



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental

**Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y
Anatomía Patológica
Facultad de Medicina**

Programa de postgrado en Ciencias de la Visión

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DEGENERACIÓN DE
LOS FOTORRECEPTORES EN LA POBLACIÓN DE
CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA”**

Diego García Ayuso

2011

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)	xix
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS.....	xxiv
HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO	xxvi
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	xxviii
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. ANATOMÍA DEL OJO DE LA RATA ADULTA.....	2
1.1.1. ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR.....	2
1.1.2. LA RETINA DE LA RATA ADULTA	4
1.1.2.1. Estructura de la retina.....	5
1.1.2.2. Fotorreceptores.....	7
1.1.2.3. Células ganglionares de la retina.....	11
1.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES DE LA RETINA.....	13
1.2.1. DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.....	14
1.2.1.1. La fototoxicidad.....	14
1.2.2. DEGENERACIÓN HEREDITARIA DE LOS FOTORRECEPTORES.....	16
1.2.2.1. Modelos de degeneración hereditaria.....	16
1.2.2.1.1. La rata P23H.....	17
1.2.2.1.2. Otros modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores.....	18
1.2.3. DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES.....	18
1.2.4. DEGENERACIÓN DE LAS OTRAS CAPAS DE LA RETINA.....	20
1.2.5. AFECTACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA.....	26

3.2. FOTOEXPOSICIÓN.....	27
3.3 INYECCIÓN DE PEROXIDASA DE RÁBANO.....	29
3.4. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	29
3.5. PROCESADO HISTOLÓGICO.....	31
3.5.1. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.....	31
3.5.1.1. Montajes globales.....	32
3.5.1.1.1. Disección y procesado histológico de las retinas.....	32
3.5.1.2.1. Montajes globales en animales con inyección de peroxidasa de rábano.....	33
3.5.2. SECCIONES TRANSVERSALES.....	33
3.5.3. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA.....	34
3.5.3.1. Inmunohistofluorescencia en montajes globales de la retina.....	34
3.5.3.2. Inmunohistofluorescencia en secciones radiales.....	36
3.5.3.3. Anticuerpos utilizados.....	36
3.5.4. MARCAJE DE LOS NÚCLEOS EN APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL EN SECCIONES TRANSVERSALES DE RETINA.....	37
3.6. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	39
3.7. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE LAS RETINAS.....	42
3.7.1. PROCESADO DE IMÁGENES.....	42
3.7.1.1. Contaje automático de células ganglionares de la retina marcadas con Fluorogold.....	43
3.7.1.2. Contaje automático de células ganglionares de la retina detectadas con Bm3a.....	44
3.7.2. MAPAS DE ISODENSIDAD.....	45
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. DEGENERACIÓN DE LA RETINA TRAS FOTOTOXICIDAD.....	48
4.1.1. RUPTURA DE LA BARRERA HEMATO-RETINIANA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD: EL ÁREA ARCIFORME.....	48
4.1.2. ESTUDIO TEMPORAL DE LA MUERTE DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.....	54
4.1.2.1. Grupo Control (sin fotoexposición).....	54
4.1.2.2. Animales fotoexpuestos en el “túnel de luz”.....	55
4.1.2.3. Animales fotoexpuestos con tubos de luz en el techo.....	57
4.1.2.4. Degeneración de la retina a partir de los 6 meses tras la fotoexposición.....	59
4.1.2.5. Detección de los núcleos en apoptosis mediante la técnica TUNEL.....	61
4.1.3. ESTUDIO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS EN LA CAPA DE FIBRAS DE LA RETINA TRAS LA DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.....	64
4.1.3.1. Aspecto de las retinas control.....	64

4.1.3.2. Cambios en la capa de fibras tras la degeneración de los fotorreceptores.....	66
4.1.4. ESTUDIO TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS LA DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.....	71
4.1.4.1. Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales control.....	71
4.1.4.2. Estudio temporal de la población de CGR en los animales fotoexpuestos.....	74
4.2. DEGENERACIÓN DE LA RETINA EN LA RATA P23H-1.....	85
4.2.1. ESTUDIO TEMPORAL DE LA MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES EN LA RATA P23H-1.....	85
4.2.1.1. Grupo control de ratas Sprague-Dawley.....	85
4.2.1.2. Degeneración de los fotorreceptores en la retina de la rata P23H-1.....	85
4.2.2. ESTUDIO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS EN LA CAPA DE FIBRAS DE LA RETINA EN LA RATA P23H-1.....	88
4.2.2.1 Aspecto de las retinas controles.....	88
4.2.2.2. Cambios en la capa de fibras tras la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.....	88
4.2.3. ESTUDIO TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CGR EN LA RATA P23H-1.....	94
4.2.3.1. Estudio de la población de CGR en animales control.....	94
4.2.3.2. Estudio temporal de la población de células ganglionares de la retina tras la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.....	96
5. DISCUSIÓN.....	108
5.1. DEGENERACIÓN INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.....	108
5.1.1. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA FOTOTOXICIDAD EN LA RATA ALBINA Y LA PIGMENTADA.....	108
5.1.2. EXTRAVASACIÓN DE LA RETINA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD: EL "ÁREA ARCIFORME".....	109
5.1.3. DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES POR FOTOTOXICIDAD.....	111
5.1.4. MUERTE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	112
5.2. DEGENERACIÓN HEREDITARIA DE LOS FOTORRECEPTORES.....	115
5.2.1. POBLACIÓN DE CGR EN LA RATA P23H-1.....	115
5.2.2. DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES Y ALTERACIONES VASCULARES.....	116
5.2.3. MUERTE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	117
5.3. COMPARACIÓN ENTRE LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD Y LA HEREDITARIA.....	118
6. CONCLUSIONES.....	122
7. CONCLUSIONS.....	125
8. BIBLIOGRAFIA.....	128
9. ANEXO I.....	139
10. ANEXO II.....	151

AGRADECIMIENTOS

A la profesora María Paz Villegas Pérez, co-directora de esta Tesis Doctoral, que ha sido y sigue siendo una continua fuente de inspiración. Su espíritu crítico y continuos consejos me han enseñado a ser más exigente conmigo mismo, muchas veces ha sido para mí casi como una madre y, sin duda, un ejemplo a seguir.

A la Dra. Marta Agudo Barriuso, co-directora de esta Tesis, que me introdujo en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia, sus continuas y pacientes explicaciones me han ayudado a darle sentido a todo cuánto hacía, sin duda ha sido y será una influencia importante a lo largo de mi carrera científica.

Al profesor Manuel Vidal Sanz tengo que agradecerle que me acogiese en su laboratorio y apostase por mí desde el primer momento. Ha sido para mí una importante fuente de información, tanto científica como en la vida, me enseñó que “la ciencia no tiene horario, ni fecha en el calendario” y que merece la pena trabajar duro, pero sobretodo, me enseñó a trabajar con rigor científico.

Todos ellos han contribuido en gran medida a la realización y redacción de esta Tesis Doctoral. De corazón, GRACIAS.

Al Dr. Manuel Salinas Navarro, quién me enseñó las técnicas quirúrgicas empleadas en esta tesis y la disección de retinas a plano. Ha sido un colaborador infatigable, siempre he admirado su capacidad de trabajo.

A la Dra. Paloma Sobrado Calvo, que siempre ha apostado por mí, tengo que agradecerle sus inagotables consejos, tanto en la docencia, la clínica, la investigación, como en la vida. Su capacidad de trabajo y sacrificio ha sido un ejemplo para mí.

A todos los miembros del Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, por todos los momentos que hemos pasado y pasaremos juntos. A Caridad Galindo, la benjamina del laboratorio, solo ella sabe todo lo que me ha ayudado, gracias por estar siempre ahí. A Fran Nadal por su capacidad de trabajo y ayuda, por su bondad, pero sobre todo por su amistad. A Arturo Ortín, que más que un compañero ha sido un amigo. A Leticia Nieto, por su inolvidable apoyo técnico, que ha ido un paso más allá de la perfección, por su alegría. A Fco Javier Valiente por todos los buenos momentos que hemos vivido juntos, que han sido muchos. A Manuel Jiménez “el informático”, sin su capacidad de esfuerzo y excelente trabajo todo sería más difícil. Al Dr. Marcelino Avilés, por sus consejos. Al Dr. Luis Alarcón, por su alegría. A Paqui, última incorporación del laboratorio. A Miriam, por su compañerismo. A José Manuel Bernal, por su incansable y valioso apoyo técnico. A M^a Dolores Soria, por su alegría y por su indescriptible apoyo administrativo, porque tiene

una solución para casi todo. A todas las personas que en algún momento han pasado por el Laboratorio, porque todos han dejado una parte de ellos en los que aún quedamos, Luis Montalbán, M^a Cruz, Isa, Sergio Rodríguez...GRACIAS.

Al profesor Pete Coffey, al Dr. Anthony Vugler y a la Dra. Ma'ayan Semo, por haberme acogido con tanto cariño en mi estancia en Londres y tratar de hacer que en todo momento me sintiera como en casa. Por sus múltiples lecciones científicas.

Al Dr. Nicolás Cuenca y la Dra. Isabel Pinilla, por facilitarnos las ratas P23H, usadas para esta Tesis Doctoral.

A todos mis amigos, que aunque no lo crean, han sido un apoyo importante en los momentos más difíciles.

A mis padres, porque si he podido llegar hasta aquí ha sido gracias a ellos. Nadie mejor que ellos sabe lo difícil que ha sido. Gracias por darme la oportunidad de llegar a ser lo que soy hoy. Sin vuestro constante apoyo no hubiera sido posible.

A mis hermanos, Javier, Chiti y Alejandro, que han sabido aguantarme en los momentos más duros y han estado siempre ahí para ayudarme.

RESUMEN

Introducción

Estudios previos de nuestro laboratorio documentaron por primera vez que la degeneración de los fotorreceptores en ratas pigmentadas conduce a la compresión de los axones de las células ganglionares de la retina provocando la posterior muerte de estas. Las causas por las que la pérdida de los fotorreceptores afecta a la población de células ganglionares de la retina no son bien conocidas, ya que no está claro si dependen de factores como la pigmentación ocular o la etiología de la degeneración. Para intentar dilucidar estas cuestiones, en este trabajo hemos analizado el curso temporal de degeneración de los fotorreceptores, y la consecuente afectación de retina interna en dos modelos de degeneración retiniana: uno inducido por fototoxicidad y otro causado por una mutación genética hereditaria. Posteriormente, realizamos un análisis detallado, tanto cuantitativo como topográfico, de la afectación de las células ganglionares de la retina tras la pérdida de estos fotorreceptores inducida por ambas etiologías.

Objetivos

Desarrollar un modelo de degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad en rata albina. Caracterizar los efectos de la fototoxicidad a largo plazo en la retina, en concreto en la población de células ganglionares de la retina y en sus axones tras la pérdida de fotorreceptores. Estudiar si la dilatación pupilar influye en la degeneración.

Analizar la evolución de la degeneración de la retina de la rata P23H-1, una rata albina que sufre una degeneración hereditaria de los fotorreceptores. Caracterizar los efectos de la pérdida de fotorreceptores, a largo plazo, en la población de células ganglionares de la retina y en sus axones.

Realizar una comparación de estos dos modelos animales de degeneración retiniana. Comprobar si la degeneración cursa de forma similar o diferente dependiendo de su etiología.

Material y métodos

En este trabajo se han utilizado ratas hembra albina adultas de 2 estirpes diferentes: Sprague-Dawley y P23H-1 homocigóticas. Se realizaron distintos grupos experimentales organizados según las manipulaciones experimentales.

