**), mostrando el análisis estadístico, diferencias significativas (*t de Student, Welch*; $p < 0,001$) entre el primer (0 minutos) y último registro (60 minutos).

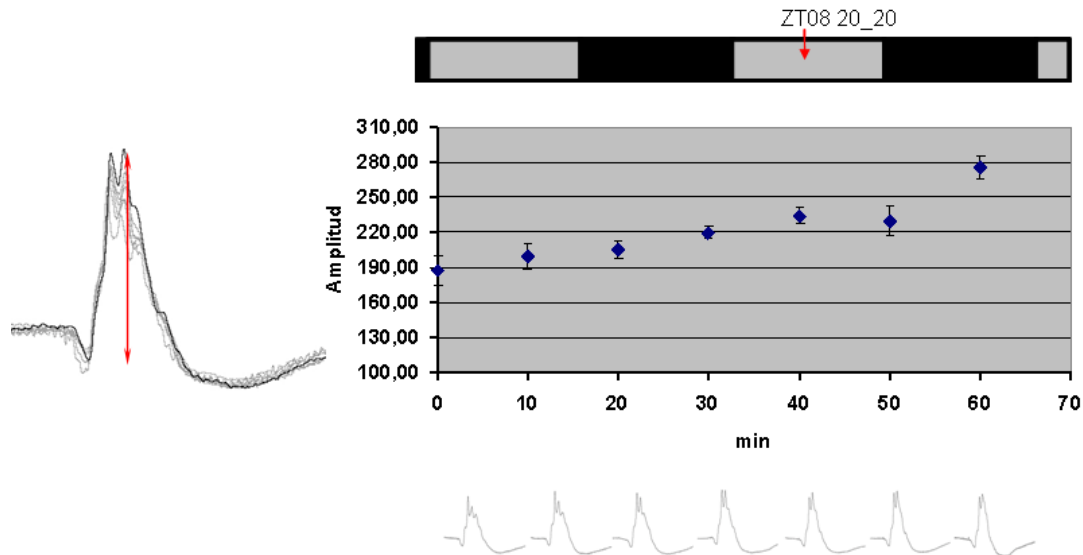


Fig65. Resultados de la onda b en los experimentos del grupo ZT08 20_20. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda b* en cada intervalo de 10 minutos. Se aprecia un leve incremento en la amplitud de la onda electroretinográfica a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz de fondo de baja intensidad. Estos resultados son el promedio de 5 animales registrados. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el EEM.



1.2.2. Análisis de la Onda a.

Durante años, esta deflexión negativa del ERG, ha sido asociada con la actividad de los fotorreceptores. Estudios electroretinográficos escotópicos, realizados en humanos muestran un aumento de la amplitud de la *onda a* ante estímulos de intensidad creciente (Hood et al, 1990b). Estos trabajos describen la *onda a* como un reflejo directo de la *fotocorriente* acontecida en los bastones (Breton et al, 1994; Paupoo et al, 2000).

Para nuestro estudio planteamos el análisis de la amplitud de la *onda a* en los registros fotópicos de los distintos grupos experimentales descritos también para el análisis de la *onda b*. Al igual que en el caso de la *onda b*, la exploración de la *onda a* se hizo en cada uno de los registros realizados a una intensidad de $1,94 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ y una periodicidad de 10 minutos (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos).

Las **Figuras 53 a 56** muestran los resultados del análisis de la amplitud de la *onda a* de forma similar a como ya lo hicimos para la amplitud de la *onda b*. El análisis estadístico de los resultados (*t de Student, Welch*) permitió observar que las diferencias entre la amplitud de la *onda a* de la primera respuesta (0 minutos) y la última (60 minutos) no mostraba diferencias significativas en los grupos **ZT20 0_200**, **ZT08 20_200** y **ZT08 20_20**. Sin embargo dichas diferencias fueron muy significativas en el grupo **ZT08 200_20**.

A la vista de los resultados obtenidos para los cuatro grupos podemos afirmar que, al menos para la *onda a*, el crecimiento en amplitud de las respuestas es inversamente proporcional a la presencia de una intensidad suficiente para estimular las ipRGCs.



1.2.2.1. ZT20 0_200.

En este grupo enfrentamos el primer registro, no excitación de las ipRGCs, al último, en el que la intensidad de la luz de fondo durante la hora de experimento puede haber estimulado esas células. Las diferencias estadísticas para este caso son no significativas (*t de Student, Welch*) (**Figura 66**).

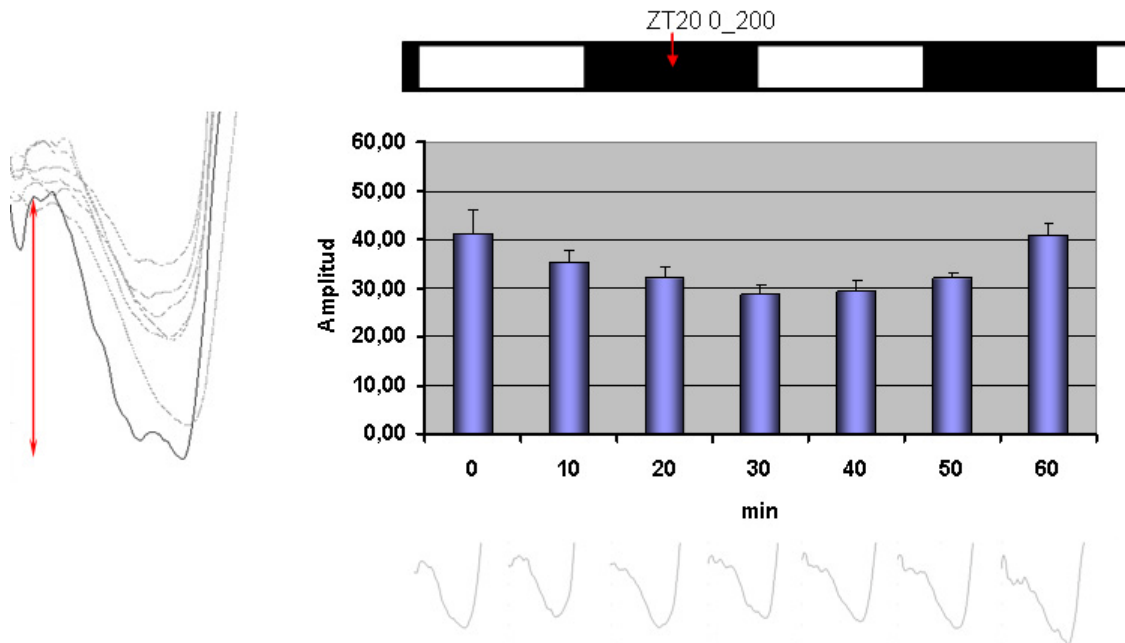


Fig66. Resultados de la onda a en los experimentos del grupo ZT20 0_200. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de la onda a aislada de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo de los 60 minutos de realización del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la onda a en cada intervalo de 10 minutos. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el error estándar de la media (EEM). Debajo de cada tiempo de la gráfica se muestra la onda a de un registro obtenido de un animal ejemplo del grupo.

1.2.2.2. ZT08 200_20.

En este caso la comparación del punto *Cero* y el punto *60* presenta unas diferencias estadísticas muy significativas (*t de Student, Welch*). Los resultados se representan en un histograma en la **Figura 67**.

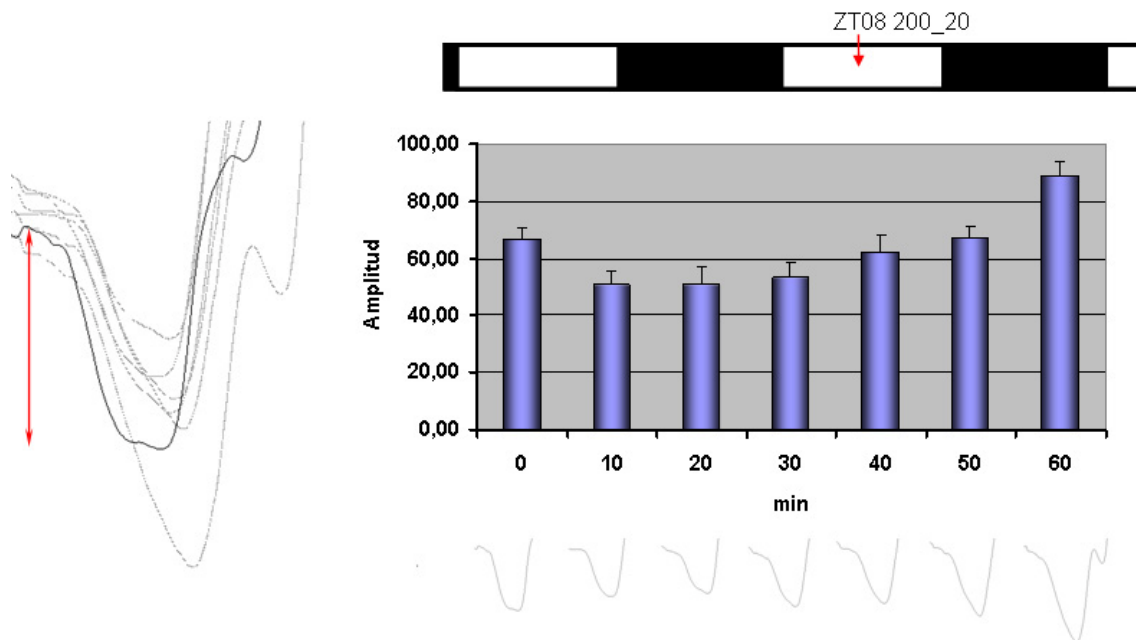


Fig67. Resultados de la onda a en los experimentos del grupo ZT08 200_20. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de la *onda a* aislada de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo de los 60 minutos de realización del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda a* en cada intervalo de 10 minutos. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el error estándar de la media (EEM). Debajo de cada tiempo de la gráfica se muestra la *onda a* de un registro obtenido de un animal ejemplo del grupo.



1.2.2.3. ZT08 20_200.

La estadística realizada a este otro grupo, para los mismos registros que los anteriores, dio un resultado claramente no significativo (*t de Student, Welch*). Los resultados se representan en un histograma en la **Figura 68**.

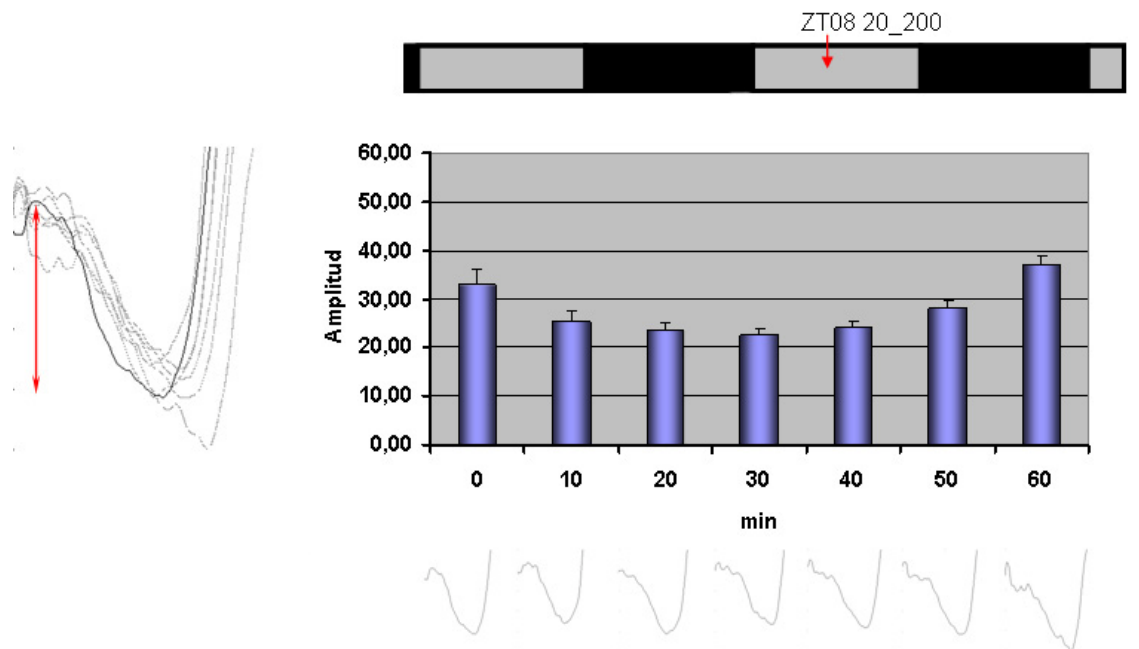


Fig68. Resultados de la onda a en los experimentos del grupo ZT08 20_200. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de la *onda a* aislada de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo de los 60 minutos de realización del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda a* en cada intervalo de 10 minutos. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el error estándar de la media (EEM). Debajo de cada tiempo de la gráfica se muestra la *onda a* de un registro obtenido de un animal ejemplo del grupo.

1.2.2.4. ZT08 20_20.

Al analizar el comportamiento de la *onda a* en este grupo observamos como las diferencias estadísticas para los registros elegidos son no significativas (*t de Student, Welch*). Ofreciendo, así, un comportamiento similar al de los grupos primero y tercero estudiados. Para la *onda a* mantener una luz de fondo sin cambios en la intensidad, con respecto a la luz ambiental, es sinónimo de una **no** afectación en las amplitudes de las respuestas (**Figura 69**).

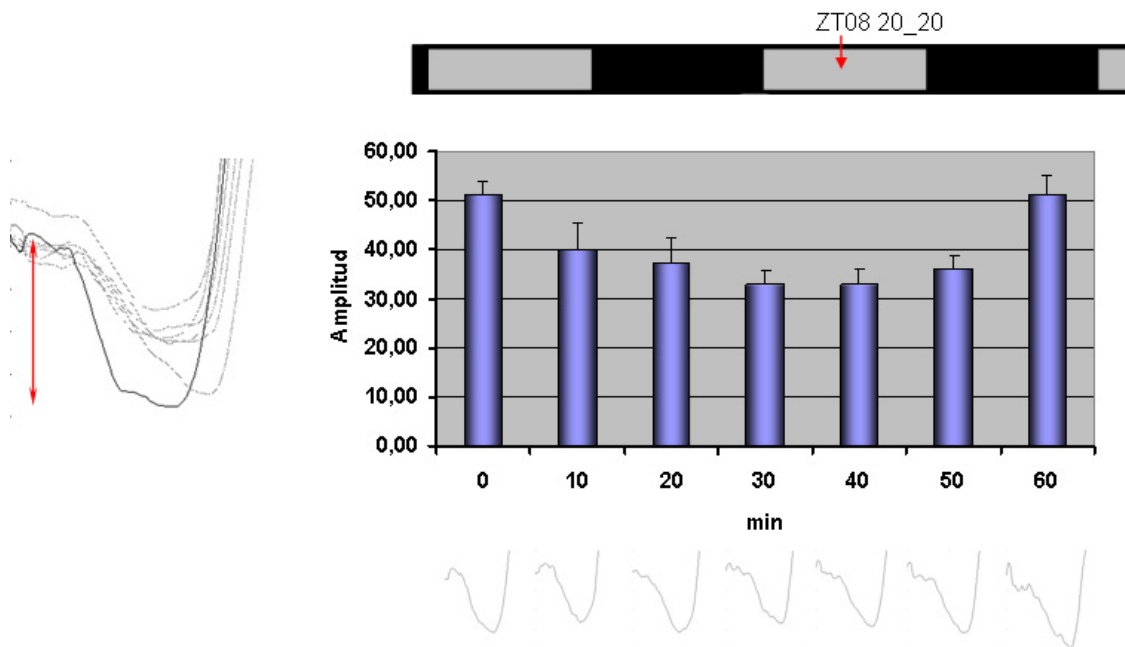


Fig69. Resultados de la *onda a* en los experimentos del grupo ZT08 20_20. A la izquierda de la figura se muestra un ejemplo de la *onda a* aislada de las siete respuestas superpuestas registradas en un animal a lo largo de los 60 minutos de realización del protocolo experimental. La gráfica de la derecha nos muestra los valores promediados de la amplitud de la *onda a* en cada intervalo de 10 minutos. Los valores mostrados en la gráfica corresponden al promedio de las amplitudes y el error estándar de la media (EEM). Debajo de cada tiempo de la gráfica se muestra la *onda a* de un registro obtenido de un animal ejemplo del grupo.



CAPÍTULO 3: Actividad Circadiana.

Como ya se ha comentado, la sincronización de los organismos con el medio ambiente viene determinada por las señales (*zeitgebers*) procedentes de dicho mundo exterior. La luz, como *zeitgeber* principal, conduce a un ajuste de la actividad del individuo con el ciclo diario de 24 horas; sin embargo, la periodicidad que mantiene el procesamiento y síntesis de diferentes productos metabólicos indica la existencia de una actividad endógena del individuo para estas acciones. A pesar de esta autonomía en el organismo, dicha actividad ajustada al ciclo de 24 horas también ha de ser adaptada o sincronizada con el ciclo luz/oscuridad externo. La existencia de estas adaptaciones entre el medio interno y el ambiente externo se observan claramente al analizar los diversos desajustes que sufre el organismo al realizar grandes viajes; por ejemplo, los vuelos transoceánicos que se realizan en relativo poco tiempo y en los que se atraviesan varias zonas horarias. Este desajuste, conocido popularmente por el anglicismo *jet-lag*, consiste en un compendio de desarreglos en el organismo tras cambiar, dentro del mismo ciclo de 24 horas, de zona horaria. Nuestro ritmo endógeno requiere de un tiempo para entender el cambio sufrido en las horas de luz que se están captando a través de las células fotosensibles.

En el presente capítulo de este trabajo de doctorado se muestra la desorganización producida en la actividad del organismo al desarrollar diferentes tipos de desfases horarios. Esta consecuencia tiene como efecto un proceso de resincronización según el desfase planteado. Realizamos el análisis del comportamiento de ratones control (*wt*) y ratones con degeneración retiniana (Rd10), en edades caracterizadas por una absoluta incapacidad visual de estos últimos (>p100), en cuatro escenarios o protocolos distintos. Los desfases pueden ser producidos sobre la fase de luz o de oscuridad, y estos desfases consisten bien en el *alargamiento* de la fase correspondiente o en el *acortamiento* de la misma. Estos protocolos suponen un desajuste entre la actividad desempeñada por el animal y el ciclo de 24 horas (ver *Materiales y Métodos*). El desajuste en horas, que se produce en la actividad del animal al desarrollar un protocolo, es enfrentado a los días que necesita dicho animal para reducir el mencionado desarreglo. Con ello se conforma la gráfica horas/días donde se

presentan los datos. Esta exposición de los datos nos permite cuantificar el desfase, calculado por la ecuación de la curva exponencial que se deriva de esta gráfica. Los desfases acontecidos entre la actividad circadiana y el ciclo de luz/oscuridad se estudiaron analizando la constante de tiempo τ (τ). Dicha constante se define como el tiempo transcurrido, en la curva exponencial, para el cual el desfase del animal se ha reducido hasta 1/3 de su valor inicial. En la **Figura 70** se representa un escenario o protocolo de *Acortamiento de la fase de luz* y la gráfica resultante con el cálculo del valor τ .

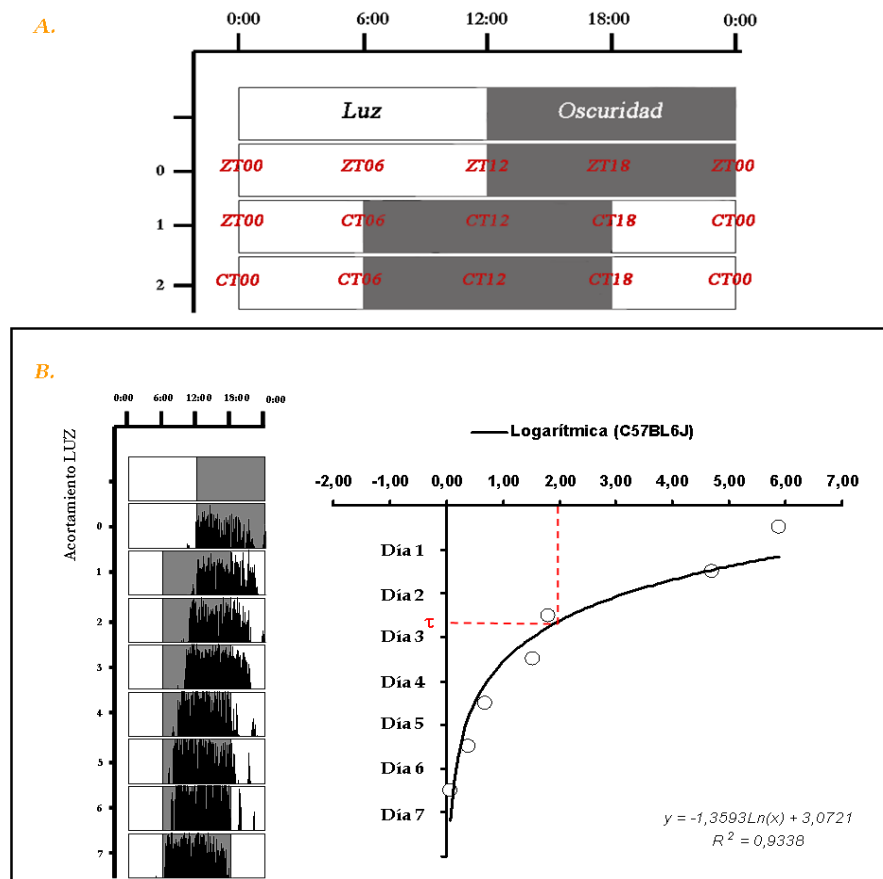


Fig70. Análisis cuantitativo de la resincronización circadiana inducida por desfase horario: A-Esquema del escenario de *Acortamiento de la fase de Luz*. B- Registros reales de la actividad circadiana de un ratón control en el escenario mencionado. A la derecha de estos registros se muestra la representación gráfica del proceso de resincronización seguido por los animales. La línea negra continua representa la curva exponencial ajustada a los valores numéricos calculados; el ajuste de la curva fue realizado por el software informático Excel (Microsoft). La línea discontinua roja indica el valor del eje de ordenadas (constante de tiempo, τ) cuando el desfase es 1/3 del valor máximo encontrado. Se incluye en el extremo inferior la ecuación de la curva.



1.1- ANALISIS DE LOS RESULTADOS EN RATONES CONTROL ANTE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS.

Los animales sometidos a los distintos escenarios presentaron su actividad circadiana, con una actividad motora nocturna durante la fase de noche en las semanas previas a la aplicación de los protocolos. La intensidad de la luz, presente en las cajas de actividad circadiana fue de $\sim 300 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$, suficiente como para estimular todos los tipos de células fotosensibles.

1.1.1. Protocolos de Acortamiento.

En este apartado se recogen aquellos protocolos en los que se reduce en seis horas la duración de una de las fases del ciclo luz/oscuridad. En el *acortamiento de fase de luz*, dicha fase en lugar de finalizar a ZT12 lo hace a CT06. En el caso del *acortamiento de fase de oscuridad*, el fin de esta fase se da a CT18. La duración de cada fase modificada pasa de 12 a 6 horas, sin embargo, el ciclo luz/oscuridad que comienza a continuación es de 12h:12h.

Acortamiento de luz: Tras la modificación de la fase de luz los animales dan comienzo a su actividad nocturna; ésta no se inicia con la fase de oscuridad, sino que mantiene la regulación previa en base a su programación endógena (~ 6 horas después, CT12). La actividad de los animales, en las ruedas de las jaulas de actividad, comenzó con progresiva antelación en los días subsiguientes en el transcurso de una semana, siendo su sincronía prácticamente perfecta al séptimo día. Mediante la ecuación de la curva exponencial ajustada a los valores extraídos de las ruedas de actividad es posible calcular la constante de tiempo τ . Esta constante determina el tiempo que necesita el animal para presentar una resincronización en la que el valor del desfase, que aún presenta, sea $1/3$ del valor inicial. La gráfica resultante de comparar horas de desfase frente a días de resincronización en 7 animales control se muestra en la **Figura 71 (A)**. El valor τ para este escenario es de 64,20 horas.



Acortamiento de oscuridad: De forma similar al escenario anterior, la actividad circadiana se alteró con un proceso de acortamiento de las horas, sin embargo, la fase sobre la que se procedió fue la de oscuridad. Dado que en este escenario la fase de luz aparecía antes, o lo que es lo mismo la fase de oscuridad se hacía más corta, la actividad de los animales cesó en el momento de encenderse la luz. Progresivamente los animales fueron adelantando su actividad para presentar una sincronía total al séptimo día de haberse producido el cambio horario. La gráfica resultante de comparar horas de desfase frente a días de resincronización en 7 animales control se muestra en la **Figura 71 (B)**. El valor τ para este escenario es de 63,43 horas.

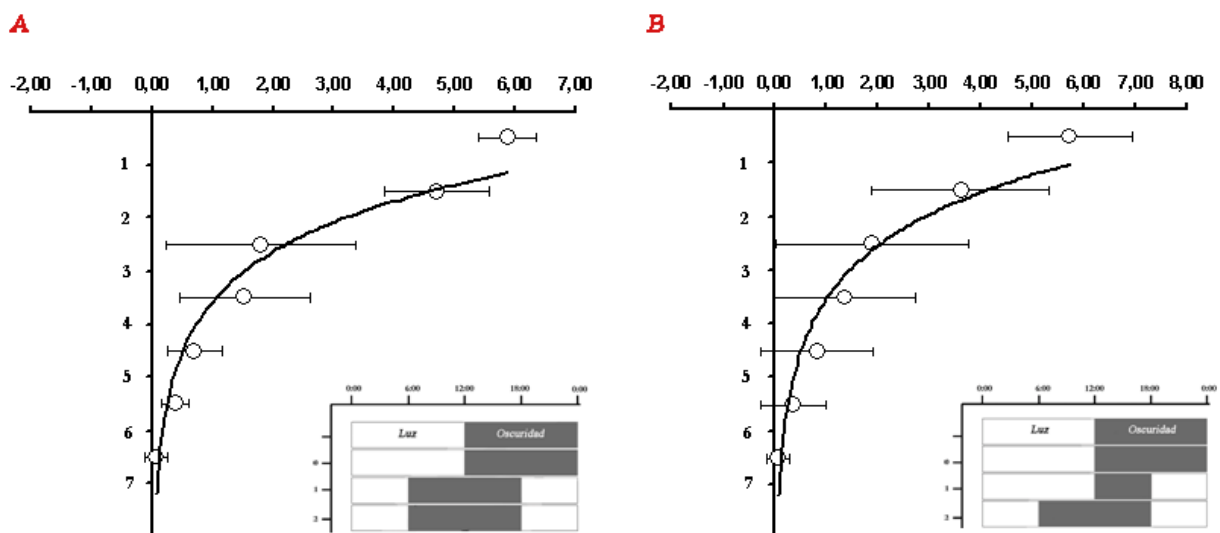


Fig71. Resincronización circadiana ante el Acortamiento de las fases de luz y oscuridad en animales control: A-Resultados del Acortamiento de la fase de Luz (n=7). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y = -1,3593 \ln(x) + 3,0721$, $R^2 = 0,9338$ determina el valor para la constante τ en 64,20 horas. B- Resultados del Acortamiento de la fase de Oscuridad (n=7). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y = -1,4406 \ln(x) + 3,0477$, $R^2 = 0,9406$ determina el valor para la constante τ en 63,43 horas. Los datos promediados se representan con las respectivas Desviaciones Estándar (DE).



1.1.2. Protocolos de Alargamiento.

Estos protocolos se llevaron a cabo con el alargamiento en seis horas, de la fase correspondiente del ciclo. En el *alargamiento de luz*, dicha fase en lugar de finalizar a ZT12 lo hace a CT18. En el caso del *alargamiento de oscuridad*, el fin de esta fase se da a CT06. La duración de la fase modificada pasa de 12 a 18 horas, sin embargo, el ciclo luz/oscuridad que comienza a continuación mantiene la periodicidad de 12h:12h.

Alargamiento de luz: La actividad de los animales sometidos a este protocolo se inició pocas horas antes del comienzo de la fase de oscuridad. Las horas de desfase presentadas por los animales, tras la modificación de la fase de luz, fueron menores comparándolas al proceso de acortamiento de la misma fase. Los días necesarios para la resincronización también se redujeron notablemente; en este caso, en tres días se completó el reajuste de la actividad motora del animal con el ciclo luz/oscuridad. El valor τ para este escenario es de 25,07 horas. La gráfica, para una n de 4, se muestra en la figura **Figura 72 (A)**.

Alargamiento de oscuridad: El efecto producido por la modificación de esta fase ofreció un resultado muy similar al efecto descrito para la fase de luz. En el día uno del protocolo, los registros de la actividad circadiana finalizaron en CT06, a pesar de continuar la oscuridad; sin embargo, el inicio de la misma se produjo pocas horas antes del comienzo de la nueva fase de oscuridad. En poco más de un día los ratones control sincronizaron perfectamente su actividad al nuevo ciclo luz/oscuridad. El valor τ para este escenario es de 11,63 horas. La gráfica ($n=6$) se muestra en la figura **Figura 72 (B)**.

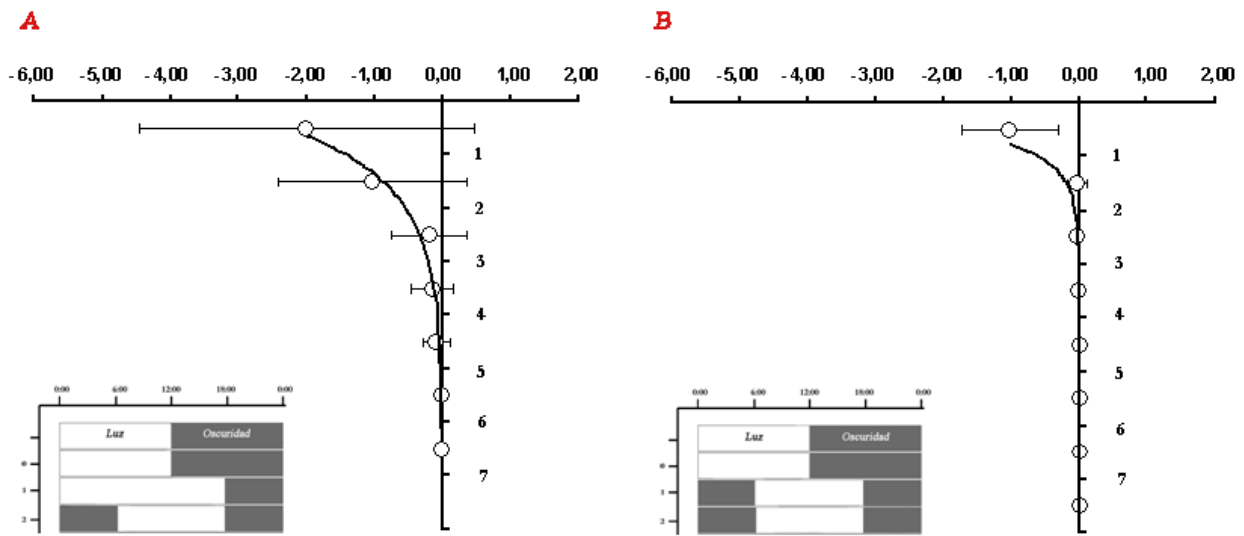


Fig72. Resincronización circadiana ante el Alargamiento de las fases de luz y oscuridad en ratones control: A-Resultados del Alargamiento de la fase de Luz (n=4). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y=-1,0301 \ln(x)+0,8607$, $R^2=0,952$ determina el valor para la constante τ en 25,07 horas. B- Resultados del Alargamiento de la fase de Oscuridad (n=6). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y=-0,4173 \ln(x)+0,2892$, $R^2=0,9772$ determina el valor para la constante τ en 11,63 horas. Los datos promediados se representan con las respectivas DE.

Como se ha mostrado, los ratones control presentan unas horas de desajuste o desincronización entre el comienzo de la actividad circadiana y el ciclo de 24 horas, en los dos tipos de protocolos definidos. La recuperación de dicha sincronía necesitó de un número determinado de días, que varió en función de si el protocolo fue de *alargamiento* o *acortamiento*. Por otro lado, dentro del mismo protocolo, esa resincronización tardó en producirse el mismo tiempo tanto si el desajuste se ocasionó por modificación de la fase de luz, como si fue debido a cambios en la fase de oscuridad. La constante de tiempo (τ) es muy similar en cada protocolo al analizar el desfase producido en la fase de luz o el desfase de la fase de oscuridad. Añadido a esto, observamos que para ambos protocolos el número de horas de desfase que sufren los animales, en el día uno del protocolo, es igual si éste se produce en una u otra fase. En los sucesivos días, a partir de ese primer registro, los animales irán reduciendo las horas de desfase hasta alcanzar la completa la resincronización.



Como ya ha sido mostrado en los correspondientes capítulos de este trabajo, el modelo mrido utilizado como control presenta una retina estructural y funcionalmente sana. Para estos ratones los desarreglos producidos por un acortamiento de fase son más acusados que aquellos debidos a un alargamiento de fase, bien sea ésta de luz o de oscuridad. Debido a las características de este modelo mrido quisimos analizar el papel que pueden desempeñar los diferentes tipos de células fotosensibles de la retina. Para ello planteamos el estudio de los efectos que producirían estos mismos protocolos en animales carentes de fotorreceptores, conos y bastones.

1.2- ANALISIS DE LA REACCIÓN ANTE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS EN RATONES CON DEGENERACIÓN RETINIANA (Rd10).

Los ratones Rd10 presentaron, al igual que el animal control, una actividad circadiana nocturna en las semanas previas a la aplicación de los protocolos. Como en los animales controles, la intensidad de la luz, presente en la caja de actividad circadiana fue de $100 \text{ cd}\cdot\text{m}^{-2}$, suficiente como para estimular el único tipo de célula fotoexcitable presente en sus retinas, las ipRGCs.

1.2.1. Protocolos de Acortamiento.

Acortamiento de luz: El valor de Y en la ecuación de la curva para un valor X que sea 1/3 del valor inicial del desfase, es calculado por la constante τ . El valor τ para este escenario es de 86,94 horas. La gráfica, para una n de 6, se muestra en la **Figura 73 (A)**.

Acortamiento de oscuridad: A la hora de analizar el efecto del acortamiento sobre la fase de oscuridad el resultado fue similar al anteriormente expuesto. El valor τ para este escenario es de 72,89 horas. La recuperación de la sincronía entre actividad y ciclo luz/oscuridad requirió de un total de ~9 días. La gráfica, para una n de 6, se muestra en la **Figura 73 (B)**.

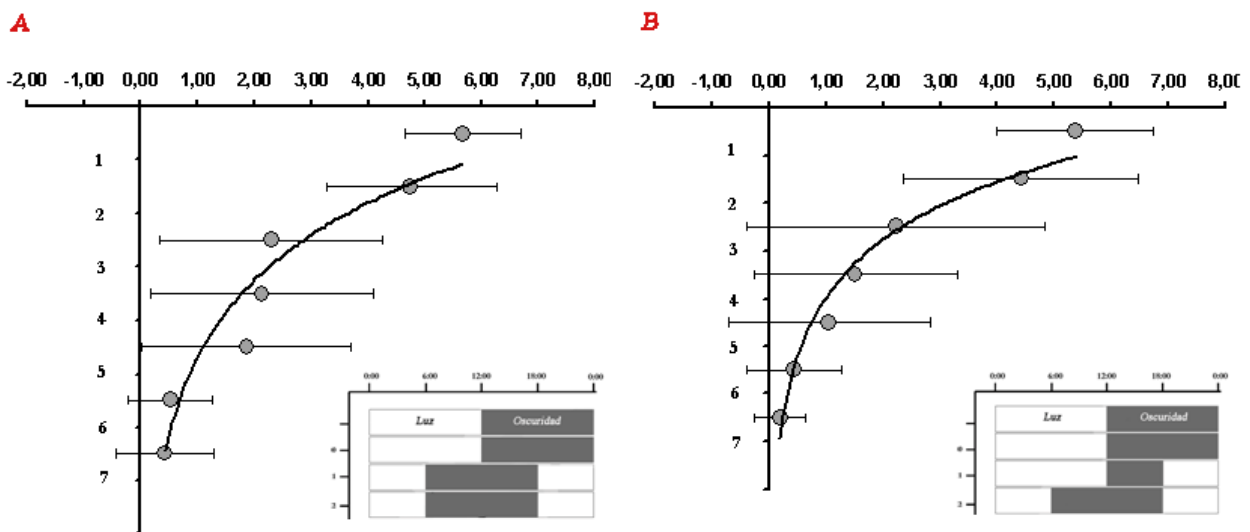


Fig73. Resincronización circadiana ante el Acortamiento de las fases de luz y oscuridad en ratones Rd10: A-Resultados del Acortamiento de la fase de Luz (n=6). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y = -2,0894 \ln(x) + 4,2002$, $R^2 = 0,9212$ determina el valor para la constante τ en 86,94 horas. B- Resultados del Acortamiento de la fase de Oscuridad (n=6). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y = -1,7506 \ln(x) + 3,4799$, $R^2 = 0,9669$ determina el valor para la constante τ en 72,89 horas. Los datos promediados se representan con las respectivas Desviaciones Estándar.

1.2.2. Protocolos de Alargamiento.

Alargamiento de luz: La resincronización de la actividad motora del animal con el ciclo luz/oscuridad se completó en un único día. El valor τ para este escenario es de 7,42 horas. La gráfica, para una n de 4, se muestra en la figura **Figura 74 (A)**.

Alargamiento de oscuridad: Para la modificación de esta fase la resincronización se dio en aproximadamente dos días. El valor τ para este escenario es de 16,42 horas. La gráfica, para una n de 4, se muestra en la figura **Figura 74 (B)**.

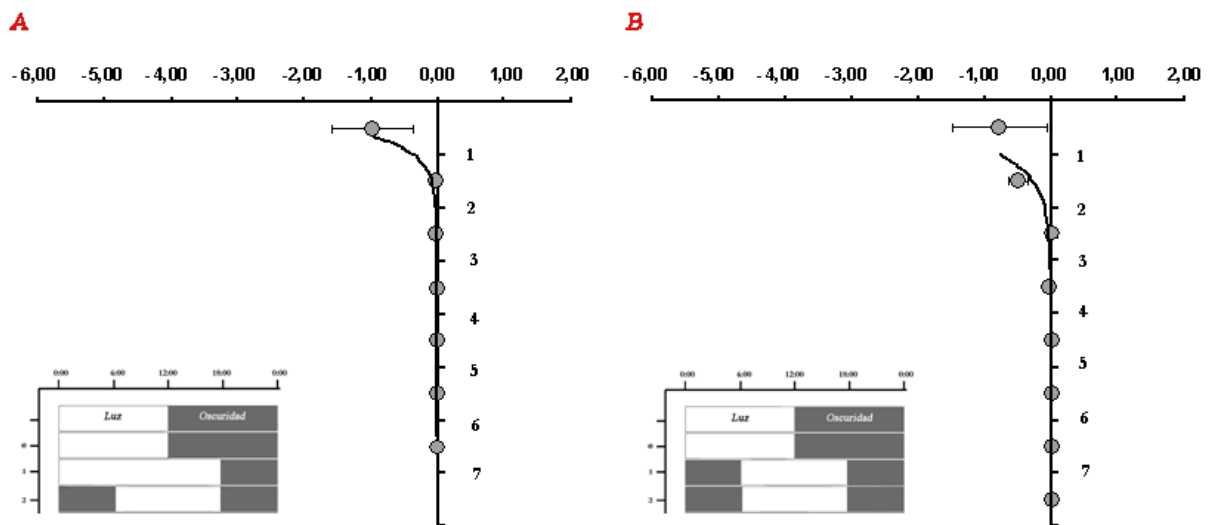


Fig74. Resincronización circadiana ante el Alargamiento de las fases de luz y oscuridad en ratones Rd10: A-Resultados del Alargamiento de la fase de Luz (n=6). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y=-0,3503 \ln(x)+0,1359$, $R^2=0,9708$ determina el valor para la constante τ en 7,42 horas. B- Resultados del Alargamiento de la fase de Oscuridad (n=6). La ecuación de la curva para esta gráfica: $y=-0,4729 \ln(x)+0,3993$, $R^2=0,9327$ determina el valor para la constante τ en 16,42 horas. Los datos promediados se representan con las respectivas DE.

El modelo mrido con degeneración de fotorreceptores realiza sus procesos de resincronización en tiempos muy similares al de los ratones control. La comparación de la constante de tiempo τ en los dos modelos animales utilizados, en ambos protocolos, se muestra en la **figura 75**.