Para desarrollar el modelo experimental de degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad, se fotoexpusieron ratas albinas Sprague-Dawley a una fuente de luz blanca fría fluorescente durante 48 horas. Antes de la fotoexposición se instiló a los animales una gota de

atropina en el ojo izquierdo para provocar una midriasis máxima, que se mantendría durante todo el periodo de fotoexposición. La fotoexposición siempre comenzó en el mismo intervalo horario, ya que el ritmo circadiano puede afectar a la severidad de la degeneración por fototoxicidad. Se utilizaron dos fuentes de luz distintas: un “túnel de luz” (en el que los tubos de luz rodean las cajas de los animales) y unos tubos de luz en el techo (por encima de las cajas de los animales).

Se realizaron varios grupos experimentales organizados según el objetivo y la duración del periodo de estudio tras la exposición a la luz (en el caso de animales fotoexpuestos) o tras el nacimiento (en el caso de los animales con degeneración hereditaria de los fotorreceptores). Estos tiempos fueron: inmediatamente, 7 días, 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras la fotoexposición en las ratas SD y 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el nacimiento en las ratas P23H-1.

Para estudiar el curso temporal de degeneración de los fotorreceptores se realizaron cortes sagitales del ojo de un espesor de 3 μm en un microtomo. Estos cortes fueron posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina o procesados para la detección de núcleos apoptóticos mediante la técnica de TUNEL.

Otros ojos fueron procesados para realizar montajes globales de las retinas, y en ellos se realizaron las siguientes técnicas:

Para estudiar la vascularización de la retina tras la fototoxicidad algunos animales recibieron una inyección en la vena femoral de una solución de peroxidasa de rábano (HRP) diluida en suero salino 15 minutos antes de ser sacrificados.

Para estudiar el efecto de la pérdida de fotorreceptores en la población de células ganglionares de la retina, una semana antes del procesado del animal se aplicó en la superficie de ambos colículos superiores el trazador neuronal fluorescente Fluorogold para trazar, por transporte axonal retrógrado, las células ganglionares de la retina. Tras la disección de la retina se realizó la inmunodetección del Brn3a, que es un factor de transcripción específico de las células ganglionares de la retina.

Para estudiar el efecto de la pérdida de los fotorreceptores en los axones intrarretinianos de las células ganglionares de la retina que forman la capa de fibras nerviosas, se inmunodetectó la subunidad pesada fosforilada de los neurofilamentos en las retinas que habían sido previamente trazadas con FG e inmunodetectadas con Brn3a. Además, de algunos ojos se realizaron secciones sagitales de 15 μm de grosor en el criostato y fueron procesadas para la inmunodetección de la subunidad pesada del neurofilamento y de las células endoteliales de los vasos retinianos.

Todas las muestras fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia equipado con una platina motorizada controlada por un sistema de análisis de imagen: Image-Pro

Plus® (IPP 5.1 para Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para hacer reconstrucciones de las retinas completas se capturaron imágenes individuales de forma secuencial y no solapada comprendiendo toda la superficie de la retina y posteriormente fueron unidas para formar el fotomontaje de la retina completa. Las imágenes digitales individuales, tanto de Fluorogold como de Brn3a, fueron procesadas por una serie de rutinas específicas para cada marcador, desarrolladas con el programa de análisis de imagen IPP para realizar el conteo automático. Los datos cuantitativos obtenidos de cada retina, se usaron para generar los correspondientes mapas de isodensidad de las CGR.

Resultados

El marcaje de los vasos sanguíneos con peroxidasa de rábano (HRP) en los montajes globales de las retinas, nos permitió documentar que en el cuadrante superotemporal de las mismas se producía una extravasación difusa de esta sustancia en algunos de los animales fotoexpuestos. Esta extravasación fue observada inmediatamente tras la fotoexposición y se mantenía hasta los 7 días tras la fotoexposición.

El grosor medio de la capa nuclear externa en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina fue de 10-12 núcleos en los animales controles. Tanto en las ratas Sprague-Dawley fotoexpuestas como en las ratas P23H-1 se observó una degeneración progresiva de los fotorreceptores que era, al principio, más severa en la zona dorsal de la retina en los animales fotoexpuestos y en la zona ventral de la retina en las ratas P23H-1. El efecto de la fotoexposición al túnel de luz fue más severo, al menos durante los primeros meses tras la fotoexposición, que la fotoexposición a los tubos de luz en el techo. Sin embargo, a los 3 meses tras la fotoexposición no hubo diferencias entre la degeneración inducida por ambas fuentes de luz.

La desorganización retiniana continuó avanzando con el tiempo tras la fotoexposición o tras el nacimiento y a los 6 meses la capa nuclear externa había desaparecido en los dos modelos experimentales. Es en este momento cuando comienza a observarse la aparición de complejos vasculares subretinianos situados entre el epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch. Estos vasos subretinianos están conectados con vasos verticales que están rodeados de células del epitelio pigmentario de la retina, que migran a lo largo de su superficie. Estos vasos verticales son vasos de retina interna que han sido arrastrados hacia los vasos subretinianos, su frecuencia de aparición aumenta con la duración del periodo de estudio y, en su trayecto, arrastran los axones de las células ganglionares de la retina, comprimiéndolos y provocando la muerte de las mismas.

La técnica de TUNEL nos permitió documentar que la muerte de fotorreceptores tras fototoxicidad ocurre, al menos en parte, por la vía de la apoptosis. Además, pudimos observar como los núcleos TUNEL positivos (en apoptosis) se observaban con mayor frecuencia inmediatamente tras la fotoexposición en la retina dorsal, en la zona que coincidiría con la extravasación de

peroxidasa observada previamente en los montajes globales. La cantidad de núcleos TUNEL positivos disminuía al aumentar el tiempo tras la fotoexposición, no observándose ningún núcleo en apoptosis 1 mes tras la fotoexposición.

En la capa de fibras nerviosas de los animales control se observó una disposición de los axones muy similar a la que había sido previamente descrita (trayectoria centrípeta y rectilínea y marcaje más intenso en las porciones más centrales de la retina). Este patrón se mantuvo en los animales fotoexpuestos hasta los 3 meses tras la fotoexposición y en las ratas P23H-1 hasta los 6 meses tras el nacimiento. A partir de entonces, podía observarse, a gran aumento, como las trayectorias de los axones estaban distorsionadas mostrando áreas de estrangulamiento axonal. Estos estrangulamientos eran el resultado de las compresiones axonales causadas por el desplazamiento de vasos de retina interna y eran más frecuentes, al principio, en la retina dorsal en los animales fotoexpuestos y en la retina ventral en las ratas P23H-1. No obstante, con el tiempo estas compresiones axonales aparecían cada vez con mayor frecuencia y severidad, extendiéndose por toda la retina en los dos modelos experimentales.

El número medio de células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold desde el colículo superior en las retinas de los animales Sprague-Dawley control fue de 81.381 ± 3.722 (Media \pm DEM) a los 2 meses de edad, de 83.641 ± 2.751 a los 12 meses de edad y de 81.871 ± 4.040 a los 20 meses de edad. La inmunodetección con Brn3a en estas mismas retinas reveló un número medio de células ganglionares de la retina marcadas de 85.997 ± 3.562 a los 2 meses de edad, de 85.861 ± 3.982 a los 12 meses de edad y de 82.810 ± 3.544 a los 20 meses de edad. Estos datos confirman que el número medio de células ganglionares de la retina no sufre variaciones con la edad en estos animales, al menos durante los 20 primeros meses de edad.

En los mapas de isodensidad se observó que la mayor densidad de CGR en las retinas de los animales controles se encuentra en una región horizontal 1 mm por encima del disco óptico.

En las ratas Sprague-Dawley fotoexpuestas, se observó una disminución en el número medio de células ganglionares de la retina que fue significativa a los 6 meses tras la fotoexposición. El número medio de células ganglionares de la retina disminuía conforme aumentaba el tiempo de supervivencia del animal tras la fotoexposición con independencia del marcador utilizado, siendo el número medio de éstas de 70.806 ± 2.422 (n=8) y 67.228 ± 5.121 (n=10) a los 9 y 12 meses tras la fotoexposición, respectivamente, cuando eran trazadas con Fluorogold y de 72.260 ± 1.816 (n=8) y 68.651 ± 3.825 (n=10) a los 9 y 12 meses tras la fotoexposición, respectivamente, cuando eran inmunodetectadas con Brn3a.

En las ratas P23H-1 se observó una disminución en el número medio de células ganglionares de la retina que fue significativa a los 12 meses de edad. El número medio de células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold fue de 75.786 ± 1.894 (n=10), 75.184 ± 1.913

(n=10), 76.667 ± 3.576 (n=12), 73.960 ± 4.687 (n=10) y 69.921 ± 3.150 (n=10) en los animales procesados 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el nacimiento, respectivamente, siendo el número medio de células ganglionares de la retina inmunodetectadas con Brn3a en estas mismas retinas de 81.599 ± 2.903 (n=10), 81.338 ± 2.845 (n=10), 81.372 ± 4.345 (n=12), 77.921 ± 3.476 (n=10) y 74.503 ± 2.795 (n=10) en los animales procesados 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el nacimiento, respectivamente.

Cuando comparamos los resultados obtenidos con ambas estirpes, observamos que el número de células ganglionares de la retina en la rata P23H-1 es inferior al de la rata Sprague-Dawley, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ya en el primer tiempo estudiado: 1 mes de edad.

Conclusiones

La exposición de ratas hembra adultas Sprague-Dawley a luz blanca fría fluorescente provoca muerte de fotorreceptores que es mayor, en principio, en la región dorsal de la retina aunque posteriormente se extiende al resto de la retina. Esta muerte ocurre principalmente por la vía de la apoptosis.

La fuente de luz utilizada influye en la muerte de fotorreceptores, siendo más severa cuando los animales se exponen al "túnel" de luz que rodea las cajas que cuando se exponen a los tubos de luz en el techo.

La dilatación pupilar también influye en la muerte de fotorreceptores, al menos al principio, ya que ésta es más grave en los ojos en los que se dilata la pupila, al menos en los 3 primeros meses tras la fotoexposición.

La muerte de fotorreceptores en la rata P23H-1 muestra en su inicio una regionalidad, siendo más severa en la retina ventral.

La población de células ganglionares de la retina en las ratas P23H-1 homocigóticas es inferior a la observada en las ratas Sprague-Dawley, incluso al mes de edad de estos animales transgénicos.

En ambos modelos, se observa una regionalidad en la degeneración de los fotorreceptores que depende de la etiología de la degeneración: en la degeneración inducida por fototoxicidad comienza en la retina dorsal y en la degeneración hereditaria comienza en la retina ventral.

Se observa también una regionalidad de las alteraciones vasculares y axonales, que depende de la etiología de la degeneración ya que comienza en la retina dorsal en la degeneración inducida por fototoxicidad y en la retina ventral en la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

No obstante, los eventos que se producen en su desarrollo son similares en los dos modelos experimentales, lo que indica que son secundarios a la degeneración de fotorreceptores. Estos eventos dan lugar a una disminución en el número medio de células ganglionares de la retina, que ha sido observada tanto si las células ganglionares de la retina se identifican por marcaje axonal retrógrado con Fluorogold, como por inmunodetección del Brn3a, por lo que se puede descartar que sea debido a un déficit en el transporte axonal.

SUMMARY

Introduction

Previous studies from our laboratory have documented for the first time that both light-induced and inherited photoreceptor degenerations cause retinal ganglion cell axonal compression and subsequent cell death. Because these studies were carried out in pigmented rats, it is not clear whether these degenerative events depend on ocular pigmentation. In this work we have analyzed the temporal course of photoreceptor degeneration and the subsequent affection of the inner retina using two different experimental models in albino rats: one light-induced and the other due to an inherited genetic mutation. In both models, we carry out a detailed analysis, quantitative and qualitative, of the retinal ganglion cell population. Later, we compare the degenerative events observed in both models after the complete loss of photoreceptors.