A la vista de los resultados podemos afirmar que la resincronización del animal con el medio es más lenta en procesos de acortamiento que de alargamiento de fase; existe una mayor facilidad de adaptación de los animales a escenarios de alargamiento de fase. Además, no existen diferencias en la recuperación de la sincronía de la actividad con el ciclo solar en ambos protocolos si la fase modificada es de luz o de oscuridad. De la misma manera, existen grandes semejanzas de los Rd10 con los ratones control en el comportamiento ofrecido frente a los diferentes protocolos.

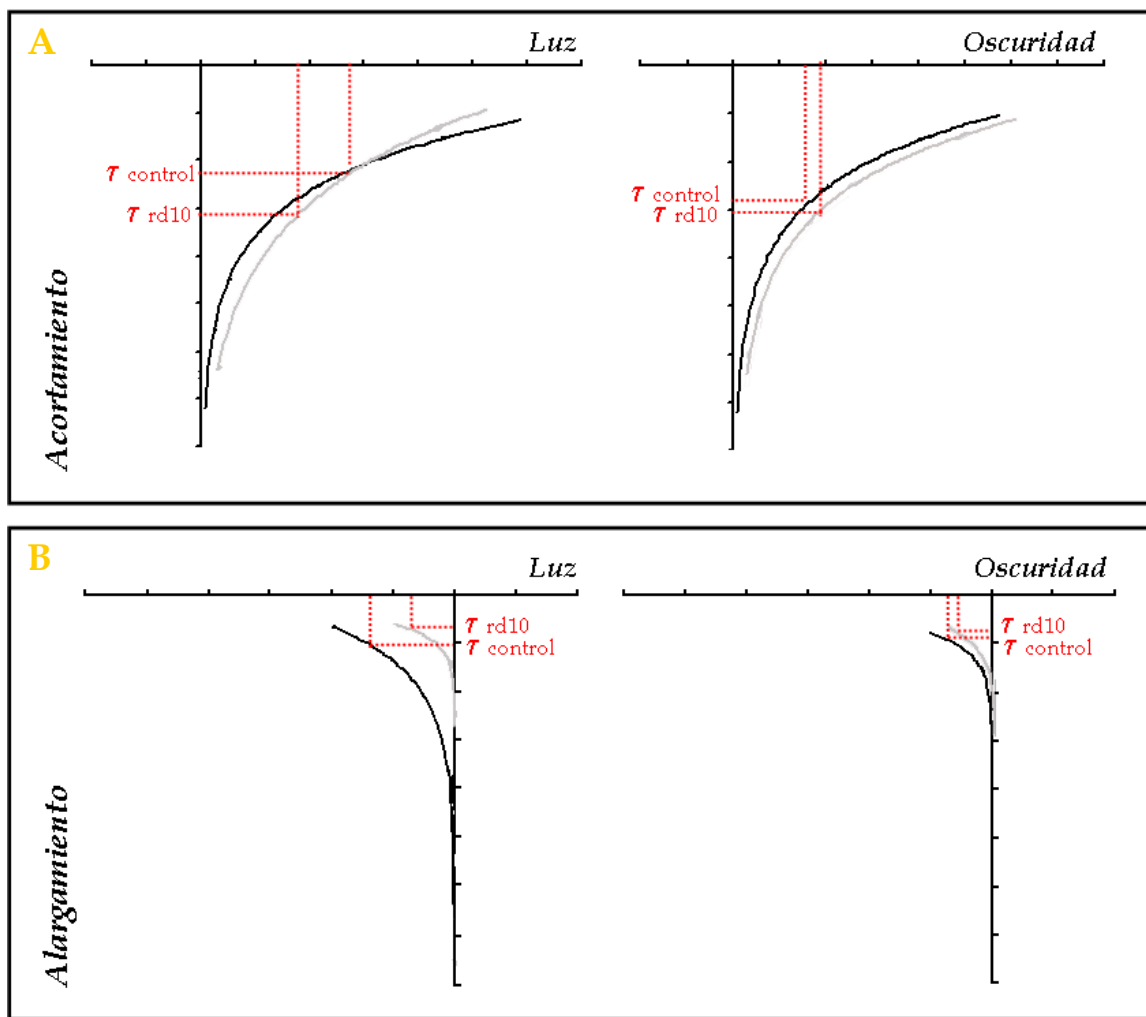


Fig75. Comparación de la constante de tiempo τ para los dos modelos animales en cada protocolo de experimentación: Las curvas exponenciales en negro representan la resincronización de los animales control, mientras que las curvas en gris corresponden a los animales Rd10. A- Se muestra el valor τ para cada protocolo de *Acortamiento de fase*. En todos los casos, y para ambos modelos animales, esta constante de tiempo es similar. B- Se muestra el valor de τ para cada protocolo de *Alargamiento de fase*. La constante es significativamente inferior al anterior protocolo pero es prácticamente idéntica entre los dos modelos múridos.

Estos parejos comportamientos entre cepas nos permiten determinar el papel de los diferentes fotorreceptores en la recuperación de la sincronía de la actividad circadiana con el medio. Podemos concluir que las células encargadas de mantener la capacidad de reajustar sus ritmos a los nuevos ciclos horarios son las células portadoras de melanopsina.

DISCUSIÓN



CAPÍTULO 1: ESTUDIO MOLECULAR

Desde el descubrimiento de la molécula fotosensible **melanopsina** en melanóforos de *Xenopus*, muchos han sido los trabajos que han profundizado, desde diversos aspectos, en la propia melanopsina y en las células portadoras de ese pigmento en la retina. Investigaciones para conocer su evolución (Arendt et al, 2001; Gehring et al, 2004; Melyan et al, 2005; Koyanagi et al, 2005; Ercllick et al, 2009), determinar su estructura (Provencio et al, 1998a; Gooley et al, 2001; Hattar et al, 2002; Provencio et al, 2002a; Qiu et al, 2005; Panda et al, 2005), comprobar su implicación en procesos no visuales (Berson et al, 2002; Hattar et al, 2002; Güller et al, 2008; Hatori et al, 2008), fijar los umbrales de activación (Lucas et al, 2003; Panda et al, 2003; Do et al, 2009), establecer los distintos subtipos de células portadoras de melanopsina y las posibles relaciones de éstos con el resto de la retina (Belenky et al, 2003; Dacey et al, 2005; Pérez-León et al, 2006; Viney et al, 2007; Wong et al, 2007; Baver et al, 2008; Schmidt et al, 2008; 2009; Zhang et al, 2008; González-Menéndez et al, 2009), son algunos de los ejemplos de las líneas de estudio generadas.

Las células portadoras de melanopsina han sido y siguen siendo largamente complicadas en su clasificación. Podemos concretar que existe una clasificación en función de la arborización de sus procesos dendríticos (Provencio et al, 2002b) y que recientemente, complementando esta clasificación estructural, experimentos de electrofisiología han mostrado dos tipos de respuestas dentro de esta subpoblación de ganglionares: M1, M2 (Schmidt et al, 2009). Sin embargo, la morfología presentada en estas células parece apuntar a la existencia de más grupos, como el denominado M3 (Schmidt et al, 2008) que extiende sus dendritas tanto por la sublámina *On* como por la *Off* de la capa plexiforme interna (CPI). El reciente trabajo de Pires y colaboradores (Pires et al, 2009) documentan la existencia de dos isoformas para la melanopsina *Opn4m* por diferencias en la longitud de la proteína.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, mediante el marcaje inmunocitoquímico con diferentes anticuerpos anti-melanopsina, se procedió a la detección de los diferentes subtipos de células ganglionares intrínsecamente



fotosensible. Para corroborar que estas células correspondían realmente a células ganglionares se realizaron dobles marcajes con melanopsina y proteínas de expresión característica de ganglionares, como es el factor de transcripción Brn3 (Xiang et al, 1995). Los resultados obtenidos permitieron observar que si bien una gran proporción de células melanopsínicas expresan Brn3, también existen células melanopsínicas no positivas a Brn3a, concluyendo que no todas las células ipRGCs poseen ese factor de transcripción.

Este dato también abre la posibilidad de que estemos ante células retinianas no ganglionares, pero portadoras de melanopsina. Con el fin de demostrar esta nueva hipótesis, ante la posibilidad de que existan otros factores de transcripción de la familia Brn3 que también están en células ganglionares, nos planteamos la identificación específica de las células ganglionares mediante marcaje retrógrado a través del nervio óptico con una rodamina (DTMR). Los resultados obtenidos para este experimento reforzaron la idea de que no todas las células portadoras de melanopsina son células ganglionares. Solo cabe preguntarse si el marcaje retrógrado tiñe todas las células, o si bien cabe la posibilidad de que algún tipo celular no sea capaz de captar el marcador.

Nuestros datos, por tanto, apuntarían a la existencia de células melanopsínicas que no proyectan sus prolongaciones fuera del globo ocular hacia dianas centrales. De esta manera, cabe la posibilidad de que la retina presente células que expresan melanopsina y cuya función se centre en la modulación de la transmisión de la señal a nivel de la propia retina. No obstante, ya sean las células ganglionares melanopsínicas o ya sean células melanopsínicas sin proyección centripeta, las células fotosensibles de la retina ubicadas en la retina interna podrían modular mecanismos neurales de adaptación a la luz o a la oscuridad dentro de la propia retina.

Otra de nuestras observaciones originales mostró que además de los subtipos celulares descritos para las células melanopsínicas, podrían existir células fotosensibles cuyo soma estaría ubicado en la Capa Nuclear Interna (CNI) y que proyectaban a la Capa Plexiforme Externa (CPE), pudiéndose incluir dentro del grupo de células interplexiformes.



Todos estos datos, nos llevaron a estudiar, desde un punto de vista molecular, la capacidad de las células fotosensibles para regular la expresión y activación de ciertas proteínas retinianas, escogidas por su posible papel funcional en los mecanismos de adaptación lumínica

ESTUDIO TEMPORAL DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE TIPOS EXCLUSIVOS DE CELULAS RETINIANAS.

Los ciclos o ritmos en biología se dan no sólo en el comportamiento de los seres vivos sino también en la bioquímica de sus tejidos. La red de circuitos que configuran la retina presenta una expresión y activación de proteínas dependiente de moduladores ambientales externos, cuyo máximo exponente es la luz. Sin embargo, a pesar de este *zeitgeber*, esta actividad molecular también puede presentar un ritmo endógeno. Un ejemplo son los trabajos sobre dopamina, la cual, presenta una regulación circadiana con picos de liberación durante el día (Iuvone et al, 1978; Nir et al, 2002); en condiciones de absoluta oscuridad, también existiría una liberación rítmica de dopamina en retina (Doyle et al, 2002). Algo similar ocurre con la liberación nocturna de melatonina en la gran mayoría de los mamíferos, siendo su pico de expresión durante la noche (Tosini et al, 1996; 1998).

En nuestro trabajo, hemos centrado el estudio en otras proteínas que también podrían estar sometidas a un ritmo endógeno de activación, y dicho ritmo controlado por moduladores ambientales externos como la luz incidiendo sobre fotorreceptores clásicos o sobre células melanopsínicas:

PKC α : Gabriel y colaboradores (2001) demostraron la existencia de una regulación dependiente de luz para la Proteína Kinasa C α (PKC α) y confirmaron la persistencia de este ritmo en condiciones de prolongados tiempos en oscuridad.

NKCC1: Se ha descrito una subregulación de este cotransportador en algunos vertebrados adultos (Zhang et al, 2006). En base a lo ya comentado más arriba y mostrado en los resultados (véase *lámina 5*), sería posible plantear la existencia de

comunicaciones intercelulares entre células melanopsínicas “interplexiformes” y células de la retina externa. Así nos preguntamos acerca de posibles modulaciones desde las ipRGCs sobre la expresión de NKCC1.

TH: La dopamina liberada en la retina modula la función de diversos tipos celulares, incluyendo fotorreceptores y células horizontales en la retina externa (Laseter et al, 1985; McMahon y Brown, 1994; Nir et al, 2002; Ichinose y Lukasiewicz, 2007). Este neurotransmisor parece ser regulado por las señales recibidas desde conos y bastones (Iuvone et al, 1978), ya que las diferentes fosforilaciones de la enzima necesarias para su activación es una consecuencia de la estimulación fótica (Iuvone et al, 1982; Witkovsky et al, 2000) Sin embargo, el papel de las ipRGC como potenciadoras de la difusión de dopamina aún es poco claro; existen trabajos que desmienten (Vugler et al, 2007b; Cameron et al, 2009) y otros que apoyan dicha función (Zhang et al, 2008).

La propia **melanopsina** también parece presentar un comportamiento circadiano en su expresión. Sin embargo, no ofrece tanta unanimidad la existencia de un ritmo circadiano en la expresión de esta molécula que sea independiente de la luz (Sakamoto et al, 2005; González-Menéndez et al, 2009).

Proteína Kinasa C α (PKC α)

Los resultados de inmunofluorescencia presentados demuestran una ritmicidad en la expresión de PKC α tanto en los ratones control como en los ratones distróficos. Sin embargo, esta expresión circadiana ofrece diferencias entre ambos modelos animales. Mientras que el ratón control presenta un pico máximo en la mitad del día (ZT06), el ratón Rd10 lo presenta con un desfase de unas 6 horas, apareciendo en ZT12 dicho máximo de expresión. La ausencia de fotorreceptores clásicos en el ratón Rd10 parece afectar a la correcta sincronía de la expresión de la proteína con el ciclo luz/oscuridad.

Analizando estos datos podemos afirmar que para el mantenimiento de la ritmicidad en la expresión de la proteína, es necesario y suficiente un tipo de célula con capacidad fotosensible. El ratón Rd10 sólo presenta las células portadoras de



melanopsina con dicha capacidad. Estas células son las posibles causantes de esta expresión circadiana de la proteína. A pesar de la ausencia de los fotorreceptores, la expresión de PKC α sigue presentando un comportamiento circadiano. Sin embargo, el desplazamiento de la máxima señal de PKC α en el tiempo hace suponer que la información proveniente de conos y bastones es necesaria para su correcta regulación.

La inmunorreactividad de PKC α a nivel de soma y terminal axónica no es diferente a la hora de analizar la ritmicidad, ya que se observan los mismos máximos de expresión en una u otra localización. La comparación de esa inmunorreactividad entre los extremos de la célula para cada tiempo determina el grado de transporte que presenta la proteína en a los distintos tiempos (ZT). En el ratón control las diferencias entre soma y terminal axónica son estadísticamente significativas en todos los tiempos, siendo una vez más ZT06 el que ofrece mayor contraste. Sin embargo, en el ratón Rd10 esas diferencias entre soma y terminal no existen en ninguno de los cuatro tiempos estudiados. Esto parece indicar la no existencia de *transporte* de la proteína. A pesar de esta lectura, es llamativa la mayor señal de fluorescencia presentada a ZT12, tanto en soma como terminal axónica, en comparación con los otros ZT analizados.

La realización de los experimentos por Western blot (WB) señalan una mayor presencia de la proteína activa en las horas de luz en el ratón control, con máximo exponente en ZT06. El ratón con degeneración retiniana presenta, a su vez, la proteína activa mayoritariamente en el tiempo ZT12. Las mayores exigencias de proteína activa en el ciclo de luz/oscuridad observadas por WB confirman los análisis realizados por inmunocitoquímica para ambos modelos animales.

Nuestros estudios de la proteína translocada de citosol a membrana dentro de cada tiempo nos ha permitido observar que en el animal control el tanto por ciento traslocado era mayor en las horas de luz, que en las respectivas horas de oscuridad. Sin embargo, en el modelo Rd10 el mayor porcentaje de traslocación se produjo en el tiempo ZT18. Estas diferencias entre proteína activa y traslocación de PKC α no implican una falta de coherencia en los resultados ya que se trata de procesos distintos. Una posible explicación podría ser que la traslocación/activación que se produce en

horas de luz (ZT06 y ZT12) determina su utilización y consumo, con el resultado de una menor cuantificación de su señal a tiempo ZT12 (véase Figura 36 y 37).

Como ya se ha comentado, nuestros resultados confirman los datos bibliográficos (Gabriel et al, 2001) respecto a la expresión circadiana de PKC α . Sin embargo, nuestro estudio plantea el análisis de la inmunoreactividad de PKC α en diferentes modelos animales, con diferencias en el contenido de distintas células fotosensoras. Asimismo, en el presente trabajo, mostramos la cuantificación de la proteína activa gracias a un avance en nuestro protocolo de preparación de muestras para el WB; el fraccionamiento celular nos ha permitido estudiar con mayor atención la fracción de membrana.

Nuestro estudio también lleva a cabo el análisis de la PKC α , a nivel de inmunofluorescencia y WB, en un ratón modificado genéticamente *Knock out* para melanopsina (Opn4KO), en el que se ha procedido a la extracción del gen de la melanopsina. Si bien nuestro trabajo permite analizar los resultados obtenidos, el gran problema que encontramos para conseguir un análisis completo fue la falta de dos de los cuatro tiempos analizadas en los otros modelos animales. Esta limitación nos impidió plantear un estudio de la expresión circadiana de la proteína en este modelo murino. Sí que pudimos llevar a cabo el análisis de la señal de inmunofluorescencia en soma y terminal axónica de los dos únicos tiempos con los que contábamos, ZT06 y ZT18. Para este análisis los resultados obtenidos fueron muy similares a los del ratón distrófico Rd10.

Cotransportador Na²⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC1)

El cotransportador NKCC1, como ya hemos descrito, introduce el ión cloro en células horizontales y dendritas de células bipolares *ON* ayudando a mantener el potencial de equilibrio para el cloro más positivo que el potencial de membrana (Blanco et al, 1996; Varela et al, 2005a; 2005b). Esto implica un efecto despolarizante mediado por GABA en las células que expresan NKCC1.



En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos observado como la expresión de NKCC1 en el ratón control se mantiene constante en los cuatro tiempos analizados. Sin embargo, la expresión de este cotransportador está fuertemente disminuida en el ratón distrófico, al menos para edades superiores a los cien días postnatales (p100). El estudio de la expresión de esta proteína a distintas edades en este modelo mürido determinó la pérdida progresiva del cotransportador, siendo prácticamente imperceptible a partir de p61. La falta de señal para NKCC1 en los Rd10 con de edades superiores a p100, podría ratificar trabajos anteriores en los que se describe la sub-regulación de este canal en el estado adulto de vertebrados ([Zhang et al, 2006](#)).

Las células horizontales de la retina también sufren una degeneración progresiva en el ratón Rd10; aproximadamente el 19% de estas células has desaparecido a los 3 meses de edad ([Gargini et al, 2007](#)). Nuestro trabajo ha permitido discriminar que la disminución a nula expresión de NKCC1 es un proceso diferente a la muerte de la célula horizontal, gracias a los estudios de doble marcaje inmunocitoquímico de NKCC1 y calbindina. A edades tempranas de degeneración retiniana (p19) las células horizontales son claramente visibles tanto por la inmunorreactividad a calbindina como a NKCC1. En edades tardías en la degeneración (p61-p240) la presencia de calbindina indicaba la existencia de células horizontales pero no de cotransportador NKCC1. Asimismo, nuestros experimentos de WB, llevados a cabo tanto en el modelo animal control (p30) como para el modelo animal distrófico (p100), permitieron ratificar la presencia/ausencia en la expresión de la proteína. Los datos mostrados sobre marcaje y expresión de NKCC1 en el ratón Opn4KO nos han permitido observar una expresión positiva y muy similar en los dos únicos tiempos disponibles. Podemos por tanto decir que la expresión de NKCC1 en células horizontales está determinada por el funcionamiento de los fotorreceptores clásicos, conos y bastones y no por las células melanopsínicas.

Aunque nuestros estudios no han podido extenderse a nivel del registro electrofisiológico en células retinianas, con los resultados obtenidos podríamos intentar buscar una posible interrelación entre PKC α y NKCC1. Como ha quedado demostrado, la Proteína Kinasa C α (PKC α) presenta una expresión circadiana y ésta es transportada de soma a terminal axónica. La PKC α necesita de calcio y fosfolípidos para su



activación. La migración desde el soma al otro extremo de la célula bipolar de bastón se entiende al localizarse canales de calcio tipo L mayoritariamente en la terminal. Estos canales son dependientes de voltaje y la despolarización de la célula permite su apertura (Protti y Llano, 1998; Nachman-Clewner et al, 1999; Baumann et al, 2004; Xiao et al, 2007). El Calcio permitirá la activación de PKC α por su traslocación a membrana y la escisión de la proteína por activación de las calpaínas (Liu et al, 2007). La función fosforilante de PKC α actúa sobre los receptores de GABA_A, que se encuentran en esa porción del axón, inhibiéndolos (Feingenspan et al, 1994; Bormann et al, 1995; Lukasiewicz et al, 1998; Vaquero y de la Villa, 1999). El GABA en esta porción de la célula tiene un efecto hiperpolarizante y la inactivación de sus receptores reforzará el estado despolarizado de la célula. (Gabriel et al, 2001).