Objectives

To develop an experimental model of light-induced retinal degeneration in the albino rat. To characterize the long-term effects of light exposure on the albino rat retina, focusing on the retinal ganglion cell population. To study whether the light source or pupil dilation influence the degeneration.

To analyze the course of the retinal degeneration in the P23H-1 homozygous rat strain, which suffers an inherited photoreceptor degeneration. To characterize the long-term effects of photoreceptor loss on the retinal ganglion cell population.

To compare both experimental models of retinal degeneration. To check whether the degeneration progresses similarly in both models, despite having different etiology.

Material and methods

In this work we have used two different strains of adult albino rats: Sprague-Dawley and homozygous P23H-1. Different series of experimental groups were organized according to the experimental manipulations carried out.

To develop an experimental model of light-induced retinal degeneration, albino Sprague-Dawley animals were exposed to cool fluorescent white lamps during 48 hours. Before light exposure the left pupil was dilated with a drop of atropine. Light exposure always started at the same time slot, as it has been shown previously that the circadian rhythm can affect the severity of the light-induced retinal degeneration. Two different light sources were used: linear bulbs situated in the ceiling or circular bulbs situated around the transparent cages.

Several experimental groups were organized according to the purpose and duration of the period of study after phototoxicity or after birth (P23H strain). Those time points were: immediately, 7 days, 1, 3, 6, 9 and 12 months after light exposure and 1, 3, 6, 9, and 12 months after birth.

To study the temporal course of photoreceptor degeneration three microns thick sagittal retinal cross-sections were obtained. These sections were stained with Hansen's haematoxylin and eosin or processed for terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) to detect apoptotic nuclei.

Other eyes were processed for retinal whole-mounts, and to those, the following techniques were applied:

To investigate the integrity of the retinal blood vessels in the photoexposed animals, a solution of type I horseradish peroxidase was injected in the femoral vein of some animals fifteen minutes before processing.

In order to investigate the effect of photoreceptor degeneration in the retinal ganglion cell population, Fluorogold was applied to both superior colliculi one week before animal processing to retrogradely label the retinal ganglion cells. In these retinas, retinal ganglion cells were also identified by their Brn3a expression (a specific retinal ganglion cell transcription factor).

To investigate the effect of photoreceptor loss on the intraretinal retinal ganglion cell axons, the phosphorylated high molecular weight subunits of the neurofilament triplet (pNFH) were immunodetected by incubation of the whole-mounted retinas with the RT97 antibody. Moreover, some eyes were processed for cryostat sectioning and subjected to double immunohistofluorescence with the RT97 and the anti-RECA (Rat Endothelial Cell Antigen) antibodies to detect the high molecular weight subunits of the neurofilament triplet (NFH) and the endothelial cells of the retinal blood vessels.

Both retinal whole-mounts and cross-sections were examined and photographed under a fluorescent microscope equipped with a computer-driven motorized stage controlled by Image-Pro Plus[®] (IPP 5.1 for Windows[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). To make reconstructions of retinal whole-mounts, retinal multiframe acquisitions were acquired in a raster scan pattern using a x10 objective. Single frames were focused manually prior to the capture of the digitized images. We usually need to acquire 154 images to scan the entire retina. For Fluorogold and Brn3a traced retinas, the individual fluorescent images taken in each retina were processed by a specific cell counting subroutine developed by our group for automatic cell counting. To demonstrate the spatial distribution of both Fluorogold-labelled or Brn3a positive retinal ganglion cells, we constructed isodensity maps for each retina, using the specific subroutine developed in our laboratory, in which retinal ganglion cells counts were obtained and cell densities calculated. These densities were represented as filled contour plots using graphing software (Sigmaplot[®]).

Results

Horseradish peroxidase labelling in whole-mounted retinas, allowed us to document vascular leakage in some of the photoexposed retinas. Hoseradish peroxidase leakage was found in the previously described “arciform area” of the superotemporal retina. This leakage was observed immediately and at 7 days after light exposure.

In the haematoxylin and eosin stained sections, control animals showed an outer nuclear layer 12 to 14 nuclei thick and an inner nuclear layer 3 to 4 nuclei thick. Both photoexposed and P23H-1 rats showed progressive loss of photoreceptors which was more severe, at first, in the dorsal retina in photoexposed animals and in the ventral retina in P23H-1 rats. In photoexposed animals both circular bulbs and pupil dilation induced a more severe photoreceptor loss but only up to the 3rd month after light exposure, and henceforth the appearance of the retina was similar in both experimental groups.

Retinal disorganization increased with time in both models of retinal degeneration and by 6 months the outer nuclear layer had disappeared in both models. By this time, tortuous “vascular complexes” begin to appear between the retinal pigment epithelium and Bruch’s membrane, and some blood vessels were observed running vertically in the retina connecting these “vascular complexes” with the inner retinal vascular plexus. These vertical vessels are inner retinal vessels that are being pulled towards the subretinal vessels and in doing so, drag retinal ganglion cell axons distorting their trajectories, compressing them and subsequently causing retinal ganglion cell death (see below). The number and frequency of these vascular abnormalities increased with age in both models.

To assess whether photoreceptor loss after light exposure was due to apoptosis, the TUNEL assay was carried out in cross sections of control and experimental retinas at various survival intervals after light exposure. TUNEL-positive nuclei were detected in the outer nuclear layer of the animals processed at early times, 0 and 7 days after light exposure, but not at 1 month after light exposure, in spite of the fact that, according to the haematoxylin/eosin stained sections, photoreceptors continue to degenerate during at least 3 months after light exposure. These data indicate that photoreceptor death due to phototoxicity occurs at least in part, by apoptosis. Moreover, we noticed that TUNEL positive nuclei were seen more often in the dorsal retina, where the vascular leakage was seen in the retinal whole-mounts and the more severe photoreceptor loss was seen in haematoxylin/eosin stained cross sections.

In control retinas, retinal ganglion cell axons showed a linear trajectory from the optic disc to the medial region of the retina. This linear trajectory and expression pattern was maintained in the retinas processed early after light exposure (within the first three months) and in the P23H-1 rats until the sixth month of life. By this time onwards, retinal ganglion cell axons presented distorted non-linear trajectories caused by regions of axonal strangulations. These axonal strangulations were seen at first in the dorsal retina in the photoexposed animals and in the ventral retina in the P23H-1 rats. However, with time the compressions extended throughout the retina and became more frequent and severe in

both models. Axonal bulbs and wandering axons could be seen above and below the compression points. These axonal strangulations are caused by the external displacement of vessels that cross the retinal nerve fiber layer and drag the retinal ganglion cell axons (see above), eventually severing them.

The population of FG-labelled retinal ganglion cells in control Sprague-Dawley rats was $81,381 \pm 3,722$ (Mean \pm SD), $83,641 \pm 2,751$ and $81,871 \pm 4,040$ in two, twelve and twenty month old animals, respectively. Brn3a immunodetection in the same retinas revealed a population of $85,997 \pm 3,562$, $85,861 \pm 3,982$ and $82,810 \pm 3,544$, retinal ganglion cells, respectively. These data confirm that the average number of retinal ganglion cells does not change with age in this strain, at least during the first twenty months of age.

In the photoexposed Sprague-Dawley rats there was a decrease of the mean number of retinal ganglion cells that became significant six months after light exposure. The numbers of retinal ganglion cells decreased with time regardless of the marker used to identify these cells. The mean numbers of Fluorogold-labelled retinal ganglion cells were, $70,806 \pm 2,422$ (n=8) and $67,228 \pm 5,121$ (n=10) at 9 and 12 months after light exposure, respectively, and the mean numbers of Brn3a immunodetected retinal ganglion cells in the same animals were $72,260 \pm 1,816$ (n=8) and $68,651 \pm 3,825$ (n=10), respectively.

In P23H-1 rats there was a decrease of the mean numbers of retinal ganglion cells with age. The mean number of Fluorogold-labelled retinal ganglion cells in these animals was $75,786 \pm 1,894$ (n=10), $75,184 \pm 1,913$ (n=10), $76,667 \pm 3,576$ (n=12), $73,960 \pm 4,687$ (n=10) and $69,921 \pm 3,150$ (n=10), 1, 3, 6, 9 and 12 months after birth, respectively, while the mean numbers of Brn3a immunodetected retinal ganglion cells in the same retinas were $81,599 \pm 2,903$ (n=10), $81,338 \pm 2,845$ (n=10), $81,372 \pm 4,345$ (n=12), $77,921 \pm 3,476$ (n=10) and $74,503 \pm 2,795$ (n=10), respectively. The decrease in the mean numbers of retinal ganglion cells was significant at 12 months of age.

Isodensity maps disclosed an apparently normal spatial distribution of RGCs in the retinas at early time points and an area of high density of RGCs in the superotemporal region of the retina, as previously reported. However, twelve months after light exposure in the photoexposed animals, or after birth in the P23H-1 strain, we observed a clear diminution of the retinal ganglion cells densities all throughout the retina. In the photoexposed animals some retinas showed also a few wedge-shaped areas of retinal ganglion cell loss by 12 months after light exposure. These areas were not seen in the P23H-1 strain.

Comparison of the mean numbers of retinal ganglion cells between the two strains of rats used showed that in 1 month old animals, the mean numbers of retinal ganglion cells in the P23H-1 strain were lower than in the Sprague-Dawley strain. Therefore, the P23H-1 strain has a lower number of RGCs than their homologous SD strain.

Conclusions

Exposure of adult albino Sprague-Dawley rats to cool fluorescent white light induces photoreceptor loss which is more severe, at first, in the dorsal retina. This loss takes place mainly by apoptosis and spreads with time all throughout the retina.

The light source influences photoreceptor loss, because this loss is more severe during the first three months when circular bulbs situated around the transparent cages were used.

Pupil dilation also influences photoreceptor loss, because during the first three months after light exposure photoreceptor loss is more severe in the dilated (left) eyes.

Photoreceptor loss in the P23H-1 strain takes place mainly by apoptosis and is more severe, at first, in the ventral retina.

The population of retinal ganglion cells in the homozygous P23H-1 strain is smaller than in their homologous Sprague-Dawley rats.

In the light exposed animals, six months or more after light exposure, subretinal “vascular complexes” and axonal compression due to vessels that ran vertically from the inner retinal vascular plexus and are connected with those “vascular complexes” is observed. These events are also observed in the P23H-1 rat strain at six months or more of age.

There are differences in the topography of photoreceptor loss and the location of the vascular and axonal alterations between the two experimental models. Retinal degeneration begins and is more severe in the dorsal retina in the light induced retinal degeneration and in the ventral retina in the inherited degeneration and therefore, these topographical differences depend on the etiology of the degeneration. However, the degenerative events observed in the retina after photoreceptor degeneration are similar in both experimental models, indicating that they are a consequence of photoreceptor degeneration and do not depend on its etiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARVO	Del inglés “ <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i> ”.
BSA	Del inglés “ <i>Bovine Serum Albumine</i> ”.
CCG	Capa de células ganglionares.
CFN	Capa de fibras nerviosas.
CGR	Células ganglionares de la retina.
CNE	Capa nuclear externa.
CNI	Capa nuclear interna.
CPE	Capa plexiforme externa.
CPI	Capa plexiforme interna.
CSEFR	Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores.
DAPI	4',6-diamidina-2-fenilindol.
DEM	Desviación estandar de la media.
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad.
EPR	Epitelio pigmentario de la retina.
FG	Fluorogold.
H&E	Hematoxilina y Eosina.
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés “ <i>horseradish peroxidase</i> ”).
i.p.	Intraperitoneal.
MLE	Membrana limitante externa.
MLI	Membrana limitante interna.
NDS	Suero normal de burro (del inglés “ <i>normal donkey serum</i> ”).
NO	Nervio óptico.

OSA	Sociedad Óptica de América (del inglés " <i>Optical Society of America</i> ").
P"X"	"X" días tras el nacimiento.
PBS	Tampón fosfato salino 0,1 M a 4°C.
PF	Paraformaldehído.
pNFH	Subunidad pesada altamente fosforilada del neurofilamento (del inglés " <i>phosphorylated neurofilament heavy subunit</i> ").
RECA	Antígeno de células endoteliales de rata (del inglés " <i>rat endothelial cell antigen</i> ").
SD	Sprague-Dawley.
TdT	Transferasa de terminal deoxinucleotidilo (del inglés " <i>Deoxynucleotidil transferasa terminal</i> ").
TFE	Tras la fotoexposición.
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina (del inglés "Tetramethyl Rhodamina isothiocyanate").
TUNEL	Marcaje de núcleos en apoptosis (Del inglés " <i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i> ").

LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)

FIGURAS:

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1**, pág. 3: Esquema general del ojo humano.
- Figura 1.2**, pág. 7: Dibujo de las neuronas retinianas realizado por Santiago Ramón y Cajal.
- Figura 1.3**, pág. 9: Estructura de los fotorreceptores y sus conexiones sinápticas
- Figura 1.4**, pág. 10: Mapas de isodensidad donde se muestra la distribución paralela de las células ganglionares de la retina y los conos L/M en la retina de la rata.
- Figura 1.5**, pág. 11: Mapas de isodensidad donde se muestra la distribución de las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a.
- Figura 1.6**, pág. 14: Espectro de las radiaciones electromagnéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 3.1**, pág. 28: Imagen de las cajas y los tubos utilizados para la fotoexposición con tubos de luz.
- Figura 3.2**, pág. 28: Imagen de las cajas y el "túnel de luz" utilizados para la fotoexposición.
- Figura 3.3**, pág.31: Esquema representativo de la aplicación del trazador neuronal Fluorogold en ambos colículos superiores.
- Figura 3.4**, pág. 35: Esquema representativo de la técnica de inmunohistofluorescencia para la detección de la proteína nuclear Brn3a de las células ganglionares de la retina.
- Figura 3.5**, pág. 38: Esquema representativo de la técnica de TUNEL.
- Figura 3.6**, pág. 43: Imagen que ilustra dos microfotografías realizadas para la reconstrucción de los fotomontajes.
- Figura 3.7**, pág. 44: Imagen de dos fotomontajes de una retina montada a plano y fotografiada para detectar la señal de Fluorogold y Brn3a.

RESULTADOS

- Figura 4.1**, pág. 50: Imagen representativa del marcaje de los vasos de la retina con peroxidasa de rábano.
- Figura 4.2**, pág. 51: Imagen representativa de la extravasación difusa de peroxidasa de rábano en el área arciforme.
- Figura 4.3**, pág. 52: Imagen representativa de la extravasación difusa de peroxidasa de rábano 7 días tras la exposición a la luz.
- Figura 4.4**, pág. 53: Imagen representativa del marcaje de los vasos de la retina 1 mes tras la fotoexposición.
- Figura 4.5**, pág. 54: Imagen representativa de una sección transversal de una retina control teñida con hematoxilina y eosina.
- Figura 4.6**, pág. 56: Imágenes representativas de secciones transversales de retinas teñidas con hematoxilina y eosina correspondientes a los animales fotoexpuestos al “túnel de luz” y procesados a distintos tiempos tras la fotoexposición.
- Figura 4.7**, pág. 58: Imágenes representativas de secciones transversales de retinas teñidas con hematoxilina y eosina correspondientes a los animales fotoexpuestos a los tubos de luz en el techo y procesados a distintos tiempos tras la fotoexposición.
- Figura 4.8**, pág. 60: Imágenes representativas de secciones transversales de retinas teñidas con hematoxilina y eosina correspondientes a animales fotoexpuestos y procesados 6 meses o más después de la fotoexposición.
- Figura 4.9**, pág. 63: Imágenes representativas de secciones transversales que muestran que la fotoexposición induce la apoptosis de los fotorreceptores.
- Figura 4.10**, pág. 65: Imagen representativa de un fotomontaje de una retina de un animal control en la que se han inmunodetectado los axones de las células ganglionares de la retina.
- Figura 4.11**, pág. 66: Detalle de los axones de las células ganglionares de la retina en una retina control.
- Figura 4.12**, pág. 67: Alteraciones en la capa de fibras nerviosas en los 6 primeros meses tras la degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad.
- Figura 4.13**, pág. 68: Alteraciones de la capa de fibras nerviosas de 9 a 12 meses tras la fotoexposición.

- Figura 4.14**, pág. 69: Microfotografías que muestran como los axones de las células ganglionares de la retina son arrastrados por vasos retinianos desplazados.
- Figura 4.15**, pág. 70: Microfotografías que muestran detalles de las alteraciones de la capa de fibras nerviosas tras la degeneración de los fotorreceptores inducida por fototoxicidad.
- Figura 4.16**, pág. 72: Fotomontajes de una retina de un animal control de 2 meses de edad que muestra las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.17**, pág. 73: Fotomontajes de una retina de un animal control de 20 meses de edad que muestra las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.18**, pág. 78: Histograma que muestra el porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold en animales control y experimentales.
- Figura 4.19**, pág. 79: Histograma que muestra el porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold o inmunodetectadas con Brn3a en animales control y experimentales.
- Figura 4.20**, pág. 80: Imágenes de fotomontajes de retinas experimentales de ratas con sus células ganglionares de la retina marcadas con Fluorogold y sus correspondientes mapas de isodensidad, analizadas inmediatamente, 1 mes y 3 meses tras la fotoexposición.
- Figura 4.21**, pág. 81: Imágenes de fotomontajes de retinas experimentales de ratas con sus células ganglionares de la retina marcadas con Fluorogold y sus correspondientes mapas de isodensidad, analizadas 6, 9 y 12 meses tras la fotoexposición.
- Figura 4.22**, pág. 82: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 9 meses tras la fotoexposición que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.23**, pág. 83: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 12 meses tras la fotoexposición que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.

- Figura 4.24**, pág. 84: Mapas de isodensidad correspondientes a las células ganglionares trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a de una retina de un animal fotoexpuesto y procesado 12 meses tras la fotoexposición que muestran la pérdida sectorial de células ganglionares de la retina.
- Figura 4.25**, pág. 86: Microfotografías de secciones transversales teñidas con hematoxilina y eosina que muestran el curso temporal de la degeneración de la retina de la rata P23H-1.
- Figura 4.26**, pág. 89: Fotomontaje que muestra la inmunodetección de los axones de las células ganglionares de la retina en un animal control.
- Figura 4.27**, pág. 90: Alteraciones de la capa de fibras nerviosas en la rata P23H.
- Figura 4.28**, pág. 91: Alteraciones en la capa de fibras nerviosas en la rata P23H-1 a los 12 meses de edad.
- Figura 4.29**, pág. 92: Alteraciones axonales en la retina de la rata P23H-1.
- Figura 4.30**, pág. 93: Microfotografías que muestran como los axones de las células ganglionares de la retina son arrastrados por vasos retinianos desplazados en la retina de la rata P23H.
- Figura 4.31**, pág. 95: Fotomontajes de una retina de un animal control de 12 meses de edad que muestra las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.32**, pág. 100: Histograma que muestra el porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a en retinas de ratas Sprague-Dawley control y P23H a los diferentes tiempos de estudio.
- Figura 4.33**, pág. 101: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 1 mes tras el nacimiento que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.34**, pág. 102: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 3 meses tras el nacimiento que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.

- Figura 4.35**, pág. 103: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 6 meses tras el nacimiento que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.36**, pág. 104: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 9 meses tras el nacimiento que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 4.37**, pág. 105: Fotomontajes de una retina experimental de un animal procesado 12 meses tras el nacimiento que muestran las células ganglionares de la retina trazadas con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad.

TABLAS:

RESULTADOS

- Tabla 4.1**, pág. 61: Curso temporal de la degeneración de la retina tras la fotoexposición en función de la fuente de luz y la dilatación pupilar.
- Tabla 4.2**, pág. 76: Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold en retina de animales control y experimentales a diferentes tiempos de estudio tras la fotoexposición.
- Tabla 4.3**, pág. 77: Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a en las retinas de animales control y experimentales, 9 y 12 meses después de la fotoexposición.
- Tabla 4.4**, pág. 98: Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a en las retinas de animales control y experimentales (P23H), de 1 a 3 meses de edad.
- Tabla 4.5**, pág. 99: Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold e inmunodetectadas con Brn3a en las retinas de animales control y experimentales (P23H), de 6 a 12 meses de edad.
- Tabla 4.6**, pág. 106: Comparación de los eventos que tienen lugar en los dos tipos de degeneración estudiados.

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio en profundidad del efecto de la degeneración de los fotorreceptores en la población de las células ganglionares de la retina en dos modelos experimentales de degeneración de los fotorreceptores con diferente etiología: uno inducido por fototoxicidad y otro hereditario, producido por la mutación P23H de la rodopsina.

En esta tesis se distinguen siete partes: introducción, objetivos, material y métodos, resultados, discusión, conclusiones y bibliografía.

La introducción consta de cuatro apartados. En el primero de ellos se repasan los conceptos anatómicos y fisiológicos básicos del sistema visual del animal de experimentación utilizado en nuestro estudio, la rata adulta, particularmente la retina y en concreto las características de los fotorreceptores y las células ganglionares de la retina. En el segundo se describen las técnicas empleadas históricamente para la identificación, cuantificación y estudio de la población de fotorreceptores y células ganglionares de la retina en roedores. El tercer apartado es un breve recordatorio de las enfermedades humanas que cursan con la degeneración de los fotorreceptores. El cuarto apartado realiza una revisión de los modelos experimentales utilizados en esta tesis, así como aquellos estudios previos más relevantes.

En el segundo capítulo se exponen de forma breve y concreta los objetivos que resumen el interés de este trabajo original y justifican su realización.

El tercer capítulo corresponde a la descripción del material y métodos utilizados para la realización de la tesis. En este capítulo se describe el modelo de degeneración de los fotorreceptores inducido por fototoxicidad puesto a punto para la realización de esta tesis y se explican los experimentos realizados. Hemos utilizado principalmente técnicas de trazado neuronal, inmunohistoquímica, marcadores celulares y de análisis de imagen. Además, se describe detalladamente la organización de los grupos de animales tanto experimentales como control utilizados en los diferentes experimentos.

El capítulo de resultados se divide en dos apartados relacionados con cada uno de los modelos de degeneración de la retina estudiados. El primer apartado muestra los resultados de la degeneración de la retina inducida por fototoxicidad. El segundo, los resultados de la degeneración hereditaria de la retina en ratas con la mutación P23H de la rodopsina. Ambos apartados están organizados de forma similar: en primer lugar se describe la evolución de la degeneración en la retina externa (capa de los fotorreceptores) y seguidamente se expone la afectación que tiene lugar en retina interna (capa de fibras nerviosas y población de células ganglionares de la retina) tras la degeneración de los fotorreceptores. En cada uno de estos apartados, tras la descripción analítica de los resultados, se incluyen las tablas, histogramas e imágenes que ilustran y documentan las observaciones realizadas.

El quinto capítulo corresponde a la discusión, en la que se analizan de forma crítica los resultados obtenidos. Este capítulo está dividido en tres apartados, los dos primeros referidos a los modelos experimentales descritos en los resultados y un tercer apartado en el que se realiza una comparación de los resultados obtenidos en ambos modelos degenerativos. Estos resultados son analizados valorando sus ventajas e inconvenientes, sus semejanzas y diferencias respecto a los resultados obtenidos en estudios previos de degeneraciones de los fotorreceptores, para finalmente esbozar algunas de las posibles implicaciones que podrían tener los resultados en el diseño de futuras estrategias de neuroprotección.