Hemos descrito como el medio día (ZT06) exhibe la máxima intensidad total de PKC α en el soma y la terminal axónica, comparándolo con los otros ZT. Además a este tiempo presenta la mayor diferencia estadística entre ambos extremos en la medida de la inmunorreactividad. En este tiempo la célula bipolar de bastón se encuentra despolarizada por la ausencia de glutamato y esto confiere un voltaje suficiente para activar los canales de calcio tipo L. La PKC α es más abundante en la terminal en ese tiempo quizás por ser transportada a los lugares de mayor concentración de calcio. La acción conjunta de calcio y PKC α también influye en la liberación del neurotransmisor glutamato (Midorikawa et al, 2007; Abreu et al, 2008)

En el caso del ratón distrófico Rd10, no aparecen diferencias entre soma y terminal axónica; sin embargo, sí que varía la intensidad de la señal por cada tiempo y estos valores siguen la misma tendencia bien analicemos el soma bien la terminal. Este modelo murino presenta, a las edades utilizadas, una ausencia total de bastones y conos. A estas edades de degeneración las retinas no expresan NKCC, o lo hacen en ínfima cantidad. Esto implica que la célula bipolar no recibe señal glutamatérgica a nivel de los receptores mGluR6 y por tanto la célula se encuentra despolarizada. Este hecho facilitaría la entrada de calcio a través de los canales tipo L. Sin embargo, las posibles señales gabaérgicas no ejercen una función despolarizante en el soma celular por la falta de NKCC. La tendencia de hiperpolarización del soma celular podría inducir a la PKC α



a distribuirse por igual en soma y terminal axónica, con el fin de fosforilar los receptores de GABA (GABA_A en el soma y GABA_C en la terminal) y proteger el estado despolarizado.

Si asumimos que el mecanismo arriba explicado es correcto, cabría esperar que una retina con fotorreceptores pero sin células melanopsínicas, como es la del modelo de ratón *Opn4KO*, se comportase igual que el animal control en la expresión y localización de la Proteína Kinasa C α . Sin embargo, en este animal no encontramos diferencias en el grado de inmunorreactividad de la proteína entre soma y terminal axónica. Una adecuada explicación podría ser la participación de las células melanopsínica con arborizaciones a nivel de la CPE (véase lámina 5); quizás exista una tarea por parte de estas células fotosensibles que implique cierto carácter regulador a nivel de las células horizontales. Una alteración en el funcionamiento del cotransportador NKCC1, por la ausencia de una hipotética regulación por células portadoras de melanopsina, podría explicar esta falta de transporte de la PKC α de soma a terminal en el *Opn4KO*.

Tirosina Hidroxilasa (TH).

Los resultados del análisis de inmunorreactividad para la señal a Tirosina Hidroxilasa (TH) no ofrecen ninguna diferencia significativa a los distintos tiempos, e incluso tampoco entre los distintos modelos animales utilizados. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con otros que muestran una uniformidad en la señal de las células positivas a TH, tanto para muestras obtenidas en luz como en otras con exposición a absoluta oscuridad (Witkovsky et al, 2000). Sin embargo, sí se han observado diferencias en la señalización entre ambos escenarios (luz/oscuridad) utilizando anticuerpos contra las distintas fosforilaciones de TH (Witkovsky et al, 2000). En nuestra opinión, quizá el método de Inmunofluorescencia no parece el más adecuado para comprobar una regulación dependiente de la luz por dos motivos: el anticuerpo utilizado puede actuar contra toda expresión de TH (activa o no) y las células TH positivas, en los cortes de sección de 14 μ m, no tienen por qué presentar la misma zona de la célula, lo que redundaría en una diferente intensidad de la señal.



No obstante, la expresión de la proteína en la fracción citosólica observada por técnica de Western blot presenta un claro patrón circadiano tanto en los animales Rd10 como en los controles sanos. Mediante esta técnica podemos distinguir nuestra proteína en sus diferentes formas a través del peso, presentando así una migración diferente por el gel de SDS-poliacrilamida. La enzima sigue expresándose en los cuatro tiempos a pesar de que halla momentos de máxima liberación de sus productos. Esto sería lógico si atendemos a que las catecolaminas liberadas no reflejan una disminución de sus niveles en el tejido, ya que existe una síntesis compensatoria, debida a la constante actividad de la enzima ([Dunkley et al, 2000](#)). En la fase de luz del ciclo diurno hemos podido cuantificar la máxima expresión de la enzima para los tres modelos animales. La presencia de un cualquier tipo de célula fotosensible, ya sean conos y bastones o bien células melanopsínicas, permite la regulación de la expresión de TH. Este resultado también concuerda con estudios previos que demuestran la presencia del producto de la expresión de TH, la dopamina, en ratones distróficos ([Doyle et al, 2002](#)). En el ratón Rd10 la presencia de células melanopsínicas posibilita la regulación circadiana de la expresión de la enzima.



CAPÍTULO 2: ELECTORRETINOGRAFÍA.

ESTUDIO FUNCIONAL FOTÓPICO DE LA RETINA: CURVAS DE SENSIBILIDAD INTENSIDAD-RESPUESTA.

Uno de los objetivos planteado en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue el de conocer el papel de los fotorreceptores ubicados en la retina interna (ipRGCs) sobre los mecanismos de adaptación a la luz y oscuridad; en este sentido, nos propusimos estudiar la funcionalidad de la retina por técnica de registro electroretinográfico. El estudio de la respuesta electroretinográfica de animales control en diferentes escenarios, de estimulación o no estimulación de las ipRGC, nos permitió relacionar la función de dichas células con la fase circadiana o con la intensidad de la luz ambiental.

El empleo de la técnica electroretinográfica nos ha permitido realizar una descripción de los ritmos diurnos en base a la amplitud de las respuestas derivadas de la vía de los conos en la retina. En estos experimentos hemos utilizado como herramienta la evaluación de la sensibilidad retiniana a la luz, medida en términos de curva intensidad-respuesta (I/R) en retinas adaptadas a la luz (registros obtenidos bajo una luz de fondo). Los grupos analizados en las condiciones lumínicas naturales del ciclo luz/oscuridad mostraron una significativa diferencia en la curva I/R. El grupo registrado en la fase de luz (ZT08) presentó unas respuestas mayores para la misma intensidad de estímulo que el grupo registrado en la fase de oscuridad (ZT20).

La variación en la amplitud de las ondas ante una misma intensidad puede ser debida al momento del ciclo luz/oscuridad en el que se realiza el registro. Para determinar si estas diferencias respondían a una dependencia del ritmo circadiano realizamos el registro en dos grupos con condiciones lumínicas subjetivas. Las amplitudes de las ondas obtenidas en dichas condiciones subjetivas (CT) fueron relacionadas con los resultados obtenidos de grupos anteriores, diferenciados en función de la presencia o no de luz. Los grupos CT20 y ZT08 presentaron respuestas con amplitudes similares entre sí; e igual ocurrió al comparar las amplitudes de respuesta entre los otros dos grupos, CT08 y ZT20. El análisis conjunto de los cuatro grupos

permite concluir que la sensibilidad lumínica no depende del ritmo circadiano sino del estado previo de iluminación retiniana.

Dado que el efecto sobre la amplitud de las respuestas puede estar directamente relacionado a la presencia de luz, quisimos analizar el posible papel de las células melanopsínicas (*ipRGC*). La melanopsina es menos sensible a la luz que los fotorreceptores clásicos y su respuesta es 100 veces más lenta (Fu et al, 2005). Debido a esta característica, los escenarios utilizados presentaron una intensidad en la fase de luz insuficiente para la excitación de las células melanopsínicas. Los resultados obtenidos muestran que cuando las *ipRGC* no son estimuladas las curvas de intensidad de la respuesta en los cuatro grupos experimentales son similares, no presentando diferencias estadísticas entre los grupos. A la vista de los resultados podemos concluir que la respuesta electroretinográfica de la retina se ve modificada en función de la actuación de las *ipRGCs*. Este mecanismo funcional, apuntado ya por Barnard y colaboradores (Barnard et al, 2006) mediante el estudio en ratones carentes de células melanopsínicas, es demostrado en la presente Tesis Doctoral utilizando una aproximación experimental puramente fisiológica, como es el ajuste de la estimulación de las células ganglionares melanopsínicas.

ESTUDIO FUNCIONAL FOTÓPICO DE LA RETINA: SENSIBILIDAD LUMÍNICA A LO LARGO DE UN PERIODO DE ADAPTACIÓN.

En el estudio de la actividad funcional de la retina mediante técnica de ERG, los elementos preferentes para el análisis de las respuestas son las deflexiones de las ondas registradas: *onda a* y *onda b* (Fishman et al, 2001; Lam, 2005). Como ya quedó expuesto en el apartado de *Introducción*, cada onda del ERG ante un estímulo conocido en intensidad y duración refleja la actividad de determinados tipos celulares de la retina. En este sentido la *onda a* es consecuencia de las hiperpolarizaciones ocurridas en las células tras el estímulo, siendo mayoritariamente los fotorreceptores los que la conforman; asimismo, la *onda b* se debe a despolarizaciones celulares y se asocia principalmente al papel desplegado por las células bipolares *ON*. La técnica electroretinográfica aplicada de acuerdo a las normas de la ISCEV permite también registrar los potenciales oscilatorios sobre la *onda b* (Cameron et al, 2008). Algunos



trabajos muestran registros de las respuestas del ERG bajo condiciones de filtrando de los potenciales oscilatorios. La intención de dichos trabajos es la obtención de la *onda b* de forma aislada. Eliminadas las ondas con frecuencias más altas (potenciales oscilatorios) la *onda b* resultante viene a ser llamada por algunos autores como la “*onda b* corregida”.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha optado por el análisis de la amplitud máxima de las diferentes ondas, no corregidas. Esta opción la explicamos por he hecho de que las ondas que conforman las respuestas del ERG nunca son consecuencia de un solo tipo celular o un proceso aislado, más bien se deben a la integración de una serie de éstos. Por ello, obviar voluntariamente partes de la respuesta no hace más que favorecer el error del análisis. Sobre esta base, el análisis de la *onda b* se ha realizado tomando la amplitud sobre el segundo pico máximo de dicha deflexión, ya que primer pico (normalmente el de mayor amplitud) en ocasiones mostraba una tendencia descendente. Para poder estandarizar el análisis en todos los grupos se optó por el segundo pico máximo, descartando la “*onda b* corregida” por lo ya expuesto.

Como ya sabemos, las ipRGCs presentan una baja sensibilidad a la luz; por ello son necesarias intensidades de luz más altas y tiempos de exposición más largos para su excitación, en comparación con los fotorreceptores clásicos (conos y bastones). Ya hemos mostrado en el apartado anterior que las ipRGC actúan también modulando la sensibilidad retiniana en condiciones fotópicas. Cabría esperar que al realizar un registro de la actividad funcional de la retina en un animal que procede de unas condiciones lumínicas ambientales determinadas (por ejemplo, luz muy intensa como la de un día soleado), observaríamos variaciones en su ERG si dichas condiciones lumínicas fuesen modificadas a la hora de hacer el registro (p.ej. luces de baja intensidad, crepusculares); es decir, sus respuestas variarían en amplitud si las condiciones lumínicas no fuesen las mismas durante el experimento que en el nicho ecológico del que procede el animal. Estos cambios en la respuesta dependerán de ambas intensidades de luz, la que el animal experimenta en su ciclo día/noche y la expuesta a la hora de realizar el experimento. Por todo lo dicho, se decidió dar una nomenclatura a los grupos experimentales derivada de su ritmo circadiano, nivel lumínico de su nicho ecológico y nivel de iluminación de fondo durante el experimento de registro electroretinográfico.



El primer grupo experimental, ZT20 0_200, presenta una clara tendencia ascendente. Las diferencias *extremadamente significativas* entre los dos extremos del protocolo, podrían justificarse por la luz recibida por las ipRGCs a lo largo de los 60 minutos. Una intensidad lumínica suficiente para la estimulación de las ipRGCs produce una modulación de la actividad de la retina que se traduce en una mayor amplitud de la *onda b* fotópica.

En un segundo grupo experimental, ZT08 200_20, caracterizado por tener tanto conos como ipRGCs bajo iluminación el inicio del protocolo del experimento, ante un registro llevado a cabo en condiciones de baja intensidad de luz de fondo cabría esperar una reducción en la amplitud de la *onda b* con respecto al primer registro del protocolo. Sin embargo, nos encontramos con que no se presentan diferencias significativas entre los dos extremos comparados. Si comparamos este resultado con el discutido anteriormente, podríamos argumentar que en el segundo caso no vemos variación por el hecho de que 60 minutos de ausencia de iluminación de las ipRGC es insuficiente para revertir el incremento de sensibilidad inducido por su activación. Es posible que, mientras que el tiempo de 60 minutos es suficiente para activar el mecanismo sensibilizante mediado por las ipRGCs, no sea todo lo necesariamente prolongado para observar una completa inhibición de las mismas.

En un tercer grupo experimental, ZT08 20_200, siguiendo el mismo razonamiento, los resultados deberían ser miméticos a los del ZT20 0_200 ya que la relación entre inicio y fin del protocolo es la misma; las ipRGCs pasan de unas condiciones donde no están siendo iluminadas a otras en las que son estimuladas. Al analizar las amplitudes de la *onda b* observamos que las diferencias son muy significativas entre los extremos comparados.

El cuarto y último grupo, ZT08 20_20, plantea un escenario en el que ni han estado estimuladas las ipRGC en el nicho ecológico del animal ni lo estarán durante el registro electroretinográfico. El resultado, no obstante, es extraordinariamente distinto a la hipótesis planteada. Una primera explicación podría ser la de pensar en el tamaño de la *n* de estudio, cabe la posibilidad que el número de cinco animales no sea suficiente para observar el desarrollo de la hipótesis establecida. Esto se apoya en el análisis del



segundo grupo, donde lo que se suponía iba a ser una disminución en la amplitud se refleja realmente como un estancamiento de ésta. La otra posible explicación está relacionada con los puntos del protocolo que estamos comparando (véase más abajo).

En esta Tesis Doctoral se plantea el análisis de la onda *a* como dato que apoyaría los resultados de las mediciones de la onda *b*. El resultado para el análisis de este nuevo componente del ERG deberá ser inverso al obtenido anteriormente en base a lo anteriormente explicado.

Como ya hemos comentado, la onda *a* se asocia a la respuesta de fotorreceptores. Concretamente, la onda *a* de bastones, ha sido descrita por un modelo cuantitativo, que deriva de respuestas únicas de bastones y etapas bioquímicas de la fototransducción (Hood y Birch, 1990a; Lamb y Pugh, 1992; Breton et al, 1994). Estudios electroretinográficos realizados en condiciones escóticas, sobre humanos muestran un aumento de la amplitud de la onda *a* ante una batería de estímulos crecientes en intensidad (Hood y Birch, 1990b). Estos trabajos definen la onda *a* como un reflejo directo de la *fotocorriente* generada en los bastones (Breton et al, 1994; Paupoo et al, 2000). Por tanto, podemos afirmar que la onda *a* se debe en gran medida a la actividad eléctrica generada por la fototransducción, sobre la que ejerce una importante contribución las hiperpolarizaciones postsinápticas a los conos. En este sentido, se han publicado trabajos de registro electroretinográfico que han demostrado la relación directa de las transmisiones hiperpolarizantes a neuronas de 2º y 3º orden con la onda *a* del ERG de Campo lleno. Asimismo, el hecho de que la inyección intravítrea de PDA (ácido cis-2,3 piperidin descarboxílico), que bloquea esa transmisión entre conos y células postsinápticas produce un efecto reductor de la onda *a* fotópica (Bush y Sieving, 1994; Robson et al, 2003; Xu et al, 2003; Sharma et al, 2005; Miura et al, 2009).

Se han descrito mecanismos de modulación de la actividad eléctrica de la retina mediados por dopamina, y que pudieran afectar a la onda *a* del registro electroretinográfico. Como ya describimos en el apartado de *Introducción*, la *fotocorriente* o *corriente de oscuridad* se encuentra regulada por la acción de una bomba Na^+/K^+ ATPasa, y tanto la bomba Na^+/K^+ como los la señal transmitida a través

de la vía de los conos podrían estar moduladas por la dopamina liberada en la retina (Cohen et al, 1992; Shulman y Fox, 1996; Witkovsky, 2004). Además la dopamina actúa a nivel de las células horizontales reduciendo la permeabilidad a través de las conexiones eléctricas existentes entre ellas (McMahon et al, 1994; He et al, 2000). En este sentido, dado que las células horizontales son las encargadas los mecanismos de inhibición lateral en la primera sinapsis de la vía visual, entre conos y bipolares, podríamos pensar que menos horizontales conectadas producen menos inhibiciones y esto podría ser registrado como “menos amplitud” en la *onda a* del ERG. Para completar nuestra hipótesis ya solo quedaría establecer una conexión entre la dopamina y el posible papel de las ipRGC.

Para este bloque de análisis experimental de la *onda a*, el estudio de los puntos inicial y final (tiempo = 0 y tiempo = 60 min), correspondientes a los registros primero y último del protocolo, ofrece diferencias significativas únicamente en el grupo ZT08 200_20. Dicho protocolo permitía observar las consecuencias de la inhibición de la acción de las ipRGCs sobre la funcionalidad de la retina. Los resultados permiten observar un aumento de la amplitud de la *onda a* en un tiempo de 60 minutos. Curiosamente, el resto de grupos, que inician el registro con las ipRGCs no estimuladas, presentan diferencias no significativas entre los extremos comparados del protocolo. Podríamos esperar una tendencia descendente en el caso de los grupos ZT20 0_200 y ZT08 20_200 por ser los casos directamente opuestos al ZT08 200_20, sin embargo, al igual que en el análisis de la *onda b*, a la hora de esperar un descenso en las respuestas éstas se mantienen sin cambios en la amplitud.

Para nosotros, lo más llamativo es el resultado especular de los resultados del análisis de la *onda a* y de la *onda b*. Cuando los resultados ofrecen un aumento de la amplitud de la *onda b* el análisis de la *onda a* no presenta diferencias estadísticas y cuando la *onda b* no tiene diferencias significativas la *onda a* sí las presenta. Este comportamiento especular podría interpretarse como que ambos dependen del mismo mecanismo de modulación funcional.

Existe otro aspecto a tener en cuenta a la hora de analizar las *ondas a* y *b* del electroretinograma del último grupo de experimentos descritos. Como ya hemos comentado, los registros correspondientes a los tiempos *0 min* y *60 min* forman parte de



una sucesión de estímulos que comienza con un primer estímulo a $-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ y finaliza con la aplicación de un estímulo a $2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Entre ellos se aplicaron otros ocho estímulos con intensidad creciente acotada entre los valores mencionados. La secuencia de *flashes* de distinta intensidad de estímulo son aplicados inmediatamente uno detrás de otro, con un tiempo entre ellos de pocos segundos. Por todo ello quizá se debería realizar el análisis de la progresión de las *ondas a* y *b*, comparando los registros obtenidos a los 10 minutos y a los 50 minutos, en los que no existe una "acumulación" de estímulos. El análisis estadístico de la *onda a*, realizado para cada grupo, comparando los tiempos *10 min* y *50 min*, ofrece los mismos resultados que los presentados con el análisis de los tiempos *0 min* y *60 min* (**Figura 76**).

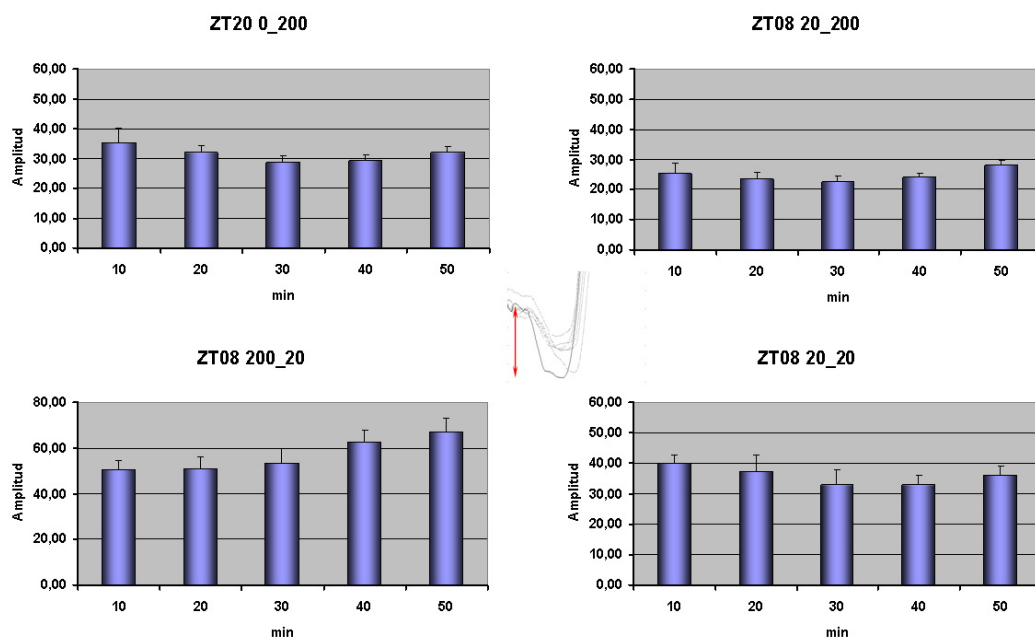


Fig76. Análisis corregido de la onda a en los diferentes grupos experimentales. Los cuatro grupos experimentales ofrecen unos valores estadísticos igual que los obtenidos al comparar los tiempos 0 y 60 minutos de registro. Las tendencias para cada grupo son más claras en esta representación.

De la misma manera, este ajuste podemos realizarlo también al analizar la *onda b*. (**Figura 77**). En este caso las diferencias estadísticas son muy significativas para el grupo ZT20 0_200, no significativas para ZT08 20_200, no significativas para el grupo ZT08 200_20, objetivando la “horizontalidad” de la representación gráfica con este resultado estadístico, y no significativas para el grupo ZT08 20_20, que como habíamos postulado, ocurriría al no estar estimuladas las ipRGCs. Para cada uno de los grupos, la comparación de los registros en los extremos tiempos, se realizó utilizando la *t de Student*, con la corrección de *Welch*.

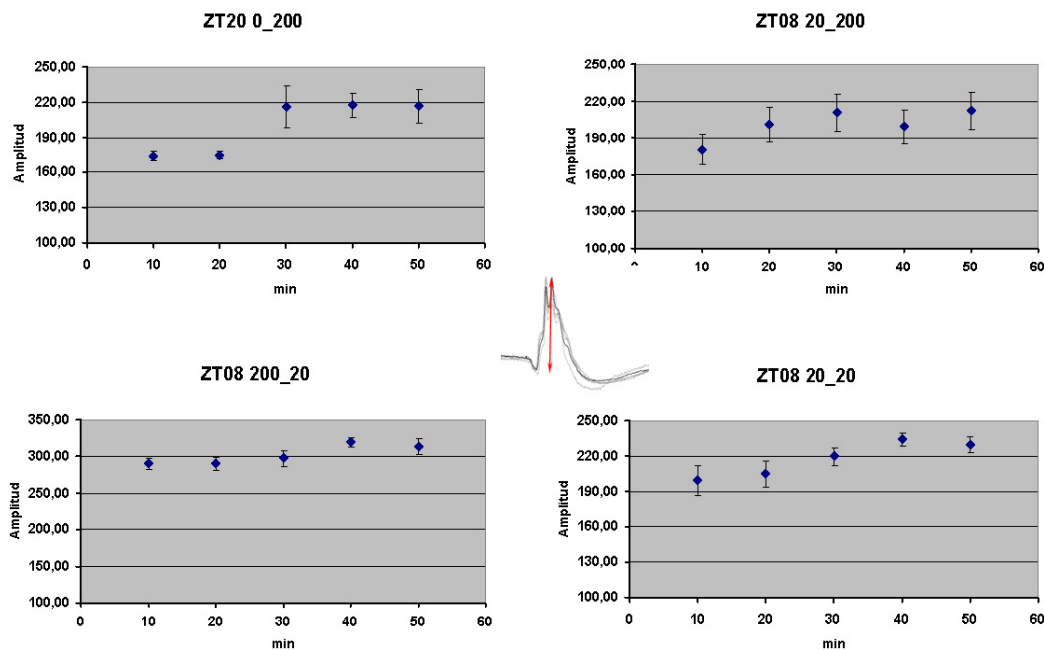


Fig77. Análisis corregido de la onda b en los diferentes grupos experimentales. Los cuatro grupos ofrecen una relación estadística acorde a la hipótesis planteada, con alguna diferencia a la obtenida al comparar los tiempos 0 y 60 minutos de registro. Las tendencias para cada grupo son más claras en esta representación.



CAPITULO 3: ACTIVIDAD CIRCADIANA.

La naturaleza endógena de los ritmos circadianos requiere de un regulador central o reloj interno. Sobre este punto, los mamíferos poseen la capacidad de ajustar los ritmos circadianos gracias a ese regulador central que se encuentra a nivel del hipotálamo y es el núcleo supraquiasmático (NSC). La función del NSC es la de conducir y coordinar los diferentes relojes periféricos a través de vías hormonales y neurales aún no muy bien estudiadas. La luz que adaptará los ritmos circadianos alcanza el NSC a través del *tracto retinohipotalámico*. Esta vía comienza, en los mamíferos, a nivel de la retina mediante el fenómeno de fototransducción acontecido en las células con capacidad de fototransducción. En la actualidad, tres son los tipos de células con dicha capacidad: conos, bastones y las recientemente descubiertas células portadoras de melanopsina. Los fotorreceptores clásicos más las células melanopsínicas, juegan un papel clave en la regulación circadiana del organismo completo a través de las señales que dirigen al SCN y de éste al resto del cuerpo.

Nuestro organismo es capaz de reiniciar la información relativa al ciclo diario en las neuronas encargadas de la regulación circadiana. Los ejemplos más conocidos de reinicialización de las temporalidades de este NSC son el “jet lag” y el reajuste de la actividad en aquellas personas que desarrollan trabajos nocturnos.

En los últimos experimentos mostrados en la presente Tesis Doctoral hemos reproducido los cambios en las fases de oscuridad y luz del ciclo día/noche que suceden en viajes con importantes saltos de franja horaria. Podemos asociar el alargamiento de fase a un vuelo transoceánico al continente norte-americano en su costa este; de igual manera los acortamientos de fase podrían entenderse como un vuelo a extremo Oriente, con respecto a la posición de España. Los viajes de este tipo conllevan unos desajustes entre el ciclo diurno (24h) del país de destino y el ritmo circadiano del individuo, que se encuentra sincronizado con el ciclo de 24h de su país de origen.

Lo primero que hemos analizado es si esos cambios en el ritmo circadiano endógeno son diferentes o iguales de darse bien en la fase de luz, bien en la fase de



oscuridad. En ratones *wt*, en el supuesto de *Acortamiento de fase*, el tiempo de recuperación de la sincronización con el nuevo ciclo diurno ocurre igual si éste es procedente de un cambio en la fase de luz o lo es de oscuridad. Este tiempo de “resincronización”, medido mediante la constante de tiempo (τ), presenta valores similares en ambos supuestos de acortamiento de fase. En este mismo modelo animal, al referirnos al *Alargamiento de fase*, la constante de tiempo es algo mayor si el cambio se produce en la fase de luz, sin que hayamos encontrado una justificación para ello.

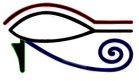
En segundo lugar nos hemos centrado en las diferencias que parecen existir entre la “resincronización” que tiene lugar en el supuesto de un *Acortamiento* versus el supuesto de un *Alargamiento* de fases. Nuestros resultados muestran una clara diferencia de la constante de tiempo medida en un grupo experimental y en el otro. Dado que no existen diferencias en la constante de tiempo si el desfase se produce en la fase de luz o en la fase de oscuridad, podemos asumir que las diferencias son debidas al alargamiento vs acortamiento y no a las condiciones lumínicas de dicho acortamiento/alargamiento.

Para comprender mejor el papel de las diferentes células fotosensibles en este proceso de “resincronización” se analizó, en los mismos supuestos, los resultados obtenidos de animales con degeneración retiniana, obteniendo resultados similares. Un gran número de estudios de comportamiento y actividad circadiana, realizados en animales con pérdida de fotorreceptores clásicos y animales *knock-out* de melanopsina (Panda et al, 2002; Ruby et al, 2002; Forns, 2008) han documentado la importancia de las distintas células fotosensibles en la regulación de los cambios de fase inducidos por luz. En todos ellos se demuestra que las ipRGCs son suficiente para mantener sincronizada la actividad del animal al ciclo luz/oscuridad. Sorprendentemente la recuperación de la sincronía sucede en los ratones Rd10 de idéntico modo al de los ratones sanos, es decir, la constante de tiempo es mayor en el supuesto de *Acortamiento de fase* que en el de *Alargamiento de fase*; y las horas de desajuste que presenta el animal, en el día del cambio, son mayores en el primer escenario que en el segundo. El uso de un modelo experimental sin conos y bastones (Rd10) hace suponer que una retina con células melanopsínicas funcionales es suficiente para el reajuste del ritmo



circadiano de forma más rápida en el escenario de *Acortamiento de fase*, bien sea ésta de luz o de oscuridad.

Por lo tanto podemos argumentar que el desajuste horario producido por un aumento en cualquiera de las fases luz/oscuridad del ciclo de 24 horas es menor y de más rápida recuperación que el caso de un recorte similar en ese ciclo diurno. Metafóricamente, producen menos estrés o desajuste los vuelos a EE.UU que a Oriente.



CONCLUSIONES



Del análisis del **Capítulo 1** relativo al estudio de proteínas involucradas en mecanismos de adaptación lumínica, concluimos que:

1. La Proteína Kinasa C α (PKC α) muestra en retina de ratón un patrón de expresión que se ajusta a un ritmo circadiano. Nuestros resultados sugieren dicha expresión podría estar modulada por la melanopsina.
2. El transporte de la Proteína Kinasa C α de soma a terminal axónico es inducido por efecto de la estimulación lumínica. Tanto la ausencia de fotorreceptores clásicos como de melanopsina podrían ser causa de la alteración en dicho transporte.
3. La expresión del cotransportador sodio-potasio-cloro (NKCC1) en células horizontales y células bipolares de tipo ON en la retina de ratón depende de la presencia de fotorreceptores clásicos. Esta molécula podría intervenir en los mecanismos celulares de adaptación en células postsinápticas de dichos fotorreceptores.
4. La enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) presenta un patrón de expresión circadiana en la retina de ratón, mostrando un máximo de expresión en las horas de luz.
5. Para regular el comportamiento de expresión proteica que se ajusta a un ritmo circadiano sería necesaria y suficiente la presencia de al menos un tipo celular con capacidad fotosensible.



Del análisis del **Capítulo 2**, relativo a mecanismos de adaptación lumínica evaluados mediante análisis de las respuestas funcionales electrorretinográficas, podemos concluir:

6. La sensibilidad lumínica de la retina en el ratón depende de la iluminación recibida y no del ritmo circadiano. El aumento en sensibilidad lumínica inducido por un incremento de iluminación es dependiente de las células ganglionares portadoras de Melanopsina.

Del análisis de **Capítulo 3**, relativo a los mecanismos de adaptación lumínica derivada de la resincronización de la actividad circadiana, podemos concluir que:

7. El cambio de fase horaria que conlleva un reajuste de la actividad del organismo al nuevo ciclo luz/oscuridad no depende de la fase de oscuridad o luz en la que se haya producido el desfase. Sin embargo, la recuperación tras dichos desfases horarios es significativamente más larga cuando se ha producido un acortamiento de la fase que cuando se produce un alargamiento de la misma.
8. Este comportamiento de recuperación de la sincronía no depende de la actividad de los fotorreceptores clásicos, sino tan solo de las células ganglionares que expresan Melanopsina.

Bibliografía



- Abreu, B.J.; Guimaraes, M.; Uliana, L.C.; Vigh, J.; von Gersdorff, H.; Prado, M.A.; Guatimosim, C. (2008)
 "Protein kinase C modulates synaptic vesicle acidification in a ribbon type nerve terminal in the retina"
Neurochemistry International, **53**: 155–164.
- Alberst, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1996)
 "Biología Molecular de la Célula"
 Tercera Edición. Ediciones Omega, S.A. Impreso en España.
Capítulos 7, 11 y 15.
- Albert, K.A.; Heliner-Matyjek, F.; Nairn, A.C.; Muller, T.H.; Flaycock, J.W.; Greene, F.A.; Goldstein, M.; Greengard, P. (1984)
 "Calcium/phospholipid-dependent protein kinase I (protein kinase C) phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **81**: 7713-7717.
- Altimus, C.M.; Güler, A.D.; Villa, K.L.; McNeill, D.S.; LeGates, T.A.; Hattas, S. (2008)
 "Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **105**: 19998–20003.
- Arendt, D. y Wittbrodt, J. (2001)
 "Reconstructing the eyes of Urbilateria"
Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, **356**: 1545-1563
- Arendt, D. (2003)
 "Evolution of eyes and photoreceptor cell types"
The International Journal of Developmental Biology, **47**: 563-571.
- Arendt, D.; Tessmar-Raible, K.; Snyman, H.; Dorresteyn, A.W.; Wittbrodt, J. (2004)
 "Ciliary Photoreceptors with a Vertebrate-Type Opsin in an Invertebrate Brain"
Science, **306**: 869-871.
- Arshavsky, V.Y.; Lamb, T.D.; Pugh, E.N. Jr. (2002)
 "G proteins and phototransduction"
Annual Review of Physiology, **64**: 153–187.
- Bailey, T.J.; El-Hodiri, H.; Zhang, L.; Shah, R.; Mathers, P.H.; Jamrich, M. (2004)
 "Regulation of vertebrate eye development by Rx genes"
The International Journal of Developmental Biology, **48**: 761-770.
- Baldrige, W.H.; Vaney, D.I.; Weiler, R. (1998)
 "The modulation of intercellular coupling in the retina"
Seminars in Cell and Developmental Biology, **9**: 311-318.
- Barhoum, R. (2006)
 "Caracterización Estructural y Electrofisiológica de la Degeneración Retiniana en Ratonés Rd"
 Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.
- Barnard, A.R.; Hattar, S.; Hankins, M.K.; Lucas, R.J. (2006)
 "Melanopsin Regulates Visual Processing in the Mouse Retina"
Current Biology, **16**: 389–395.



- Barnes, R.D. y Ruppert, E.E. (1995)
"Zoología de los Invertebrados"
McGraw Hill Interamericana, **Capítulos: 4-19**.
- Bauer, B.; Ehinger, B.; Aberg, L. (1980)
"[3H]-Dopamine Release from the Rabbit Retina"
Albrecht von Graefes Arch. Klin. Ophthalmol., **215**: 71-78.
- Baumann, L.; Gerstner, A.; Zong, X.; Biel, M.; Wahl-Schottl, C. (2004)
"Functional Characterization of the L-type Ca₂₊ Channel Cav1.4_1 from Mouse Retina"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **45**: 708-713.
- Baver, S.B.; Pickard, G.E.; Sollars, P.J.; Pickard, G.E. (2008)
"Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus"
The European Journal of Neuroscience, **27**: 1763-1770.
- Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. (1996)
"Neuroscience: Exploring the Brain"
Williams & Wilkins. Pennsylvania, USA.
- Belenky, A.M.; Smeraski, C.A.; Provencio, I.; Sollars, P.; Pickard, G.E. (2003)
"Melanopsin Retinal Ganglion Cells Receive Bipolar and Amacrine Cell Synapses"
The Journal of Comparative Neurology, **460**: 380-393.
- Bellingham, J.; Chaurasia, S.S.; Melyan, Z.; Liu, C.; Cameron, M.A.; Tartelin, E.E.; Iuvone, P.M.; Hankins, M.W.; Tosini, G.; Lucas, R.L. (2006)
"Evolution of Melanopsin Photoreceptors: Discovery and Characterization of a New Melanopsin in Nonmammalian Vertebrates"
PLoS Biology, **4**: 1334-1343.
- Berson, D.M.; Dunn, F.A.; Takao, M. (2002)
"Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock"
Science, **295**: 1070-1073.
- Berson, D. (2003)
"Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors"
Trends in Neurosciences, **26**: 314-320.
- Berson, D. (2007)
"Phototransduction in Ganglion Cell Photoreceptors"
European Journal Physiology, **454**: 849-855.
- Blanco, R.; Vaquero, C.F.; de la Villa, P. (1996)
"The effects of GABA and glycine on horizontal cells of the rabbit retina"
Vision Research, **36**: 3987-3995.
- Blobe, G.C.; Stribling, S.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. (1996)
"Protein kinase C isoenzymes: regulation and function"
Cancer Surveys, **27**: 213-248.
- Borg-Graham, L.J.; Grzywacz N.M. (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.



- Bormann, J. y Feigenspan, A. (1995)
"GABA_A receptors"
Trends in Neurosciences, **18**: 515-519.
- Bowmaker, J.K. (2008)
"Evolution of vertebrate visual pigments"
Vision Research, **48**: 2022-2041.
- Bradford, M.M. (1976)
"A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding"
Analytical Biochemistry, **72**: 248-254.
- Brändstatter, J.H.; Koulen, P.; Wässle, H. (1998)
"Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina"
Vision Research, **38**: 1385-1397.
- Breton, M.E.; Schueller, A.W.; Lamb, T.D.; Pugh Jr., E.N. (1994)
"Analysis of ERG a-Wave Amplification and Kinetics in Terms of the G-Protein Cascade of Phototransduction"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **35**: 295-309.
- Brown, K.T. y Murakami, M. (1964)
"Biphasic form of the early receptor potential of the monkey retina"
Nature, **204**: 739-740.
- Burns, M.E. y Arshavsky, V.Y. (2005)
"Beyond Counting Photons: Review Trials and Trends in Vertebrate Visual Transduction"
Neuron, **48**: 387-401.
- Bush, R.A. y Sieving, P.A. (1994)
"A Proximal Retinal Component in the Primate Photopic ERG a-Wave"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **35**: 635-645.
- Cajal, S.R. (1893)
"La rétine des vertèbres"
La Cellulé, **9**: 17-257.
- Cajal, S.R. (1904)
"Histología del Sistema Nervioso"
Nicolás Moya. Madrid.
- Cameron, M.A.; Barnard, A.R.; Lucas, R.J. (2008)
"The electroretinogram as a method for studying circadian rhythms in the mammalian retina"
Journal of Genetics, **87**: 459-466.
- Cameron, M.A.; Pozdeyev, N.; Vugler, A.A.; Cooper, H.; Iuvone, P.M.; Lucas, R.J. (2009)
"Light regulation of retinal dopamine that is independent of melanopsin phototransduction"
The European Journal of Neuroscience, **29**: 761-767.
- Carter-Dawson, L.D.; LaVail, M.M.; Sidman, R.L. (1978)
"Differential effect of the *rd* mutation on rods and cones in the mouse retina"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **17**: 489-498.