En el sexto capítulo se enumeran las principales conclusiones del trabajo y los hallazgos originales más relevantes.

En la séptima y última parte, bibliografía, se incluyen las referencias de los trabajos científicos consultados para esta tesis.

Por último hemos incluido como anexos (I, y II) las dos publicaciones principales que recogen una gran parte de los trabajos experimentales presentados en esta tesis doctoral.

HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

El desarrollo de este trabajo nos ha permitido documentar una serie de hallazgos originales referentes a la evolución de la degeneración retiniana secundaria a la muerte de fotorreceptores debida a dos etiologías distintas: fototoxicidad y defecto genético.

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS:

1. Hemos desarrollado un modelo de degeneración de los fotorreceptores inducida por fototoxicidad en la rata albina.
2. Documentamos que la fotoexposición de ratas albinas causa una rotura de la barrera hemato-retiniana en un “área arciforme” situada en la retina superior, similar a la anteriormente descrita en ratas pigmentadas.
3. Documentamos que la muerte de fotorreceptores tras la fototoxicidad en la rata albina ocurre, al menos en parte, por la vía de la apoptosis.
4. Éste es el primer estudio que cuantifica y estudia topográficamente la muerte de las células ganglionares de la retina, a largo plazo, tras la degeneración de los fotorreceptores inducida por fototoxicidad.
5. Éste constituye el primer estudio que cuantifica y estudia topográficamente las células ganglionares de la retina en la rata P23H, documentando que esta estirpe tiene una población media de células ganglionares de la retina inferior a la de sus ratas homólogas Sprague-Dawley, ya antes de que la degeneración de los fotorreceptores sea completa, al mes de vida.
6. Este estudio documenta por primera vez que en la rata P23H se produce una compresión de los axones de las células ganglionares por los vasos retinianos.
7. Este estudio cuantifica, por primera vez, la muerte de las células ganglionares de la retina como consecuencia de la lesión axonal en la rata P23H.
8. Documentamos que la evolución de la degeneración retiniana en las ratas transgénicas P23H es muy similar a la anteriormente descrita en las ratas distróficas Royal College of Surgeons.
9. Mediante la utilización de un trazador neuronal, el Fluorogold, y de un anticuerpo que reconoce un factor de transcripción específico de las células ganglionares de la retina, el Brn3a, documentamos por primera vez, que la disminución de células ganglionares de la retina tras la pérdida de los fotorreceptores, ya sea inducida por fototoxicidad o por una

degeneración hereditaria de los mismos, se debe a muerte de estas células y no a un déficit en el transporte axonal retrógrado.

10. La utilización de un anticuerpo que reconoce la subunidad pesada altamente fosforilada de los neurofilamentos (pNFH) nos ha permitido documentar en este estudio la afectación que sufren los axones de las CGR tras la pérdida de fotorreceptores. Además, se ha documentado que la etiología de la degeneración influye en la región en que tiene lugar el inicio de esta afectación axonal, que comienza en la misma región donde se inicia la degeneración de los fotorreceptores, la retina dorsal en la degeneración inducida por fototoxicidad y la retina ventral en la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.
11. Documentamos que la población de células ganglionares de la retina en las ratas Sprague-Dawley no disminuye con la edad, al menos en los primeros 20 meses de vida.
12. Éste es el primer estudio que documenta que la localización inicial de la desorganización retiniana que tiene lugar tras la pérdida de fotorreceptores depende de la etiología de la degeneración.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia los trabajos de investigación en los que he participado se han divulgado en las siguientes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos. Aquellas señaladas con asteriscos reflejan los trabajos en los que he participado como autor principal y han constituido la base experimental de esta Tesis Doctoral.

CAPÍTULOS DE LIBRO

Avilés-Trigueros M., Galindo-Romero, C, **García-Ayuso, D.**, Salinas-Navarro, M., Sellés-Navarro, I., Jiménez-López, M, Nadal-Nicolás, F.M., Nieto-López L., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez MP., Vidal-Sanz, M. 2010. Spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult rat retina. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 129-132.

****García-Ayuso D.**, Agudo M., Salinas-Navarro M., Cuenca N., Pinilla I., Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez M.P. 2010. Retinal ganglion cell death after photoreceptor loss: Comparison between hereditary and light-induced retinal degeneration. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 137-140.

ARTÍCULOS

****García-Ayuso D.**, Salinas-Navarro M., Agudo M., Cuenca N., Pinilla I., Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez MP. **Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina.** Exp. Eye Res. 2010, 91: 800-810.

****García-Ayuso D.**, Salinas-Navarro M., Agudo M., Alarcón-Martínez L., Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez M.P. **Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration.** Mol. Vis. 2011. En prensa.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

M.Vidal-Sanz, M.Salinas-Navarro, M.Avilés-Trigueros, M.Jiménez-López, F.J. Valiente-Soriano, **D.García-Ayuso**, I.Cánovas, T.Holmes, R.D. Lund, M.P. Villegas-Pérez. **2007.** Spatial distribution and quantitative analysis of retinal ganglion cells in adult albino rodents. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48 E-Abstract 134.**

L. Alarcón-Martínez, P. De la Villa, M. Salinas-Navarro, **D. García-Ayuso**, I. Cánovas, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **2007.** Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Functional effects in the albino mice retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48 E-Abstract 4353.**

- C. Sánchez-Ramos, **D. García Ayuso**, M.S. Casas-Builla, A.A. Fernández-Balbuena, A. Langa-Moraga, J.J. Navarro-Valls, M.P. Villegas-Pérez. **2007**. Neuroprotective effects of different absorption filters: exploring macular degeneration in pigmented rats. **ARVO SERC: New frontiers in retinal diseases: Linking genetics to molecular pathways and therapeutic strategies Abstract 45**.
- D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, L. Coll-Alcaraz, I. Cánovas-Martínez, J.M. Bernal-Garro, M. Vidal-Sanz, R.D. Lund, M.P. Villegas-Pérez. **2008**. Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49 E-Abstract 4395**.
- D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, I. Cánovas-Martínez, M. Agudo-Barriuso, R.D. Lund, M. Vidal-Sanz, M.P. Villegas-Pérez. **2009**. Long-Term Effects Of Light Exposure On The Albino Rat Retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50 E-Abstract 3612**.
- D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, M. Vidal-Sanz, M.P. Villegas-Pérez. **2010**. Alteraciones en la capa de fibras nerviosas como evento patológico secundario a la degeneración de los fotorreceptores retinianos inducida por fototoxicidad. **21 CONGRESO INTERNACIONAL DE OPTOMETRÍA, CONTACTOLOGÍA Y ÓPTICA OFTÁLMICA. Madrid. España**.
- L. Alarcón Martínez, L. Montalbán Soler, **D. García Ayuso**, M. Avilés Trigueros, M. Vidal Sanz, M.P. Villegas Pérez. **2010**. Alteraciones funcionales en retina externa e interna en un modelo de degeneración macular asociada a la edad. **21 CONGRESO INTERNACIONAL DE OPTOMETRÍA, CONTACTOLOGÍA Y ÓPTICA OFTÁLMICA. Madrid. España**.
- A. Ortín-Martínez, M. Jiménez-López, F. Nadal-Nicolás, M. Salinas-Navarro, F. Valiente-Soriano, **D. García-Ayuso**, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **2010**. Parallel Distribution of retinal ganglion cells and L Cones in Albino and Pigmented Adult Rats. **Thirteenth Annual Vision Research Conference. Ft Lauderdale. Florida**.
- D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, M. Agudo, N. Cuenca, I. Pinilla, A. Ortín-Martínez, M. Vidal-Sanz, M.P. Villegas-Pérez. **2010**. P23H Rhodopsin Mutation Results In Delayed Retinal Ganglion Cell Death. **Thirteenth Annual Vision Research Conference. Ft Lauderdale. Florida**.
- M. Avilés-Trigueros, C. Galindo-Romero, **D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, I. Sellés-Navarro, M. Jiménez-López, M. Nadal-Nicolás, L. Nieto-López, M. Agudo-Barriuso, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **2010**. Response of adult rat retina intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to different lesions. **Thirteenth Annual Vision Research Conference. Ft Lauderdale. Florida**.
- D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, M. Agudo, L. Nieto-López, N. Cuenca, I. Pinilla, M. Vidal-Sanz, M.P. Villegas-Pérez. **2010**. Retinal Ganglion Cell axonal constriction and death in the P23H-1 rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51 E-Abstract 3664**.
- D. García-Ayuso**, M. Agudo, M. Salinas-Navarro, N. Cuenca, I. Pinilla, M.P. Villegas-Pérez. **2010**. Retinal Ganglion Cell Fate After Photoreceptor Loss: Comparison Between Hereditary And Light-Induced Retinal Degeneration. **SOCIEDAD DE INVESTIGACIÓN DE RETINA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (SIRCOVA). Ophthalmic Res. 44: 64**.
- M. Avilés-Trigueros, C. Galindo-Romero, **D. García-Ayuso**, M. Salinas-Navarro, I. Sellés-Navarro, M. Vidal-Sanz. **2010**. Response of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to different lesions in the adult rat retina. **SOCIEDAD DE INVESTIGACIÓN DE RETINA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (SIRCOVA). Ophthalmic Res. 44: 61-62**.

- M. Salinas-Navarro, F.M. Nadal-Nicolás, L. López-Nieto, M. Jiménez-López, A. Ortín-Martínez, **D. García-Ayuso**, C. Galindo-Romero, M. Agudo-Barriuso, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **2011**. Shortly After Ocular Hypertension There Is Loss Of Retinal Ganglion Cells, But Not Of Other Cells Of The Ganglion Cell Layer Of The Retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.52 E-Abstract 2459**.
- A. Ortín-Martínez, **D. García-Ayuso**, F.J. Valiente-Soriano, M. Jiménez-López, M.P. Villegas-Pérez, M. Agudo-Barriuso, P. Coffey, A.A. Vugler, M. Vidal-Sanz, M. Semo. **2011**. Population Of Melanopsin-expressing Retinal Ganglion Cells In Aging Wildtype And Rodless/coneless Mice: A Detailed Quantitative And Topographical Analysis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.52 E-Abstract 3466**.
- D. Garcia-Ayuso**, A. Ortín-Martínez, M. Agudo-Barriuso, M. Jiménez-López, J.M. Bernal-Garro, L. Nieto-López, N. Cuenca, I. Pinilla, M. Vidal-Sanz, M.P. Villegas-Pérez. **2011**. Cone Degeneration In A Model Of Hereditary Rod Degeneration: The P23H Rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.52 E-Abstract 4338**.
- F.J. Valiente-Soriano, **D. García-Ayuso**, A. Ortín-Martínez, M. Semo, M. Jiménez-López, C. Gias, M.P. Villegas-Pérez, P. Coffey, M. Vidal-Sanz, A.A. Vugler. **2011**. Patterns Of Light-mediated C-fos Activity In The Medial Visual Cortex Of Mice Lacking Both Rods And Cones. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.52 E-Abstract 3464**.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ANATOMÍA DEL OJO DE LA RATA ADULTA.

1.1.1. ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR.

En la rata, como en el resto de mamíferos, el ojo contiene la retina, que es la estructura que recibe el estímulo luminoso, lo transforma en un impulso eléctrico y lo envía hasta los centros superiores del cerebro, donde se procesa la información.

La morfología del globo ocular de la rata adulta es similar a la del resto de los mamíferos. Es un órgano casi esférico y su pared externa está formada por tres capas: la túnica más externa que se compone de esclera y córnea, la capa intermedia o úvea y la capa más interna o retina (Figura 1.1). La túnica externa está formada en el polo anterior por la córnea, que es transparente y en este animal destaca por su gran tamaño; en el resto del ojo esta formada por la esclera, que es opaca y que está recubierta en su parte anterior por la conjuntiva. La capa intermedia o úvea está formada en la parte posterior del globo ocular por la coroides, mientras en el polo anterior está formada por el cuerpo ciliar y el iris. La retina constituye la capa más interna del globo ocular y está en contacto con la coroides por su parte externa y con el vítreo por la interna.