- Carter-Dawson, L.D.; LaVail, M.M. (1979)
"Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine"
The Journal of Comparative Neurology, **188**: 263-272.
- Chalupa, L.M. y Günhan, E. (2004)
"Development of On and Off retinal pathways and retinogeniculate projections"
Progress in Retinal and Eye Research, **23**: 31-51.
- Chang, B.; Hawes, N.L.; Hurd, R.E.; Davisson, M.T.; Nusinowitz, S.; Heckenlively, J. R. (2002).
"Retinal degeneration mutants in the mouse"
Vision Research, **42**: 517-525.
- Chang, B.; Hawes, N.L.; Pardue, M.T.; German, A.M.; Hurd, R.E.; Davisson, M.T.; Nusinowitz, S.; Rengarajan, K.; Boyd, A.P.; Sidney, S.S.; Phillips, M.J.; Stewart, R.E.; Chaudhury, R.; Nickerson, J.M.; Heckenlively, J.R.; Boatright, J.H. (2007)
"Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the β -subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene"
Vision Research, **47**: 624-633.
- Chen, S.; Bawa, D.; Besshoh, S.; Gurd, K.W. (2005)
"Association of Heat Shock Proteins and Neuronal Membrane Components with Lipid Rafts from the Rat Brain"
Journal of Neuroscience Research, **81**: 522-529.
- Chow, R.L.; Lang, R.A. (2001)
"Early Eye Development in Vertebrates"
Annual Review of Cell and Developmental Biology, **17**: 255-296.
- Cibis, G.W.; Beaver, H.A.; Johns, K.; Kaushal, S.; Tsai, J.C.; Beretska, J.S. (2008)
"Fundamentos y Principios de Oftalmología. Sección 2"
Curso de Ciencias Básicas y Clínicas. Ed. American Academy of Ophthalmology, the Eye MD association
Ed. Elsevier España. Impreso en España. Capítulos: 1-4, 9-15.
- Cohen, A.I.; Todd, R.D.; Harmon, S.; O'Malley, K.L. (1992)
"Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylyl cyclase"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **89**: 12093-12097.
- Cook, J.E. y Becker, D.L. (1995)
"Gap junctions in the Vertebrate Retina"
Microscopy Research and Technique, **31**: 408-419.
- Collin, S.P.; Knight, M.A.; Davies, W.L.; Potter, I.C.; Hunt, D.M.; Trezise, E.O. (2003)
"Ancient colour vision: multiple opsin genes in the ancestral vertebrates"
Current Biology, **13**: R864-865
- Corrochano, S.; Barhoum, R.; Boya, P.; Arroba, A.I.; Rodríguez-Muela, N.; Gómez-Vicente, V.; Bosch, F.; de Pablo, F.; Pedro de la Villa, P.; de la Rosa, E.J. (2008)
"Attenuation of Vision Loss and Delay in Apoptosis of Photoreceptors Induced by Proinsulin in a Mouse Model of Retinitis Pigmentosa"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **49**: 4188-4194.



- Dacey, D.M.; Liao, H-W.; Peterson, B.B.; Robinson, F.R.; Smith, V.C.; Pokorny, J.; Yau, K-W.; Gamlin, P.D. (2005)
 "Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN"
Nature, **433**: 749-754.
- Darwin, Charles R. (1859)
 "El Origen de las Especies"
 Albor Libros, Ed. Alba Libros S.L. Impreso en España (2005); pp. 174 y siguientes.
- Davis, R.J.; Tavsanli, B.C.; Dittrich, C.; Walldorf, U.; Mardon, G. (2003)
 "Drosophila retinal homeobox (drx) is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development"
Developmental Biology, **259**: 272-87.
- 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, **75**: 3571-3582.
- de la Villa, P. y Blanco, R. (2004)
 "Métodos electrofisiológicos para el estudio de la función retiniana y sus alteraciones"
www.retinosis.org.
- Delpiere, E.; Rauchman, M.I.; Beir, D.R.; Hebert, S.C.; Gullans, S.R. (1994)
 "Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na-K-2Cl cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells"
The Journal of Biological Chemistry, **269**: 25677-25683.
- Dieterle, P. y Gordon, E. (1956)
 "Standard curve and physiological limits of dark adaptation by means of the goldmann-weekers adaptometer"
The British Journal of Ophthalmology, **40**: 652-655.
- Dinet, V.; Ansari, N.; Torres-Farfan, C.; Corp., H-W (2007)
 "Clock gene expression in the retina of melatonin proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice"
Journal of Pineal Research, **42**: 83-91.
- Do, M.T.H.; Kang, S.H.; Xue, T.; Zhong, H.; Liao, H-W.; Bergles, D.E.; Yau, K-W. (2009)
 "Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells"
Nature, **45**: 281-286.
- Doi, M.; Uji, Y.; Yamamura, H. (1995)
 "Morphological classification of retinal ganglion cells in mice"
The Journal of Comparative Neurology, **356**: 368-386.
- Doonan, F.; Donovan, M.; Cotter, T.G. (2005)
 "Activation of Multiple Pathways during Photoreceptor Apoptosis in the *rd* Mouse"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **46**: 3530-3538.
- Dowling, J.E. (1987)
 "The retina: An approachable part of the brain"
 Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.



- Dowling, J.E. (1992)
"Neurons and Networks: An introduction to Neuroscience"
The Belknap press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, London, England.
- Doyle, S.E.; McIvor, W.E.; Menaker, M. (2002)
"Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors"
Journal of Neurochemistry, **83**: 211–219.
- Doyle, S.E.; Castrucci, A.M.; McCall, M.; Provencio, I.; Menaker, M. (2006)
"Nonvisual light responses in the Rpe65 knockout mouse: Rod loss restores sensitivity to the melanopsin system"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **103**: 10432-10437.
- Dreher, B.; Sefton, A.J.; Ni, S.Y.; 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
- Dunkley, P.R.; Bobrovskaya, L.; Grahah, M.E.; von Nagy-Felsobuki, E.I.; Dickson, P.W. (2004)
"Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences"
Journal of Neurochemistry, **91**: 1025–1043.
- Eakin, R. (1968).
"Evolution of photoreceptors"
Appleton-Century-Crofts, New York.
- Eakin, R. (1982).
"Continuity and diversity in photoreceptors"
Visual cells in Evolution. Ed. J. A. Westfall, pp. 91-105. Raven Press, New York.
- Enroth-Cugell, C.; Robson J.G. (1966)
"The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat"
The Journal of Physiology, **187**: 517-552.
- Erelik, T.; Hartenstein, V.; McInnes, R.R.; Lipshitz, H.D. (2009)
"Eye evolution at high resolution: The neuron as a unit of homology"
Developmental Biology, **332**: 70-79.
- Fahrenkrug, J.; Falktoft, B.; Georg, B.; Rask, L. (2009)
"N-Linked Deglycosylated Melanopsin Retains Its Responsiveness to Light"
Biochemistry, **48**: 5142-5149.
- Fain, G.L.; Matthews, H.R.; Cornwall, M.C. (1996)
"Dark adaptation in vertebrate photoreceptors"
Trends in Neuroscience, **19**: 502-507.
- Fain, G.L.; Matthews, H.R.; Cornwall, M.C.; Koutalos, Y. (2001)
"Adaptation in Vertebrate Photoreceptors"
Physiological Reviews, **81**: 117-151.
- Famiglietti Jr., E.V.; Kaneko, A.; Tachibana, M. (1977)
"Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina"
Science, **198**: 1267-1269.



- Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994)
"Modulation of GABA_A receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C"
The Journal of Physiology, **MS 3656**: 325-330.
- Feigenspan, A.; Gustincich, S.; Bean, B.P.; Raviola, E. (1998)
"Spontaneous Activity of Solitary Dopaminergic Cells of the Retina"
The Journal of Neuroscience, **18**: 6776-6789.
- Fishman, G.A.; Birch, D.G.; Holder, G.E.; Brigell, M.G. (2001)
"Electrophysiologic Testing. In Disorders of the retina, Optic Nerve, and Visual Pathway"
Ophthalmology Monographs. Ed. The Foundation of The American Academy of Ophthalmology.
Printed in Singapore. **Capítulo 1.**
- Fletcher, E. y Kalloniatis, M. (1996)
"Neurochemical architecture of the normal and degenerating rat"
The Journal of Comparative Neurology, **376**: 343-360.
- Freedman, M.S.; Lucas, R.J.; Soni, B.; von Schantz, M.; Muñoz, M.; David-Gray, Z.; Foster, R.G. (1999)
"Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors"
Science, **284**: 502-504.
- Forns, N. (2008)
"Estudio Conductual y Estructural del Sistema Visual del ratón Rd10. Evaluación del Efecto Neuroprotector de la Proinsulina"
Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.
- Fu, Y.; Zhong, H.; Wang, M-H.H.; Luo, D-G.; Liao, H-W.; Maeda, H.; Hattar, S.; Frishman, L.J.; Yau, K-W. (2005)
"Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **102**: 10339-10344.
- Gabriel, R.; Lesauter, J.; Silver R.; García-España, A.; Witkovsky, P. (2001)
"Diurnal and Circadian Variation of Protein Kinase C Immunoreactivity in the Rat Retina"
The Journal of Comparative Neurobiology, **439**: 140-150.
- García Sevilla, J.A. (1996)
"Receptores para neurotransmisores"
Monografías de Neurociencias. Ediciones en Neurociencias S.L.
Impreso en España. pp. 233-248; 327-360.
- Gallego, A. (1964)
"Description d' une nouvelle couche cellulaire dans la rétine des mammifères et son rôle fonctionnel possible"
Bulletin du Association du Anatomiste, **49**: 624-631.
- Gallego, A. (1971)
"Células interplexiformes de la retina del gato"
Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, **31**: 299-304.
- Gallego, A. (1986)
"Comparative studies in horizontal cells and a note on microglial cells"
Progress in Retinal Research, **5**: 165-206.



- Gargini, C.; Terzibasi, E.; Mazzoni, F.; Strettoi, E. (2007)
"Retinal Organization in the Retinal Degeneration 10 (rd10) Mutant Mouse: A Morphological and ERG Study"
The Journal of Comparative Neurology, **500**: 222-238.
- Gavrikov, K.E.; Nilson, J.E.; Dmitriev, A.V.; Zucker, C.L.; Mangel, S.C. (2006)
"Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **103**: 18793-18798.
- Gehring, W.J. e Ikeo, K. (1999).
"Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution"
Trends in Genetics, **15**: 371-7.
- Gehring, W.J. (2004)
"Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors"
The International Journal of Developmental Biology, **48**: 707-717.
- Ghosh, K.K.; Bujan, S.; Haverkamp, S.; Feigenspan, A.; Wässle, H. (2004)
"Types of Bipolar Cells in the Mouse Retina"
The Journal of Comparative Neurology, **469**: 70-82.
- Giesbers, M.E.; Shirzad-Wasei, N.; Bosman, G.J.C.G.; de Grip, W.J. (2008)
"Functional Expression, Targeting and Ca²⁺ Signaling of a Mouse Melanopsin-eYFP Fusion Protein in a Retinal Pigment Epithelium Cell Line"
Photochemistry and Photobiology, **84**: 990-995.
- 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
- González-Menéndez, I.; Contreras, F.; Cernuda, R.; García-Fernández, J.M. (2009)
"Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina"
Frontiers in Neuroscience, **3**: 1-7.
- Gooley, J.J.; Lu, J.; Chou, T.C.; Scammell, T.C.; Saper, C.B. (2001)
"Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract"
Nature Neuroscience, **4**: 1165.
- Gooley, J.J.; Lu, J.; Fisher, D.; Saper, C.B. (2003)
"A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception"
The Journal of Neuroscience, **23**: 7093-7106.
- Graham, D.M.; Wong, K.Y.; Shapiro, P.; Frederick, C.; Pattabiraman, K.; Berson, D.M. (2008)
"Melanopsin Ganglion Cells Use a Membrane-Associated Rhabdomeric Phototransduction Cascade"
Journal of Neurophysiology, **99**: 2522-2532.
- Güller, A.D.; Ecker, J.; Lall, G.S.; Haq, S.; Altimus, C.M.; Liao, H-W.; Barnard, A.R.; Cahill, H.; Badea, T.C.; Zhao, H.; Hankins, M.W.; Berson, D.M.; Lucas, R.J.; Yau, K-W.; Hattar, S. (2008)
"Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision"
Nature, **453**: 102-106.



- Gupta, N.; Brown, K.E.; Milam, A.H. (2003)
"Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration"
Experimental Eye Research, **76**: 463-471.
- Gutiérrez-Torre, S.M. (1995)
"Retinosis Pigmentaria: Clasificación y Tratamiento"
Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo. Asociación Asturiana de Retinosis Pigmentaria. España.
- Guyton, A.C. y Hall, J.E. (2006)
"Tratado de Fisiología Médica"
Decimotercera edición. Ediciones Elsevier Saunders.
Impreso en España. **Capítulos: 49-50.**
- Hagins, W.A.; Penn, R.D.; Yoshikami, S. (1970)
"Dark Current and Photocurrent in Retinal Rods"
Biophysical Journal, **10**: 380-412.
- Hankins, M.K.; Peirson, S.N.; Foster, R.G. (2007)
"Melanopsin: an exciting photopigment"
Trends in Neurosciences, **31**: 27-36.
- Hannibal, J. y 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, S.M.; Georg, B.; Fahrenkrug, J. (2002a)
"The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract"
The Journal of Neuroscience, **22**: RC191
- Hannibal, J. (2002b)
"Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract"
Cell and Tissue Research, **309**: 73-88.
- Hannibal, J. y 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 ganglion cells"
Cell and Tissue Research, **306**: 99-113.
- Hannibal, J.; Georg, B.; Fahrenkrug, J. (2007)
"Melanopsin changes in neonatal albino rat independent of rods and cones"
NeuroReport, **18**: 81-85.
- Hardie, R.C. y Raghu, P. (2001)
"Visual transduction in *Drosophila*"
Nature, **413**: 186-193.



- Hatori, M.; Le, H.; Vollmers, C.; Keding, S.R.; Tanaka, N.; Schmedt, C.; Jegla, T.; Panda, S. (2008)
“Inducible Ablation of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells Reveals Their Central Role in Non-Image Forming Visual Responses”
PLoS One, **3**: 1-10.
- Hattar, S.; Liao, H.-W.; Takao, M.; Berson, D.M.; Yau, K.-W. (2002)
“Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity”
Science, **295**: 1065-1070.
- Hattar, S.; Lucas, R.J.; Mrosovsky, N.; Thompson, S.; Douglas, R.H.; Hankins, M.W.; Lemk, J.; Biel, M.; Hofmann, F.; Foster, R.G.; Yau, K.-W. (2003)
“Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice”
Nature, **424**: 75-81.
- Hattar, S.; Kumar, M.; Park, A.; Tong, P.; Tung, J.; Yau, K.-W.; Berson, D.M. (2006).
“Central Projections of Melanopsin- Expressing Retinal Ganglion Cells in the Mouse”
The Journal of Comparative Neurology, **497**: 326–349.
- Haverkamp, S. y Wässle, H. (2000)
“Immunocytochemical analysis of the mouse retina”
The Journal of Comparative Neurology, **424**: 1-23.
- Haverkamp, S.; Ghosh, K.K.; Hirano, A.A.; Wässle, H. (2003)
“Immunocytochemical Description of Five Bipolar Cell Types of the Mouse Retina”
The Journal of Comparative Neurology, **476**: 455-463.
- Haycock, J.W.; George, R.J.; Waymire, J.C. (1985)
“In situ phosphorylation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells: localization to soluble compartments”
Neurochem. Int., **7**: 301–308.
- Haycock, J.W. (1990)
“Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40”
The Journal of Biological Chemistry, **265**: 11682–11691.
- He, S. y Masland, R.H. (1997)
“Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells”
Nature, **398**: 378-382.
- He, S.; Weiler, R.; Vaney D.I. (2000)
“Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina”
The Journal of Comparative Neurology, **428**: 33-40.
- Hill, R.E.; Favor, J.; Hogan, B.L.; Ton, C.C.; Saunders, G.F.; Hanson, I.M.; Prosser, J.; Jordan, T.; Hastie, N.D.; Van Heyningen, V. (1991).
“Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene”
Nature, **354**: 522-525.
- Hodgkin, A.L. y O'Bryan, P. (1977)
“Internal recordings of the early receptor potential in turtle retina”
The Journal of Physiology, **267**: 737-766.



- Hofer, H.; Carroll, J.; Neitz, J.; Neitz, M.; Williams, D.R. (2005)
"Organization of the Human Trichromatic Cone Mosaic"
The Journal of Neuroscience, **25**: 9669–9679.
- Hood, D.C. y Birch, D.G. (1990a)
"A quantitative measure of the electrical activity of human rod photoreceptors using electroretinography"
Visual Neuroscience, **5**: 379-387.
- Hood, D.C. y Birch, D.G. (1990b)
"The A-Wave of the Human Electroretinogram and Rod Receptor Function"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **31**: 2070-2081.
- Hood, D.C. y Greenstein, V.C. (2003)
"Multifocal VEP and ganglion cell damage: applications and limitations for the study of glaucoma"
Progress in Retinal and Eye Research, **22**: 201-251.
- Hubel, D.H. (1999)
"Ojo, Cerebro y Visión"
Editado por W.H. Freeman and Company
Capítulos 1-5. Servicio de publicaciones, Universidad de Murcia.
- Huang, K-P. (1989)
"The mechanism of protein kinase C activation"
Trends in Neurosciences, **12**: 425-432.
- Huang, K-P. y Huang, F.L. (1993)
"How is Protein Kinase C Activated in CNS"
Neurochemistry International, **22**: 417-433.
- Ichinose, T.; Lukasiewicz, P.D. (2007)
"Ambient Light Regulates Sodium Channel Activity to Dynamically Control Retinal Signaling"
The Journal of Neuroscience, **27**: 4756–4764.
- Inoue, M.; Kishimoto, A.; Takai, Y.; Nishizuka, Y. (1977)
"Studies on a Cyclic Nucleotide-independent Protein Kinase and Its Proenzyme in Mammalian Tissues. II. PROENZYME AND ITS ACTIVATION BY CALCIUM-DEPENDENT PROTEASE FROM RAT BRAIN"
The Journal of Biological Chemistry, **252**: 1610-1616.
- Iuvone, P.M.; Galli, C.L.; Garrison-Gund, C.K.; Neff, N.H. (1978)
"Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons"
Science, **202**: 901–902.
- Iuvone, P.M.; Rauch, A.L.; Marshburn, P.B.; Glass, D.B.; Neff, N.H. (1982)
"Activation of Retinal Tyrosine Hydroxylase *In Vitro* by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase: Characterization and Comparison to Activation *In Vivo* by Photic Stimulation"
The Journal of Neurochemistry, **39**: 632-1640.
- Jeon, C-J.; Strettoi, E.; Masland, R.H. (1998)
"The Mayor Cell Populations of the Mouse Retina"
The Journal of Neuroscience, **18**: 8936-8946.



- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. (2000)
"Principles of Neural Science"
Fourth Edition. Ed. McGraw Hill.
Capítulos 26, 27, 28.
- Kahle, W. (2003)
"Atlas de Fisiología. Sección 3"
Séptima edición. Ed. Omega. **Volumen 3**, 338-359.
- Kaneko, A. (1971)
"Electrical connexions between horizontal cells in the Dogfish retina"
The Journal of Physiology, **213**: 95-105.
- Kaneko, A.; de la Villa, P.; Kurahashi, T.; Sasaki, T. (1994)
"Role of L-Glutamate for Foramation of On-and Off-Responses in the retina"
Biomedical Research, **15**: 41-45.
- Kashani, A.A. (1993)
"The triplex hypothesis of vision"
Annals of Ophthalmology, **25**: 125-132.
- Kavakli, I.H y Sancar, A. (2002)
"Circadian Photoreception in Humans and Mice"
Molecular Interventions, **2**: 484-492.
- Keeler, C.E.; Sutcliffe, E.; Chaffee, E.L. (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.
- Kettenmann, H.; Faissner, A.; Trotter, J. (1996)
"Neuron-glia interactions in homeostasis and degeneration"
Comprehensive Human Physiology de Cellular Mechanisms to Integration (Greger, R. y Windhorst, U. eds.). Springer-Verlag, Berlín, pp. 533-543.
- Kifor, O.; Kifor, I.; Moore Jr, F.D.; Butters Jr., R.R.; Brown, E.M. (2003)
"m-Calpain Colocalizes with the Calcium-sensing Receptor (CaR) in Caveolae in Parathyroid Cells and Participates in Degradation of the CaR"
The Journal of Biological Chemistry, **278**: 31167-31176.
- Kooijman, A.C. y Damhof, A. (1980)
"ERG lens with built-in Ganzfeld light source for stimulation and adaptation"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **19**: 315-8.
- Kolb H. y West R.W. (1977)
"Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat"
Journal of Neurocytology, **6**: 155-170.
- Kolb, H.; Limberg, K.A.; Fisher, S.K. (1992)
"The neurons of the human retina: a Golgi study"
The Journal of Comparative Neurology, **318**: 147-187.
- Kolb, H.; Fernandez, E.; Schouten, J.; Ahnelt, P.; Limberg, K.A.; Fisher, S.K. (1994)
"Are there three types of horizontal cell in the human retina?"
The Journal of Comparative Neurology, **15**: 370-386.