En la rata, el iris es muy fino y cubre prácticamente toda la cara anterior del cristalino y la pupila es pequeña, aunque el diámetro pupilar es variable según la intensidad de la luz, ya que la rata posee reflejo fotomotor directo y consensual. El cristalino de la rata es casi esférico y tiene un gran tamaño, por lo que ocupa gran parte del segmento anterior del globo ocular. El resto del contenido ocular está ocupado por el humor vítreo. Las ratas que hemos utilizado como animales de experimentación para este estudio, las Sprague-Dawley (SD) y las P23H, son ratas albinas, por lo que no tienen pigmento en el epitelio pigmentario del iris y de la retina, lo que permite observar los vasos del iris, y los vasos de la coroides a través de la retina.

La arteria oftálmica provee la irrigación a todas las estructuras oculares de la rata. Esta arteria acompaña al nervio óptico dentro de su vaina, situándose en la zona infero-nasal de éste a su entrada al globo ocular (Janes y Bound, 1955). La arteria oftálmica se divide para dar la arteria central de la retina, dos arterias ciliares posteriores cortas y cuatro ciliares posteriores largas.

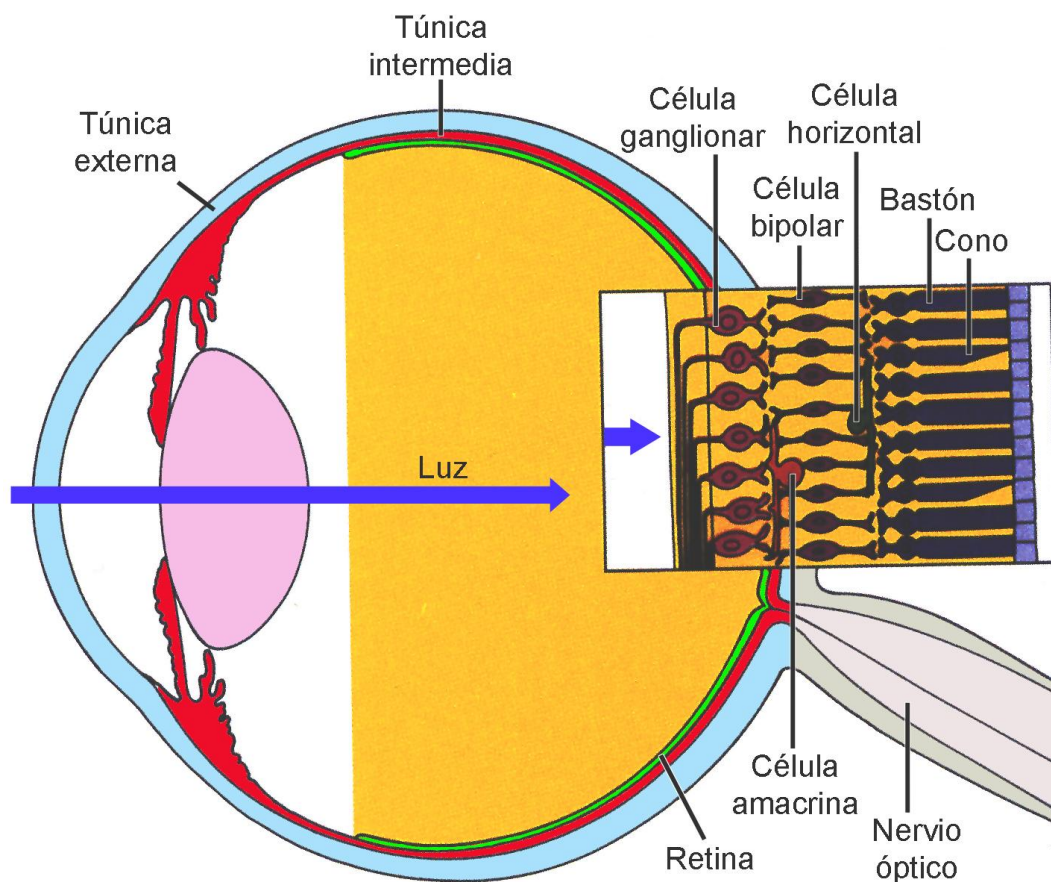


Figura 1.1. Globo ocular.

Esquema del globo ocular en el que están representadas las capas que lo componen: túnica externa, intermedia y retina. Modificada de Hubel (2000).

La vascularización de la retina depende de la arteria central de la retina. Ésta se dirige a la retina pasando entre las fibras del nervio óptico y emergiendo a nivel de la papila óptica. A este nivel, la arteria central se divide normalmente en 6 ramas terminales, aunque a veces pueden ser 5 ó 7, y estas ramas se extienden radialmente hacia el ecuador. Las venas de la retina siguen un camino radial similar al de las arterias (Janes y Bounds, 1955; Morrison JC y cols., 1999; Sugiyama y cols., 1999). El número de venas es similar al de arterias y suelen alternarse arterias y venas. A pesar de que tanto las venas como las arterias tienen un recorrido radial se distinguen morfológicamente ya que las arterias son más estrechas y tienen un color rojo más vivo que las venas.

1.1.2. LA RETINA DE LA RATA ADULTA.

La retina de la rata, como en el resto de los mamíferos, es la capa sensible del ojo y es una prolongación del sistema nervioso central dentro del globo ocular. Dado que la retina se encuentra dentro del globo ocular es fácilmente accesible, por lo que se utiliza a menudo para realizar estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso central (Dowling, 1987). La retina es, quizás, la porción más accesible y manipulable del sistema nervioso central, lo que la convierte en un excelente tejido para la investigación.

La retina de los vertebrados y su organización ha sido objeto de estudio para muchos investigadores a lo largo de los últimos 100 años. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones anatómicas de la retina todavía continúan siendo vigentes (Figura 1.2).

La retina está formada por diversos tipos de neuronas (fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células interplexiformes, células amacrinas y células ganglionares) y células no neuronales o gliales (células de Müller, astrocitos y células de microglía), organizadas en capas y especializadas para la recepción y el proceso del estímulo visual. La percepción visual comienza cuando se activan los elementos fotosensibles de la retina (fotorreceptores). La luz tiene que pasar a través de todas las capas de la retina antes de estimular a los fotorreceptores (Figura 1.1), éstos captan la energía luminosa y la transforman en energía eléctrica mediante cambios en su potencial de membrana. Después transmiten esta información nerviosa mediante contactos sinápticos a través de las otras neuronas intermediarias (bipolares, horizontales y amacrinas) hasta las células ganglionares de la retina (CGR), cuyas prolongaciones constituyen el nervio óptico (Hubel, 2000). Las CGRs, por tanto, transmiten la información luminosa recogida en la retina hasta los núcleos retino-recipientes del cerebro.

En la rata, los principales territorios de proyecciones de las CGR en el cerebro son el colículo superior y el núcleo geniculado dorso-lateral (Linden y Perry, 1983; Martín, 1986; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2010). Los colículos superiores son dos protuberancias situadas en la parte dorsal del mesencéfalo rostrales al colículo inferior. Están compuestos por varias capas o láminas. Las tres primeras capas, llamadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar los estímulos visuales (revisado por Sefton y Dreher, 1985), mientras que las cuatro restantes procesan la información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984). Las capas visuales de los colículos superiores reciben aferencias básicamente de la retina contralateral (en la rata más del 95% de los axones de las CGR se decusan a nivel del quiasma óptico, a diferencia de lo que ocurre en el ser humano, en el que sólo decusan un 53%).

1.1.2.1. Estructura de la retina.

La retina adulta está constituida por 6 tipos neuronales y otras células no neuronales que se ordenan en capas formando una estructura laminar altamente organizada (Figura 1.2). La retina de la rata, como la de otros vertebrados (Ramón y Cajal, 1892; Gallego, 1971), está constituida por 10 capas que, desde su parte más interna, es decir, aquella que está en contacto con el vítreo, hasta la más externa, que está en contacto con la coroides, son las siguientes:

1. Membrana limitante interna (MLI): Es la capa que contacta con el vítreo y está formada por los procesos internos de las células de Müller.
2. Capa de fibras nerviosas (CFN): Está formada principalmente por los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) en su trayecto hacia la papila óptica.
3. Capa de células ganglionares (CCG): Está constituida por las CGR y las células amacrinas desplazadas en esta capa.
4. Capa plexiforme interna (CPI): Está formada por los procesos de las células ganglionares y las amacrinas y por los axones de las células bipolares.
5. Capa nuclear interna (CNI): Está formada por los núcleos de células amacrinas, bipolares, interplexiformes, de Müller y de las células horizontales.
6. Capa plexiforme externa (CPE): Está formada por los terminales axonales (pedículos y esférulas) de los fotorreceptores y los procesos de las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
7. Capa nuclear externa (CNE): Está formada por los núcleos de los fotorreceptores.
8. Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (CSEFR): Está formada por el segmento externo de estas neuronas.
9. Membrana limitante externa (MLE): Formada por un entramado de uniones del tipo zónula adherens entre la región más externa de las células de Müller y entre éstas y los fotorreceptores.
10. Epitelio pigmentario de la retina (EPR): Está formada por una monocapa de células epiteliales que limita externamente con la coroides. El EPR tapiza toda la retina, actúa como regenerador de los pigmentos visuales y como depósito de melanina, y tiene importantes funciones como la fagocitosis del segmento externo de los fotorreceptores. En las ratas albinas este epitelio no contiene gránulos de melanina y,

por lo tanto, como todas las capas de la retina (excepto los vasos sanguíneos) es transparente y permite ver la vascularización coroidea.

De las células no neuronales que existen en la retina, debemos mencionar por su importancia tres tipos celulares: las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía. Las células de Müller tienen un gran tamaño y se extienden a lo ancho de toda la retina de manera radial, aportando sustento y soporte mecánico a las neuronas de la retina. Los astrocitos se sitúan en la capa de las fibras nerviosas, rodeando a éstas y a los vasos sanguíneos (Ramírez y cols., 1996; Triviño y cols., 1996). Las células de microglía tienen pequeño tamaño y morfología variable y su función es fundamentalmente fagocítica (Sobrado y cols., 2007).

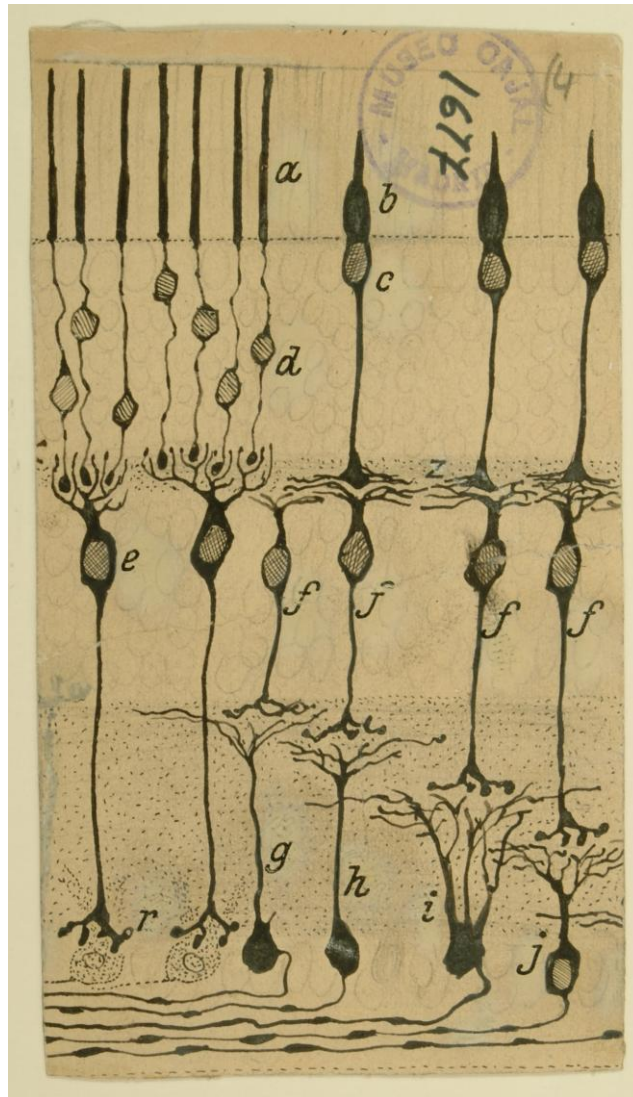


Fig. 1.2. Dibujo de las neuronas retinianas realizado por Santiago Ramón y Cajal.