- Kolb, H.; Fernández, E; Nelson, R. (2000)
Webvision. [http:// www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu).
- Kolb, H. (2003)
“How the retina work.”
American Scientist, **91**: 28-35.
- Kolb, H. y Marshak, D. (2004)
“The midget pathways of the primate retina”
Documenta Ophthalmologica, **106**: 67–81.
- Kosaka, J.; Suzuki, A.; Morii, E.; Nomura, S. (1998)
“Differential Localization and Expression of a and b Isoenzymes of Protein Kinase C in the Rat Retina”
Journal of Neuroscience Research, **54**: 655–663.
- Koyanagi, M.; Kubokawa, K.; Tsukamoto, H.; Shichida, Y.; Terakita, A. (2005)
“Cephalochordate Melanopsin: Evolutionary Linkage between Invertebrate Visual Cells and Vertebrate Photosensitive Retinal Ganglion Cells”
Current Biology, **15**: 1065–1069.
- Krishek, B.J.; Xie, X.; Blackstone, C.; Haganir, R.L.; Moss, S.J.; Smart, T.G. (1994)
“Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation”
Neuron, **12**: 1081-1095.
- Kumbalasiri, T.; Rollag, M.D.; Isoldi, M.C.; de Lauro Castrucci, A.M.; Provencio, I. (2007)
“Melanopsin Triggers the Release of Internal Calcium Stores in Response to Light”
Photochemistry and Photobiology, **83**: 273–279.
- Kumer, S.C. y Vrana, K.E. (1996)
“Intricate Regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity and Gene Expression”
Journal of Neurochemistry, **67**: 443–462.
- Lam, Byron L. (2005)
“Electrophysiology of Vision: Clinical Testing and Applications”
Boca Ratón, FL.
Ed. Taylor & Francis Group.
- Lamb, T.D. y Pugh Jr., E.N. (1992)
“A Quantitative Account of the Activation Steps Involved in Phototransduction in Amphibian Photoreceptors”
The Journal of Physiology, **449**: 719-758.
- Lamb, T.D.; Shaun, P.C.; Pugh Jr., E.N. (2007)
“Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup”
Nature, **8**: 960-975.
- Lasater, E.M. y Dowling, J.E. (1985)
“Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells”
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **82**: 3025–3029.
- Li, B.; McKernan, K.; Shen, W. (2008)
“Spatial and temporal distribution patterns of Na-K-2Cl cotransporter in adult and developing mouse retinas”
Visual Neuroscience, **25**: 109–123.



- Liu, Y.; Dore, J.; Chen, X. (2007)
"Calcium Influx through L-type Channels Generates Protein Kinase M to Induce Burst Firing of Dopamine Cells in the Rat Ventral Tegmental Area"
The Journal of Biological Chemistry, **282**: 8594–8603.
- Loosli, F.; Winkler, S.; Burgtorf, C.; Wurmbach, E.; Ansorge, W.; Henrich, T.; Grabher, C.; Arendt, D.; Carl, M.; Krone, A.; Grzebiz, E.; Wittbrodt, J. (2001)
"Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth"
Development, **128**: 4035-44.
- Lu, C.B. y McMahon, D.G. (1996)
"Gap junction channel gating at bass retinal electrical synapses"
Visual Neuroscience, **13**: 1049-1053.
- Lucas, R.; Foster, R.G. (1999a)
"Neither Functional Rod Photoreceptors nor Rod or Cone Outer Segments Are Required for the Photic Inhibition of Pineal Melatonin"
Endocrinology, **140**: 1520-1524.
- Lucas, R.J.; Freedman, M.S.; Muñoz, M.; Garcia-Fernández, J.M.; Foster, R.G. (1999b)
"Regulation of the Mammalian Pineal by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors"
Science, **284**: 505-507.
- Lucas, R.J.; Douglas, R.H.; Foster, R.G. (2001)
"Characterization of an ocular photopigment capable of driving papillary constriction in mice"
Nature Neuroscience, **4**: 621-626
- Lucas, R.J.; Hattar, S.; Takao, M.; Berson, D.M.; Foster, R.G. (2003)
"Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice"
Science, **299**: 245-247.
- Lucas, R.J.; Vallone, D.; Foulkes, N.S. (2008)
"Animal Models in Eye Research"
Ed. PANAGIOTIS A. TSONIS Elsevier/Academic Press. Primera Edición.
Capítulo 12: 173-184.
- Lukasiewicz, P.D. y Shields, C.R. (1998)
"A diversity of GABA receptors in the retina"
Cell & Developmental Biology, **9**: 293-299.
- Lupi, D.; Sekaran, S.; Jones, S.L.; Hankins, M.W.; Foster, R.G. (2006)
"Light-evoked FOS induction within the Suprachiasmatic Nuclei (SCN) of Melanopsin KnockOut (Opn4^{-/-}) Mice: A Developmental Study"
Chronobiology International, **23**: 167–179.
- Lupi, D.; Oster, H.; Thompson, S.; Foster, R.G. (2008)
"The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception"
Nature Neuroscience, **11**: 1069-1073.
- Lytle, C.; Xu, J.-C.; Biemesderfer, D.; Forbush, B.I. (1995)
"Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies"
The American Journal of Physiology, **269**: C1496–C1505.



- Manglapus, M.K.; Iuvone, P.M.; Underwood, H.; Pierce, M.E.; Barlow, R.B. (1999)
"Dopamine Mediates Circadian Rhythms of Rod-Cone Dominance in the Japanese Quail Retina"
The Journal of Neuroscience, **19**: 4132-4141.
- Marmor, M.F. y Zrenner, E. (1999)
"Standard for clinical electroretinography. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision"
Documenta of Ophthalmologica Advances in Ophthalmology, **97**: 143-56.
- Marmor, M.F.; Holder, G.E.; Seeliger, M.W.; Yamamoto, S. (2004)
"Standard for clinical electroretinography"
Documenta Ophthalmology. Advances in Ophthalmology, **108**: 107-114.
- Marmor, M.F.; Fulton, A.B.; Holder, G.E.; Miyake, Y.; Brigell, M.; Bach, M. (2009)
"ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography".
Documenta Ophthalmology. Advances in Ophthalmology, **118**: 69-77.
- Masland, R.H. y Tauchi, M. (1986)
"The cholinergic amacrina cell."
Trends in Neuroscience, **9**: 218-223.
- Masland, R.H. (2001a)
"The fundamental plan of the retina"
Nature Neuroscience, **4**: 877-886.
- Masland, R.H. (2001b)
"Neuronal diversity in the retina"
Current Opinion in Neurobiology, **11**: 431-436.
- Mathers, P.H.; Grinberg, A.; Mahon, K.A.; Jamrich, M. (1997)
"The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development"
Nature, **387**: 603-607.
- Mathews, C.K. y van Holde, K.E. (1998)
"Bioquímica"
Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Impreso en España.
Capítulo 23.
- Mathews, H.R. (1995)
"Effects of lowered cytoplasmic calcium concentration and light on the responses of salamander rod photoreceptors"
The Journal of Physiology, **484**: 267-286.
- Mathews, H.R. (1997).
"Actions of Ca²⁺ on an early stage in phototransduction revealed by the dynamic fall in Ca²⁺ concentration during the bright flash response"
The Journal of General Physiology, **109**: 141-146.
- Matute, C.; Alberdi, E.; Domercq, M.; Pérez-Cerdá, F.; Pérez-Samartín, A.; Sánche-Gómez, M.V. (2001)
"The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases"
Trends in Neuroscience, **24**: 224-230.
- McMahon, D.G. y Brown, D.R. (1994)
"Modulation of gap-junction channel gating at zebrafish electrical synapses"
Journal of Neurophysiology, **72**: 2257-2268.



- McMahon, D.G. y Mattson M.P. (1996)
“Horizontal cell electrical coupling in the giant danio: Synaptic modulation by dopamine and synaptic maintenance by calcium”
Brain Research, **718**: 79-86.
- Melyan, Z.; Tattelin, E.E.; Bellingham, J.; Lucas, R.J.; Hankins, M.W. (2005)
“Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive”
Nature, **433**: 741–745.
- Midorikawa, M.; Tsukamoto, Y.; Berglund, K.; Ishii, M.; Tachibana, M. (2007)
“Different roles of ribbon-associated and ribbon-free active zones in retinal bipolar cells”
Nature Neuroscience, **10**: 1268–1276.
- Minke, B. y Parnas M. (2006)
“Insights on TRP Channels from In Vivo Studies in *Drosophila*”
Annual Review of Physiology, **68**: 649–684.
- Milam, A.H.; Li, Z.Y.; Fariss, R.N. (1999)
“Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa”
Progress in Retinal and Eye Research, **18**: 175-205.
- Mills, S.L. y Massey, S.C. (1995)
“Differential properties of two gap junctional pathways made by All amacrine cells”
Nature, **377**: 734-737.
- Mills, S.L.; Xia, X-B.; Hoshi, H.; Firth, S.I.; Rice, M.E.; Frishman, L.J.; Marshak, D.W. (2007)
“Dopaminergic modulation of tracer coupling in a ganglion-amacrine cell network”
Visual Neuroscience, **24**: 593–608.
- Miura, G.; Wang, M. H.; Ivers, K.M.; Frishman, L.J. (2009)
“Retinal pathway origins of the pattern ERG of the mouse”
Experimental Eye Research, **89**: 49–62.
- Moore, R.Y.; Speh, J.C.; Card, J.P. (1995)
“The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells”
The Journal of Comparative Neurology, **352**: 351-366.
- Mrosovsky, N. y Hattar, S. (2003)
“Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice”
Chronobiology International, **20**: 989-999.
- Murakami, M. y Pak, W.L. (1970)
“Intracellular recorded early receptor potential of the vertebrate photoreceptors”
Vision Research, **10**: 965-975.
- Mure, L.S.; Rieux, C.; Hattar, S.; Cooper, H.M. (2007)
“Melanopsin-Dependent Nonvisual Responses: Evidence for Photopigment Bistability In Vivo”
Journal of Biological Rhythms, **22**: 411-424.
- Nachman-Clewner, M.; Jules, R.; Townes-Anderson, E. (1999)
“L-Type Calcium Channels in the Photoreceptor Ribbon Synapse: Localization and Role in Plasticity”
The Journal of Comparative Neurology, **415**: 1-16.



- Nakajima, Y.; Iwakabe, H.; Akazawa, C.; Nawa, H.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Nakanishi, S. (1993)
“Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate”
The Journal of Biological Chemistry, **268**: 11868-73.
- Nakamura, Y.; McGuire, B.A.; Sterling, P. (1980)
“Interplexiform cell in cat retina: identification by uptake of γ -[3H] aminobutyric acid and serial reconstruction”
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **77**: 658-661.
- Nakatani, K. y Yau, K.W. (1988)
“Calcium and light adaptation in retinal rods and cones”
Nature, **334**: 69-71.
- Negishi, K.; Kato, S.; Teranishi, T. (1988)
“Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas”
Neuroscience Letters, **94**: 297-252.
- Negishi, K.; Kato, S.; Teranishi, T. (1989)
“Immunocytochemical localisation of protein kinase C in some vertebrate retinas”
Neurobiology of the Inner Retina (Eds. Weiler&Osborne), pp. 425-436. Springer-Verlag, Berlin.
- Nelson, R.; Famiglietti Jr., E.V.; Kolb, H. (1978)
“Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina”
Journal of Neurophysiology, **41**: 472-83.
- Netter, F.H. (2005)
“Atlas de Anatomía Humana”
Tercera Edición. Ed. MASSON, Icon Learning Systems·Teterboro, New Jersey.
Lámina 86 y 114.
- Newton, A.C. (2003)
“Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm”
The Biochemical Journal, **370**: 361-371.
- Nir, I.; Haqueb, R.; Iuvone, P.M. (2000)
“Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina”
Brain Research, **870**: 118–125
- Nir, I.; Harrison, J.M.; Haque, R.; Malcolm, J.L.; Grandy, D.K.; Rubinstein, M. (2002)
“Dysfunctional Light-Evoked Regulation of cAMP in Photoreceptors and Abnormal Retinal Adaptation in Mice Lacking Dopamine D4 Receptors”
The Journal of Neuroscience, **22**: 2063–2073.
- Nguyen-Legros, J.; Simon, A.; Caille, I.; Bloch, B. (1997)
“Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals”
Visual of Neuroscience, **14**: 545-551.
- Osborne, N.N.; Broyden, N.J.; Barnett, N.L.; Morris, N.J. (1991)
“Protein kinase C (α and β) immunoreactivity in rabbit and rat retina: Effect of phorbol esters and transmitter agonists on immunoreactivity and the translocation of the enzyme from cytosolic to membrane compartments”
Journal of Neurochemistry, **57**: 594–604.



- Østergaard, J.; Hannibal, J.; Fahrenkrug, J. (2007)
"Synaptic Contact between Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells and Rod Bipolar Cells"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **48**: 3812-3820.
- Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Trong, I.L.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. (2000)
"Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor"
Science, **289**: 739-745.
- Pan, F. y Massey, S.C. (2007)
"Rod and cone input to horizontal cells in the rabbit retina"
The Journal of Comparative Neurology, **500**: 815-831.
- Panda, S.; Sato, T.K.; Castrucci, A.M.; Rollag, M.D.; DeGrip, W.J.; Hogenesch, J.B.; Provencio, I.; Kay, S.A. (2002)
"Melanopsin (*Opn4*) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting"
Science, **298**: 2213-2216.
- Panda, S.; Provencio, I.; Tu, D.C.; Pires, S.S.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M.; Pletcher, M.T.; Sato, T.K.; Wiltshire, T.; Andahazy, M.; Kay, S.A.; Van Gelder, R.N.; Hogenesch, J.B. (2003)
"Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice"
Science, **301**: 525-527
- Panda, S.; Nayak, S.K.; Campo, B.; Walker, J.R.; Hogenesch, J.B.; Jegla, T. (2005)
"Illumination of the melanopsin signalling pathway"
Science, **307**: 600-604.
- Paul, K.N.; Saafir, T.B.; Tosini, G. (2009)
"The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms"
Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, pp. 1-8.
- Peichl, L. (2005)
"Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle"
The Anatomical Record, **287**: 1001-1012.
- Penn, R.D. y Hagsins, W.A. (1972)
"Kinetics of the Photocurrent of Retinal Rods"
Biophysical Journal, **12**: 1073-1094.
- Pérez-León, J.A.; Warren, E.J.; Allen, C.N.; Robinson, D.W.; Brown, R.L. (2006)
"Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock"
The European Journal of Neuroscience, **24**: 1117-1123.
- Pichaud, F.; Treisman, J.; Desplan, C. (2001)
"Reinventing a common strategy for patterning the eye"
Cell, **105**: 9-12.
- Pignatelli, V. y Strettoi, E. (2004)
"Bipolar Cells of the Mouse Retina: A Gene Gun, Morphological Study"
The Journal of Comparative Neurology, **476**: 254-266.
- Pires, S.S.; Shand, J.; Bellingham, J.; Arrese, C.; Turton, M.; peirson, S.; Foster, R.G.; Haldford, S. (2007)
"Isolation and characterization of melanopsina (*Opn4*) from the Australian marsupial *Sminthopsis crassicaudata* (fat-tailed dunnart)"
Proceedings of the Royal Society B, **274**: 2791-2799.



- Pires, S.S.; Hughes, S.; Turton, M.; Melyan Z.; Peirson, S.N.; Zheng, L.; Kosmaoglou, M.; Bellingham, J.; Cheetham, M.E.; Lucas, R.J.; Foster, R.G.; Hankins, M.W.; Haldford, S. (2009)
 "Differential Expression of Two Distinct Functional Isoforms of Melanopsin (*Opn4*) in the Mammalian Retina"
The Journal of Neuroscience, **29**: 12332–12342.
- Plachetzki, D.C.; Serb, J.M.; Oakley, T.H. (2005)
 "New insights into the evolutionary history of photoreceptor cells"
Trends in Ecology and Evolution, **20**: 465-467.
- Pozdeyev, N.; Tosini, G.; Li, L.; Ali, F.; Rozov, S.; Lee, R.H.; Iuvone, P.M. (2008)
 "Dopamine modulates diurnal and circadian rhythms of protein phosphorylation in photoreceptor cells of mouse retina"
The European Journal of Neuroscience, **27**: 2691–2700.
- Protti, D. y Llano, I. (1998)
 "Calcium Currents and Calcium Signaling in Rod Bipolar Cells of Rat Retinal Slices"
The Journal of Neuroscience, **18**: 3715–3724.
- Provencio, I.; Cooper, H.M.; Foster, R.G. (1998a)
 "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, W.J.; Hayes, W.P.; Rollag, M.D. (1998b)
 "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **95**: 340–345.
- Provencio, I.; Rodriguez, I.R.; Jiang, G.; Hayes, W.P.; Moreira, E.F.; Rollag, M.D. (2000)
 "A Novel Human Opsin in the Inner Retina"
The Journal of Neuroscience, **20**: 600-605.
- Provencio, I.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M. (2002a)
 "Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night"
Nature, **415**: 493.
- Provencio, I.; Berson, D.M.; Richardson, R.C.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M. (2002b)
 "Melanopsin immunoreactivity in retinal ganglion cells"
 Comunicación en: *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*
- Provis, J.M.; Penfold, P.L.; Ewards, A.J.; van Driel, D. (1995)
 "Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans"
Glia, **14**: 243-256.
- Qiu, X.; Kumbalasiri, T.; Carlson, S.M.; Wong, K.Y.; Krishna, V.; Provencio, I.; Berson, D.M. (2005).
 "Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin"
Nature, **433**: 745–749.
- Quiring, R.; Walldorf, U.; Kloter, U.; Gehring, W.J. (1994).
 "Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and *Aniridia* in humans"
Science, **265**: 785-9.



- Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J.; de Hoz, R.; Triviño, A. (2001)
"Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration"
Experimental Eye Research, **73**: 601-615.
- Robson, J.G.; Saszik, S.M.; Ahmer, J.; Frishman, L.J. (2003)
"Rod and cone contributions to the *a*-wave of the electroretinogram of the macaque"
The Journal of Physiology, **547**: 509-530.
- Rodieck, R.W. (1998)
"The First Steps in Seeing"
Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Rollag, M.D.; Berson, D.M.; Provencio, I. (2003)
"Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment"
Journal of Biological Rhythms, **18**: 227-234.
- Rollag, M.D. (2008)
"Does Melanopsin Bistability Have Physiological Consequences?"
Journal of Biological Rhythms, **23**: 396-399.
- Ruby, N.F.; Brennan, T.J.; Xie, X.; Cao, V.; Franken, P.; Heller, C.; O'Hara, B.F. (2002)
"Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light"
Science, **298**: 2211-2213.
- Russell, J.M. (2000)
"Sodium-Potassium-Chloride Cotransport"
Physiological Reviews, **80**: 212-267.
- S.A.H.A. (Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial) (2009)
"Cronobiología"
www.saha.org.ar/temas/cronobiologia
- Sakamoto, K.; Liu, C.; Kasamatsu, M.; Pozdeyev, N.V.; Iuvone, P.M.; Tosini, G. (2005)
"Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells"
The European Journal of Neuroscience, **22**: 3129-3136.
- Salvini-Plawen, L.V. y Mayr, E. (1977)
"On the Evolution of photoreceptors and eyes"
Evolutionary Biology, **10**: 207-263.
- Schmidt, T.M.; Taniguchi, K.; Kofuji, P. (2008)
"Intrinsic and Extrinsic Light Responses in Melanopsin-Expressing Ganglion Cells During Mouse Development"
Journal of Neurophysiology, **100**: 371-384.
- Schmidt, T.M. y Kofuji, P. (2009)
"Functional and Morphological Differences among Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells"
The Journal of Neuroscience, **29**: 476-482.
- Seiple, W.H.; Siegel, M.; Carr, R.E.; Mayron, C. (1986)
"Evaluating macular function using the focal ERG"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **27**: 1123-30.