Podemos observar los segmentos externos (a, b) y los núcleos (c, d) de los fotorreceptores, las células bipolares (e, f) y las células ganglionares de la retina (g, h, i, j).

1.1.2.2. Fotorreceptores.

El proceso de recepción de la señal luminosa, su conversión en señal eléctrica y su transmisión al cerebro es llevado a cabo por los fotorreceptores. Existen en la retina de los mamíferos 2 tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones, que se distinguen entre sí por su forma, el tipo de fotorreceptor que contienen, su distribución en la retina y el patrón de sus conexiones sinápticas.

Los conos y los bastones están especializados para diferentes aspectos de la visión. Los bastones tienen una resolución espacial y temporal baja pero son extremadamente sensibles a la luz y por ello intervienen en la visión nocturna (escotópica). Los conos presentan una resolución espacial y temporal alta e intervienen en la visión diurna (fotópica) y cromática (Dowling, 1987). Los circuitos que unen a los conos y los bastones con las CGR también contribuyen al proceso del estímulo eléctrico en la retina. Una de las principales diferencias entre ambos circuitos es su grado de convergencia. Cada célula bipolar de bastón contacta con varios bastones y diferentes células bipolares de bastón contactan con varias células amacrinas. En contraste, el circuito de los conos es mucho menos convergente, sobre todo en la mácula. Este tipo de relación menos convergente es la necesaria para que la agudeza visual sea máxima en la mácula. Sin embargo, el hecho de que el circuito de los bastones sea más convergente lo convierte en un mejor detector de luz, ya que la unión de pequeñas señales provenientes de diferentes bastones genera una respuesta mayor en la célula bipolar. Además, existen diferencias en los mecanismos de transducción utilizados por los conos y los bastones, lo que hace que respondan de diferente forma a una intensidad determinada de luz; así, un bastón responde de forma clara al estímulo provocado por un único fotón, mientras que para provocar una respuesta similar en un cono necesitaríamos más de 100 fotones (Mustafi y cols., 2009). Otro aspecto a tener en cuenta es que la convergencia reduce la resolución espacial en el sistema de los bastones.

La morfología de los fotorreceptores es alargada y su estructura está polarizada para poder realizar sus dos funciones principales: por un extremo (el externo) reciben y procesan la energía luminosa y por el otro (el interno) la transmiten. La estructura general de los fotorreceptores es constante en la mayoría de los vertebrados (Figura 1.3), aunque existen diferencias morfológicas y funcionales entre las distintas especies. Podríamos describir como fotorreceptor tipo aquel que incluye, desde las capas más externas a las más internas de la retina: i) segmento externo; ii) pedúnculo de conexión; iii) segmento interno; iv) soma; v) axón o fibra interna; vi) terminal sináptico.

En las retinas de los mamíferos los conos son los responsables de la visión diurna y de la discriminación de los colores. En la retina humana existen tres tipos diferentes de conos: i) conos S (del inglés short wavelength); ii) conos M (del inglés medium wavelength); iii) conos L (del inglés long wavelength), y éstos son sensibles a tres regiones distintas del espectro luminoso. Sus máximos de absorción se encuentran a 420 (azul; S), 531 (verde; M) y 588 nm (rojo; L). En algunos mamíferos no primates, como la rata, la discriminación del color es llevada a cabo solamente por dos tipos de conos llamados S y M/L. Al igual que en la retina humana, estos conos se distinguen principalmente por la porción del espectro a que son más sensibles: i) las longitudes de onda cortas estimulan a los conos S ii) las longitudes de onda media y larga estimulan a los conos M/L. Esta sensibilidad espectral se debe a la opsina, proteína que forma el pigmento visual. Cada tipo de cono contiene una opsina específica y por ello un espectro de absorción. En los bastones, el pigmento visual se denomina rodopsina (opsina de los bastones).

En 1992 Ágoston Szél y Pál Röhlich demostraron la presencia de dos tipos de conos en la retina de la rata adulta utilizando anticuerpos contra pigmentos visuales por primera vez (Szel y Rohlich, 1992). Tres años antes habían inmutectado los conos en la retina de conejo, identificando también los bastones (Szel y cols., 1988).

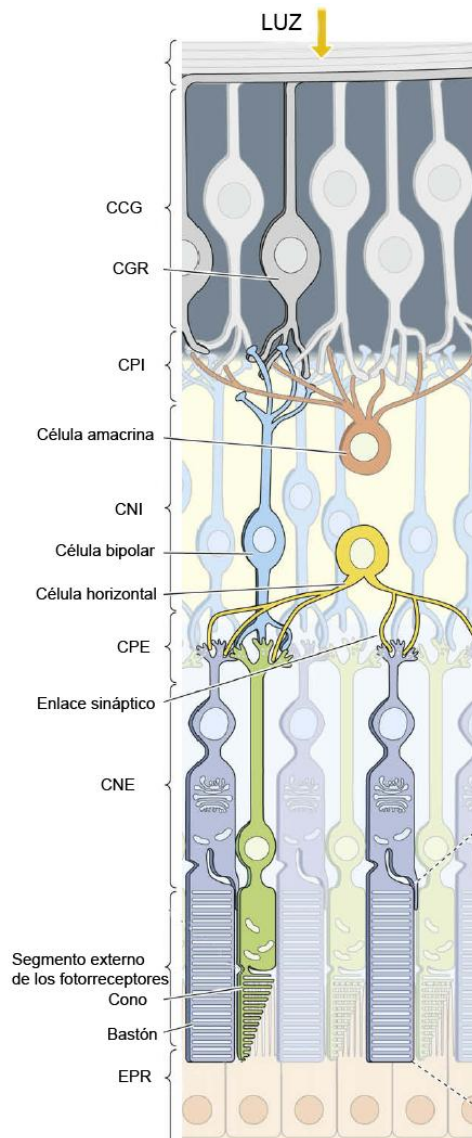


Fig 1.3. Estructura de los fotorreceptores y sus conexiones sinápticas. Modificada de Mustafi y colaboradores (2009).

Según estudios recientes de nuestro laboratorio, en las ratas Sprague-Dawley, utilizadas en este estudio, el número medio de conos S por retina es de 41.028 ± 5.074 y el de conos L/M de 231.736 ± 14.517 . La distribución de ambos tipos de conos parece ser complementaria y existe una mayor densidad de conos M/L en la retina superotemporal (Figura 1.4), mostrando una distribución

paralela a la estría de mayor densidad de CGR descrita previamente por nuestro grupo (Ver apartado siguiente para revisión; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Ortín-Martínez y cols., 2010). Este hecho es importante ya que, aunque la retina de la rata como la de la mayoría de los mamíferos no primates carece de mácula, refuerza la teoría propuesta anteriormente de que esta área de la retina se corresponde con la estría visual de la rata adulta (ver apartado siguiente), ya que en esta área se encuentra la máxima densidad de conos L/M y CGR y una alta densidad de amacrinas y bipolares, y la menor densidad de conos S por lo que sería equivalente a la mácula humana (Marco-Gomariz y cols., 2006a, b; Villegas-Pérez y cols., 2006, Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Ortín-Martínez y cols., 2010).

En enfermedades como la retinosis pigmentaria (RP) y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) se produce una pérdida de visión por degeneración de los fotorreceptores, principalmente por la pérdida de los conos, que ocurre secundariamente a la pérdida de bastones (Shelley y cols., 2009).

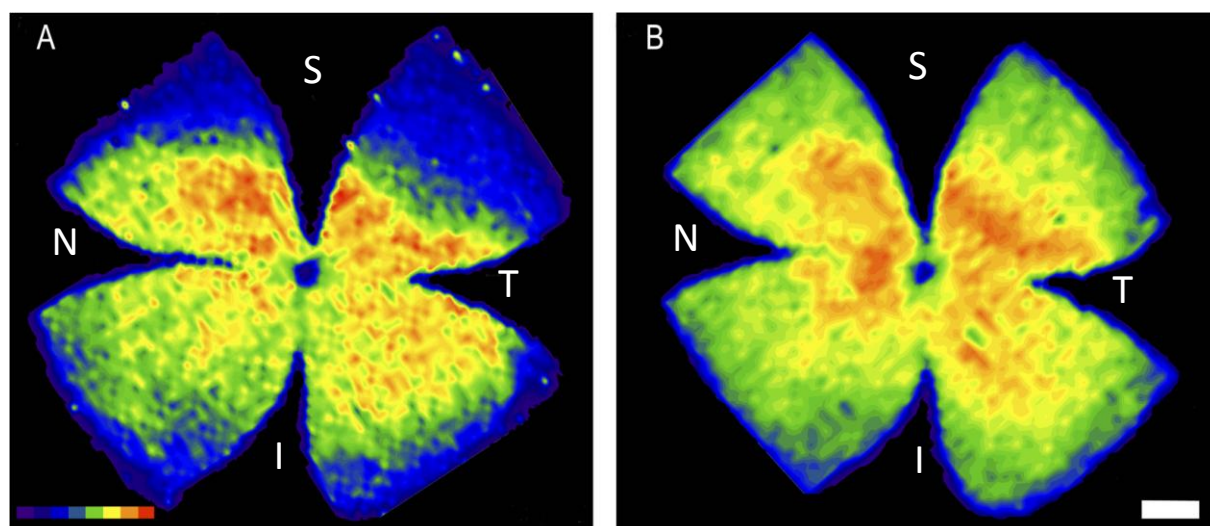


Fig. 1.4. Distribución paralela de las células ganglionares de la retina y los conos L/M en la retina de la rata.

Mapas de isodensidad de la misma retina de una rata Sprague-Dawley que muestran las densidades de las células ganglionares de la retina (A) y de los conos L/M (B). Puede observarse una distribución paralela de los conos L/M y de las células ganglionares de la retina. Modificado de Ortín-Martínez y cols., (2010). S: superior, N: nasal, T: temporal, I: inferior.

1.1.2.3. Células ganglionares de la retina.

En la capa de CGR de la rata adulta hay principalmente dos tipos de células, las CGR y las células amacrinas desplazadas. Estas últimas que constituyen aproximadamente el 50% de las neuronas presentes en esta capa (Perry, 1981). Las CGR representan menos del 1% de la población total de células de la retina y sus axones forman el nervio óptico (NO). La población de CGR de la rata no se distribuye por la retina homogéneamente, ya que se ha descrito una región de máxima densidad de estas neuronas en la retina superotemporal (Figura 1.5; Dreher y cols., 1985; Perry, 1981; Reese y Cowey 1986; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Ortín-Martínez y cols., 2010).