- Sekaran, S.; Foster, R.G.; Lucas, R.J.; Hankins, M.W. (2003)
"Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons"
Current Biology, **13**: 1290–1298.
- Sekaran, S.; Lupi, D.; Jones, S.L.; Sheely, C.J.; Hattar, S.; Yau, K.W.; Lucas, R.J.; Foster, R.G.; Hankins, M.W. (2005)
"Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina"
Current Biology, **15**: 1099-1107.
- Semo, M.; Peirson, S.; Lupi, D.; Lucas, R.J.; Jeffrey, G.; Foster, R.G. (2003)
"Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and papillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice"
The European Journal of Neuroscience, **17**: 1793-1801.
- Sharma, S.; Ball, S.L.; Peachey, N.S. (2005)
"Pharmacological studies of the mouse cone electroretinogram"
Visual Neuroscience, **22**: 631–636.
- Sharma, V.K. y Chandrashekar, M.K. (2005)
"Zeitgebers (*time cues*) for biological clocks"
Current Science, **89**: 1136-1146.
- Shea, T.; Beermann, M.L.; Griffin, W.R.; Leli, U. (1994)
"Degradation of protein kinase $C\alpha$ and its free catalytic subunit, protein kinase M, in intact human neuroblastoma cells and under cell-free conditions. Evidence that PKM is degraded by mM calpain-mediated proteolysis at a faster rate than PKC"
FEBS Letters, **350**: 223-229.
- Shulman, L.M. y Fox, D.A. (1996)
"Dopamine Inhibits mammalian photoreceptor Na^+ , K^+ ATPase activity via a selective effect on the $\alpha 3$ isoenzyme"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **93**: 8034-8039.
- Silbernagl, S. y Despopoulos, A. (2002)
"Atlas de bolsillo de Fisiología"
Quinta edición. Ed. Harcourt, pp. 28-40; 42-54; 78-85; 344-360.
- Strettoi, E. y Pignatelli, V. (2000)
"Modifications of retinal neurons in mouse model of retinitis pigmentosa"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **97**: 11020-1025.
- Strettoi, E.; Pignatelli, V.; Rossi, C.; Porciatti, V.; Falsini, B. (2003)
"Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice"
Vision Research, **43**: 867–877.
- Tarrés, M.A.; Barón, M.; Gallego, A. (1986)
"The horizontal cells in the retina of the owl, *Tyto alba*, and owllet, *Carinae noctua*"
Experimental Eye Research, **42**: 315-321.
- Taylor, W.R. y Wässle, H. (1995)
"Receptive field properties starburst cholinergic amacrine cells in the rabbit retina"
The European Journal of Neuroscience, **7**: 2308-2321.



- Terakita, A. (2005)
"The Opsins"
Genome Biology, **6**: 1-9.
- Terakita, A.; Tsukamoto, H.; Koyanagi, M.; Sugahara, M.; Yamashita, T.; Shichida, Y. (2008)
"Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsina"
Journal of Neurochemistry, **105**: 883-890.
- Thapan, K.; Arendt, J.; Skene, D.J. (2001)
"An Action Spectrum for Melatonin Suppression: Evidence for a Novel non-rod, non-cone Photoreceptor system in humans"
The Journal of Physiology, **535**: 261-267.
- Thoreson, W.B., Babai, N.; Bartoletti, T.M. (2008)
"Feedback from Horizontal Cells to Rod Photoreceptors in Vertebrate Retina"
The Journal of Neuroscience, **28**: 5691-5695.
- Torii, M.; Kojima, D.; Okano, T.; Nakamura, A.; Terakita, A.; Shichida, Y.; Wada, A.; Fukada, Y. (2007)
"Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity"
FEBS Letters, **581**: 5327-5331.
- Tosini, G. y Menaker, M. (1996)
"Circadian rhythms in cultured mammalian retina"
Science, **272**: 419-421.
- Tosini, G. y Menaker, M. (1996b)
"The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration"
Brain Research, **789**: 221-224.
- Tu, D.C.; Zhang, D.; Demas, J.; Slutsky, E.B.; Provencio, I.; Holy, T.E.; van Gelder, R.N. (2005)
"Physiologic Diversity and Development of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells"
Neuron, **48**: 987-999.
- Tu, D.C.; Owens, L.A.; Anderson, L.; Golczak, M.; Doyle, S.E.; McCall, M.; Menaker, M.; Palczewski, K.; van Gelder, R.N. (2006)
"Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **103**: 10426-10431.
- Vaquero, C. y de la Villa, P. (1999)
"Localisation of the GABAC receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina"
Neuroscience Research, **35**: 1-7.
- Vardi N.; Zhang L.L.; Payne J. A.; Sterling P. (2000)
"Evidence That Different Cation Chloride Cotransporters in Retinal Neurons Allow Opposite Responses to GABA"
The Journal of Neuroscience, **20**: 7657-7663.
- Vardi, N.; Dhingra, A.; Zhang, L.; Lyubarsky, A.; Wang, T.L.; Morigiwa, K. (2002).
"Neurochemical organization of the first visual synapse"
The Keio Journal of Medicine, **51**: 154-164.



- Varela, C.; Rivera, L.; Blanco, R.; de la Villa, P. (2005a)
"Depolarizing effect of GABA in horizontal cells of the rabbit retina"
Neuroscience Research, **53**: 257-264.
- Varela, C.; Blanco, R.; de la Villa, P. (2005b)
"Depolarizing effect of GABA in rod bipolar cells of the mouse retina"
Vision Research, **45**: 2659-2667.
- Varela, C.; Igartua, I.; de la Rosa, E.J.; de la Villa, P. (2003)
"Functional modifications in rod bipolar cells in a mouse model of retinitis pigmentosa"
Vision Research, **43**: 879-885.
- Vaney, D.I. (1993)
"The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina"
Proceeding of the Royal Society B, **252**: 93-101.
- Vaney, D.I. (1994)
"Patterns of neuronal coupling in the retina"
Progress in Retinal and Eye Research, **13**: 301-355.
- Vaney, D.I.; Nelson, J.C.; Pow, D.V. (1998)
"Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina"
The Journal of Neuroscience, **18**: 10594-10602.
- Veruki, M.L. y Wässle, H. (1996)
"Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina"
The European Journal of Neuroscience, **8**: 2286-2297.
- Vilela, C.; Cortés, M.; Vallet, M. (1998)
"Electrorretinograma: técnica y aplicaciones clínicas"
Revista de Neurología, **26**: 444-447.
- Viney, T.J.; Balint, K.; Hillier, D.; Siebert, S.; Boldogkoi, Z.; Enquist, L.W.; Meister, M.; Cepko, C.L.; Roska, B. (2007)
"Local Retinal Circuits of Melanopsin-Containing Ganglion Cells Identified by Transsynaptic Viral Tracing"
Current Biology, **17**: 981-988.
- Viswanathan, S.; Frishman, L.J.; Robson, J.G.; Walters, J.W. (2001)
"The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma"
Investigative Ophthalmology & Visual Science, **42**: 514-22.
- Voigt, T. y Wässle, H. (1987)
"Dopaminergic Innervation of AII Amacrine Cells in Mammalian Retina"
The Journal of Neuroscience, **7**: 4115-4128
- Vu, T.Q.; Payne, J.A.; Copenhagen, D.R. (2000)
"Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina"
The Journal of Neuroscience, **20**: 1414-1423.
- Vugler, A.A.; Redgrave, P.; Hewson-Stoate, N.J.; Greenwood, J.; Coffey, P.J. (2007a)
"Constant illumination causes spatially discrete dopamine depletion in the normal and degenerate retina"
Journal of Chemical Neuroanatomy, **33**: 9-22.



- Vugler, A.A.; Redgrave, P.; Semo, M.; Lawrence, J.; Greenwood, J.; Coffey, P.J. (2007b)
"Dopamine neurones form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina"
Experimental Neurology, **205**: 26-35.
- Vulliamy, P.R.; Woodgett, J.R.; Ferrari, S.; Hardie, D.G. (1985)
"Characterization of the sites phosphorylated on tyrosine hydroxylase by Ca²⁺ and phospholipid-dependent protein kinase, calmodulin-dependent protein kinase and cyclic AMP-dependent protein kinase"
FEBS Letters, **182**: 335-339.
- Wachmeister, L. (1998)
"Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal?"
Progress in Retinal and Eye Research, **17**: 485-521.
- Walker, M.T.; Brown, R.L.; Cronin, T.W.; Robinson, P.R. (2008)
"Photochemistry of retinal chromophore in mouse melanopsin"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **105**: 8861-8865.
- Warren, E.J.; Allen, C.N.; Brown, R.L.; Robinson, D.W. (2003)
"Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system"
The European Journal of Neuroscience, **17**: 1727-1735.
- Warren, E.J.; Allen, C.N.; Brown, R.L.; Robinson, D.W. (2006)
"The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells"
The European Journal of Neuroscience, **23**: 2477-2487.
- Wässle, H. y Boycott, B.B. (1991)
"Functional architecture of the mammalian retina"
Physiological Review, **71**: 447-480.
- West, R.W. (1976)
"Light and electron microscopy of the ground squirrel retina: functional considerations"
The Journal of Comparative Neurology, **168**: 355-377.
- Wilson, J.X. (1997)
"Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes"
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, **75**: 1149-63.
- Witkovsky, P.; Gabriel, R.; Haycock, J.W.; Meller, E. (2000)
"Influence of light and neural circuitry on tyrosine hydroxylase phosphorylation in the rat retina"
Journal of Chemical Neuroanatomy, **19**: 105-116.
- Witkovsky, P. (2004)
"Dopamine and retinal function"
Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology, **108**: 17-40.
- Wolf, M.; LeVine, H.; May, W. S. Jr.; Cuatrecasas, P.; Sahyoun, N. (1985)
"A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters"
Nature, **317**: 546-548.



- Wong, K.Y.; Dunn, F.A.; David M. Berson, D.M. (2005)
"Photoreceptor Adaptation in Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells"
Neuron, **48**: 1001-1010.
- Wong, K.Y.; Dunn, F.A.; Graham, D.M.; Berson, D.M. (2007)
"Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors"
The Journal of Physiology, **582**: 279-296.
- Wood, J.P.M.; McCord, R.J.; Osborne, N.N. (1997)
"Retinal Protein Kinase C"
Neurochemistry International, **30**: 119-136.
- Xiao, H.; Chen, X.; Steele Jr., E.C. (2007)
"Abundant L-type calcium channel Cav1.3 ($\alpha 1D$) subunit mRNA is detected in rod photoreceptors of the mouse retina via in situ hybridization"
Molecular Vision, **13**: 764-771.
- Xiang, M.; Zhou, L.; Macke, J.P.; Yoshioka, T.; Hendry, S.H.C.; Eddy, R.L.; Shows, T.B.; Nathans, J. (1995)
"The Brn-3 Family of POU-Domain Factors: Primary Structure, Binding Specificity, and Expression in Subsets of Retinal Ganglion Cells and Somatosensory Neurons"
The Journal of Neuroscience, **15**: 4762-4785.
- Xu, J.C.; Lytle, C.; Zhu, T.; Payne, J.A.; Benz, E.; Forbush III, B. (1994)
"Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **91**: 2201-2205.
- Xu, L.; Ball, S.L.; Alexander, K.R.; Peachev, N.S. (2003)
"Pharmacological analysis of the rat cone electroretinogram"
Visual Neuroscience, **20**: 297-306.
- Zhang, C.; Bettler, B.; Duvoisin, R.M. (1998)
"Differential localization of GABAB receptors in the mouse retina"
Neuroreport, **9**: 3493-3497.
- Zhang, D.Q. y McMahon, D.G. (2001)
"Gating of retinal horizontal cell hemi gap junction channels by voltage, Ca^{2+} and retinoic acid"
Molecular Vision, **7**: 247-252.
- Zhang, L-L.; Fina, M.E.; Vardi, N. (2006)
"Regulation of KCC2 and NKCC during Development: Membrane Insertion and Differences between Cell Types"
The Journal of Comparative Neurology, **499**: 132-143.
- Zhang, D.Q.M.; Zhou, T.R.; McMahon, D.G. (2007)
"Functional heterogeneity of retinal dopaminergic neurons underlying their multiple roles in vision"
The Journal of Neuroscience, **27**: 692-699.
- Zhang, D.Q.; Wong, K.Y.; Sollars, P.J.; Berson, D.M.; Pickard, G.E.; McMahon, D.G. (2008)
"Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **105**: 14181-14186.



Zhang, L-L.; Delpire, E.; Vardi, N. (2007)
“NKCC1 Does Not Accumulate Chloride in Developing Retinal Neurons”
Journal of Neurophysiology, **98**: 266-277.

Agradecimientos



He aquí mi Udyat

Completado el trabajo, completado un ciclo.

Lamento no ser original diciendo eso de “parece que fue ayer” pero ¡siempre es tan real!... No obstante, la rapidez con que los años pasan sabemos que es directamente proporcional a lo que se haya disfrutado a lo largo de ellos. Este periodo no ha sido rápido, ha sido fugaz.

Mirar atrás puede ser peligroso, o al menos dar algo de vértigo. Parecen tan pequeñas aquellas dificultades iniciales, sin embargo y a pesar de las trabas (y algo de suerte), he conseguido cumplir una primera fase científica que se presentó difícil. Hubo que aferrarse a la ilusión y al tesón para conseguirla, pero finalmente llegó.

Y digo que con algo de suerte, no sólo por ver realizado un objetivo sino por haber podido recaer en un grupo de tan excelentes personas. Indudablemente no podía comenzar estos agradecimientos sin hacer una primera e importante mención a mi tutor, Dr. D. Pedro de la Villa, director del laboratorio con grandes virtudes de batuta. Hacer que el día a día sea tan fácil y ameno es una tarea que maneja con gran habilidad. Gracias Pedro por darme la oportunidad de aprender de ti y por hacer de lo difícil fácil y de lo imposible, cuanto menos, solucionable.

Si hablo de ganas y empeño por llegar a los objetivos tengo que hablar de la sin par Rima. Una persona de fuerte determinación y gran fortaleza que supo darme consejo en esa primera decisión de iniciar este camino. Gracias Rima por tu estratégico humor, tu paciencia con las explicaciones del “patch” y tu lucha, ejemplo para muchos.

No se puede separar el punto de la i. Aunque el pensamiento de una me lleva a la otra, hablar de Rima no es para nada hablar de Nuria. Habría muchas cosas que apuntar de Nuria pero de las primeras señalaría ese espíritu combativo que no va reñido con el mejor de los compañerismos. Gracias Nuri, tu ímpetu y tu decisión al afrontar los pequeños, y no tan pequeños, conflictos de la vida con tanta naturalidad son obligatorios de imitar.

Pero, aunque las primeras, no han sido las únicas que han aportado su granito a mi formación tanto personal como profesional. ¡Cómo no puede ser tenida en cuenta la participación en



todo esto de nuestras queridas venezolanas! Mirna y Norma, fueron periodos cortos pero vuestra personalidad y las ricas diferencias han llenado de color los días que, por otro lado, hubiesen sido del todo rutinarios.

Y que decir del gran Shen-shei, nuestro particular Franckj. Dispuesto y comprometido como pocos ha sido un referente en aquellas pequeñas cosas que dicen de la calidad humana. Gracias Fran por tu cercanía y tu ayuda para sobrellevar las decepciones que surgen en la ciencia.

Como contrapunto, pero igualmente inimitable no puedo dejar de nombrar a Román. Profesionalmente, un hombre con las ideas bien claras...llueva, truene o diluvie. Gracias Romi por los consejos y las explicaciones del camino de la ciencia y por supuesto por esos partidos de tenis.

Pero no puedo parar aquí. Aunque de aparición posterior, ocupa un gran papel en el mérito del trabajo realizado, nuestra sorprendente y habilidosa Laura. Puedo caer en lo fácil y destacar de ella la profesionalidad, la dedicación y la maña que caracterizan a este tesoro, pero también está su gran sentido del humor y su complicidad. Gracias Laura por tu tiempo, tu amistad y tu trabajo, ¡Vales un "Potosí"!

Y finalmente de nueva adquisición, aunque ya no tan nueva, quiero resaltar el papel de un genuino Rafael, siempre dispuesto, siempre amable y con la mente bien despierta. Gracias Rafa, por tu apoyo y la atención que siempre me has brindado acerca de mis temores.

Como repaso de este gran personal me queda mi queridísimo compañero, y no obstante, amigo M. Qué decir, cómo resumir. Si hay alguien concienciado con el trabajo bien hecho ha de ser Miguel, si a alguien se le puede acusar de ser "más metódico que Poirot" es a él (siendo esto un halago). Gracias M por tu concienzudo trabajo, por ser parte de ese M & J, por ser válvula de escape con esos partidos de tenis, padel, ajedrez o "Ginkana Lab". Pero sobre todo por ser ejemplo profesional y amigo.

Obviamente, en el ámbito universitario, cabría detenerme en un sinfín de personas que me han ayudado de una u otra manera. Sin embargo, y a costa de descuidar algún nombre, quiero agradecer a todas aquellas personas que desde un principio hemos compartido este camino en esta universidad...y de los que a algunos he visto partir. Montse, Malí, Javi, Bea, Carlos, Arantxa (milagro de impresora),.....y un largo etcaetera. Mención especial debo y quiero hacer de Isabel y Diana a las cuales les debo las imágenes tan maravillosas del confocal y el tiempo dedicado a tal fin.



De la misma manera he de agradecer las facilidades del Dr. Natalio García para el uso del criostato del Departamento de Especialidades Médicas, una ayuda salvadora. Con especial cariño quiero agradecer las atenciones dedicadas por la Dra. Margarita Barón, siempre haciendo gala de un excelente buen humor.

Igualmente, me gustaría agradecer a las personas que me han acogido con desinteresado cariño en mis estancias breves fuera de mi habitual centro de trabajo. A la Dra Almudena Velasco, de la Universidad de Salamanca, por permitirme recuperar, durante un tiempo, el añorado espíritu salmantino y por abrirme las puertas de su laboratorio. A todos los que allí conocí y que me trataron como uno más, permitiendo incluso ser parte del equipo de fútbol (inconscientes) o recordarme esos bares de dardos y futbolín otro tiempo de sobra conocidos por mí.

También quiero dejar constancia de mi agradecimiento al Dr. Russell Foster y al Dr. Hankins por la oportunidad de conocer el trabajo científico en un país tan distinto como Inglaterra. Fue un tiempo fabuloso del que guardo gratísimos recuerdos. Gracias a Simon, Mel, Rachel, Michel, Steave, David, Steph, Sofia... por vuestra comprensión y vuestro acogimiento, sin duda los tópicos son para desmentirlos.

“Thank you everybody because this time was very important in my personal formation. Thank you for your patience, for your comprehension and, obviously, for the beers and white wine, of course”

En el ámbito científico, pero fuera de la universidad, he de agradecer la ayuda prestada desde el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Al Dr. Enrique de la Rosa por la posibilidad brindada en la realización de esos pocos experimentos, que luego no fueron tan pocos. A la Dra Teresa Suárez por la generosidad de permitirme compartir el espacio de su laboratorio. Por supuesto a Anne, María, Jimena, Natalia... por compartir esas pequeñas frustraciones y las grandes alegrías (¿O era al revés?). Pero sin duda y de manera muy especial a Violeta. Gracias por tu incondicional ayuda, por tus enseñanzas, tus ideas y tu paciencia. El que este barco haya llegado a puerto se debe en parte a tu inestimable colaboración.

Este periodo, este ciclo ha sido rico en experiencias forjadas en el trabajo del día a día pero indudablemente rico por las aportaciones de todas estas personas. Gracias a todos.



Uno se forma en base a lo que absorbe de lo que le rodea y de los que le rodean. Por ello, no puedo dejar de agradecer a mis amigos, a los de siempre, el ser quien soy y que esto esté donde está. Gracias por el ilimitado apoyo en las circunstancias que sean. Gracias por ser hermanos. Gracias por estar ahí. Gracias por dejarme ver lo que significaba una Tesis antes de comenzar (aunque no hiciera caso). Porque cualquier pequeña atención vuestra da fuerzas para cinco Tesis... o más. En suma Gracias.

Me gustaría ir uno a uno diciéndoos cómo y por qué sois ayuda y sostén aquí y en otras miles de cosas. Sin embargo, sé que las palabras se quedarían cortas y el número de páginas escandalosamente extenso para deciros... sinceramente, Gracias.

Dejo para el final a aquellos que más significado tienen en todo lo que hago, porque son los que desde el silencio y la confianza me acompañan en cualquier empresa. Mi familia. Gracias Pater, gracias Mater por vuestros consejos, por hacerme ver las cosas con perspectiva, por conocerme tan bien que no tenga ni que hablar para que sepáis si la cosa va bien o no tan bien, por vuestra entrega y vuestro cariño. Os quiero. A mi hermana, a Mario y a ese remolino con recién estrenada autonomía llamado Paula. Pero por supuesto a ti, Ana. Gracias por acompañarme en este camino, por estar a mi lado y sufrir, más que disfrutar, de una agotadora maratón. Gracias por tu frescura, por tu sonrisa y tu confianza inquebrantable en mí. Por lo que significas para mí ahora y siempre y por ser la estrella que me guía. Te quiero.