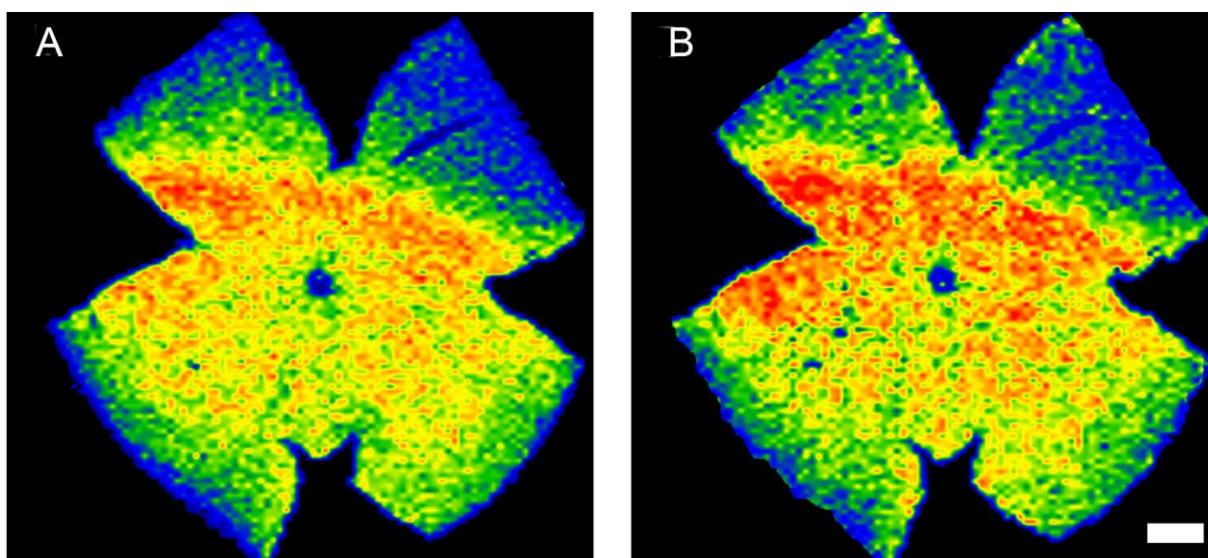


Fig.1.5. Distribución de células ganglionares de la retina en la retina de la rata adulta.

Mapas de isodensidad de las células ganglionares de la retina, marcadas con fluorogold (A) o con Brn3a (B) en la misma retina izquierda de una rata adulta. Se observa un área de mayor densidad de éstas células en la región superotemporal.

Como hemos mencionado antes, la mayoría de las CGR de la retina de la rata proyectan sus axones al colículo superior (Lund, 1965; Perry, 1981; Salinas-Navarro y cols., 2009a), por lo que el uso de marcadores neuronales retrógrados aplicados en esta estructura del cerebro permiten identificar y diferenciar las CGR de otras células situadas en la CCG: las células amacrinas desplazadas (Villegas-Pérez y cols., 1988). Estudios realizados en nuestro laboratorio han estimado el número total de CGR de la rata mediante la aplicación del trazador neuronal fluorogold (FG) en ambos colículos superiores de ratas albinas y pigmentadas. En las ratas SD, las utilizadas en este estudio, el número medio (\pm DEM) de CGR es de 81.486 ± 4.340 . Además, mediante la aplicación de

FG en el nervio óptico se demostró que la aplicación de este trazador en ambos colículos superiores resulta en el marcaje de aproximadamente el 98,4% de la población de CGR en estos animales (Salinas-Navarro y cols, 2009a). El análisis de la distribución de estas células marcadas con FG reveló un área de mayor densidad de CGR en la región superotemporal de la retina, aproximadamente a 1 mm del nervio óptico (Fig. 1.5; Salinas-Navarro y cols., 2009a).

Un método alternativo para identificar las CGR es la inmunodetección de proteínas expresadas específicamente por estas células (Drager y Olsen, 1981). La familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU (Pit-Oct-Unc) al que pertenecen el Brn3a, Brn3b y el Brn3c, se localizan exclusivamente en el núcleo de las CGR participando en la regulación genética (Eng y cols., 2004). Se ha demostrado que los factores de transcripción de la familia Brn3 pueden ser utilizados como marcadores de las CGR. Dentro de estos, se ha visto que el Brn3a se expresa específicamente en las CGR y se ha demostrado que puede ser utilizado en retinas control, después de lesión y para evaluar terapias neuroprotectoras como un marcador fidedigno y eficiente para identificar y cuantificar las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009; García-Ayuso y cols., 2010; Sanchez-Migallón y cols., 2011). Estudios realizados en nuestro laboratorio han estimado que el número medio (\pm DEM) de CGR de la retina de rata inmunodetectadas utilizando anticuerpos contra el factor de transcripción Brn3a es de 83.449 ± 4.541 , siendo este valor similar al anteriormente descrito utilizando el trazador neuronal FG (Nadal-Nicolás y cols., 2009).

La vía visual es un modelo experimental idóneo para el estudio de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, ya que se puede provocar la muerte neuronal selectiva de las CGR por medio de la sección del nervio óptico (Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Kielczewski y cols., 2005), o mediante el aumento de la presión intraocular (Sellés-Navarro y cols., 1996; Grozdanic y cols., 2003; Alarcón-Martínez y cols., 2007; Salinas-Navarro y cols., 2010) o la afectación de retina interna tras la degeneración de los fotorreceptores retinianos, ya sea inducida (Noell y cols., 1966; 1980; Marco-Gomariz y cols., 2006a, b; García-Ayuso y cols., 2009, 2011; Organisciak y Vaughan., 2010) o hereditaria (Villegas-Pérez y cols., 1998; Jones y cols., 2003; Peng y cols., 2003; Cuenca y cols., 2004; García-Ayuso y cols., 2010).

1.2 MODELOS DE DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES DE LA RETINA.

Las degeneraciones hereditarias de los fotorreceptores son un grupo de enfermedades genéticas (o distrofias retinianas) de las que existen muchas variedades geno- y fenotípicas. Sin embargo, estas enfermedades tienen una característica común: todas están producidas por mutaciones u otros defectos genéticos que suelen afectar a genes que codifican proteínas implicadas en la fototransducción o en el ciclo de los pigmentos visuales, aunque algunos de estos genes todavía no han sido identificados (Swaroop y cols., 2007; Fritsche y cols., 2008).

La retinosis pigmentaria (RP) es una enfermedad específica de los fotorreceptores que está causada por diferentes mutaciones de las proteínas de los bastones, incluida la rodopsina (Vaughan y cols., 2009). Esto provoca una muerte progresiva de los fotorreceptores, primero los bastones (produciendo ceguera nocturna y pérdida de visión periférica) y posteriormente los conos (pérdida de visión central y disminución de la agudeza visual).

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una degeneración de la zona más central de la retina humana (la región llamada mácula) que ocurre en personas de edad avanzada. Esta enfermedad se caracteriza inicialmente por la degeneración de los fotorreceptores de la retina, aunque posteriormente se pueden producir otros eventos patológicos, como una neovascularización subretiniana, que tiene consecuencias devastadoras para la función retiniana. La DMAE es actualmente la causa más frecuente de ceguera irreversible en la población mayor de 60 años en los países desarrollados (Buch y cols., 2004; Congdon y cols., 2004; Kim y cols., 2010) y en su etiología están implicados, tanto factores genéticos (Kanda y cols., 2007; Francis y cols., 2008; Yang y cols., 2010) como ambientales (Francis y cols., 2007; Chen y cols., 2010).

Se cree que la exposición a la luz es uno de los factores etiológicos fundamentales de la DMAE (Margrain y cols., 2004; Tomany y cols., 2004) pero, además, se ha documentado que acelera la evolución de las degeneraciones hereditarias de los fotorreceptores retinianos, tanto en humanos como en animales (Organisciak y cols., 2003; Cideciyan y cols., 2005; Wright y cols., 2010).

Existen diferentes modelos animales para el estudio de estas enfermedades, podemos clasificarlos en i) modelos de degeneración retiniana inducida por fototoxicidad y ii) modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores. En los siguientes apartados realizamos una revisión breve de estos dos tipos de modelos experimentales.

1.2.1. DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.

1.2.1.1. La fototoxicidad.

Se denomina luz visible a una radiación electromagnética con una longitud de onda (λ) comprendida entre los 380 y los 750 nm que el ojo humano es capaz de percibir (Figura 1.6). La cantidad de energía (E) de una radiación electromagnética es proporcional a su frecuencia ($E=h*f$; h =constante de Planck, f =frecuencia), y ésta a su vez es inversamente proporcional a la longitud de onda ($f=c/\lambda$; c =velocidad de la luz) por lo que las radiaciones emitidas a frecuencias altas (longitudes de onda cortas) poseen mayor cantidad de energía que las emitidas a frecuencias bajas (longitudes de onda largas).

La definición de la luz, dada por la OSA (Optical Society of America) se expresa en los siguientes términos: "La luz es aquel aspecto de la energía radiante que un observador humano percibe a través de las sensaciones visuales producidas por el estímulo de la retina del ojo".

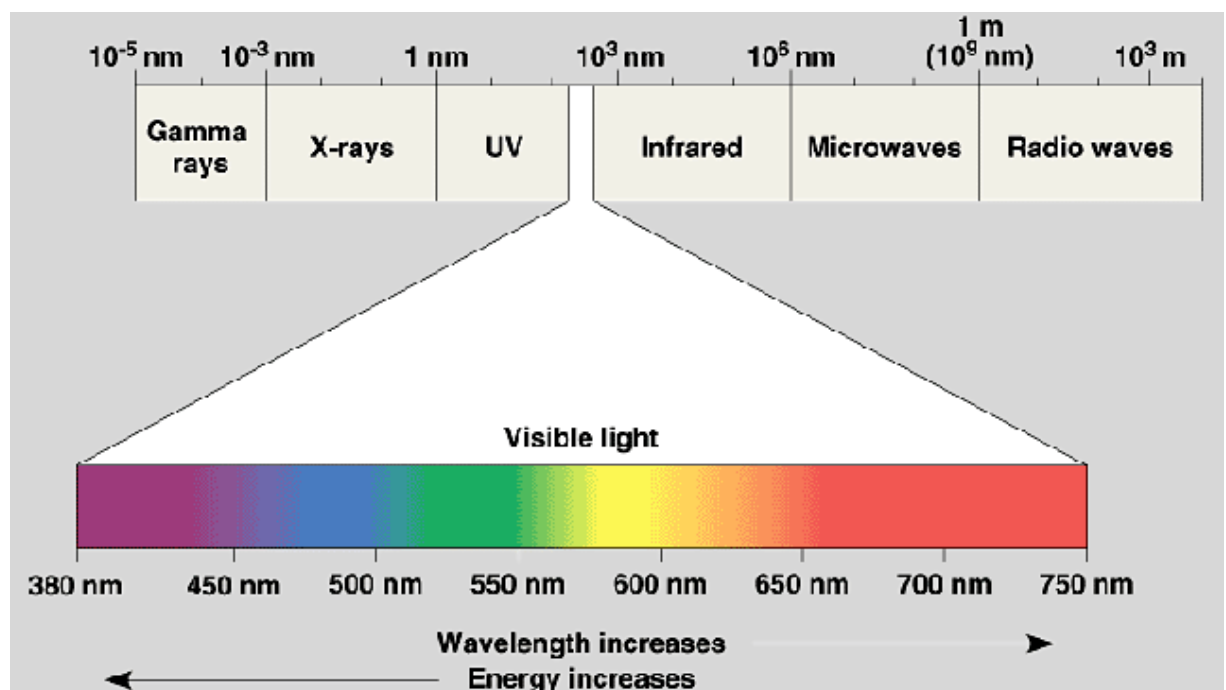


Fig. 1.6. Espectro de las radiaciones electromagnéticas.

Podemos observar de forma ampliada el espectro de luz visible (380-750 nm). Las longitudes de onda cortas (azules) son las que tienen mayor energía y son las más fototóxicas.

La luz puede tener efectos deletéreos sobre los tejidos que se conocen con el nombre de fototoxicidad. La fototoxicidad es un efecto conocido de la luz sobre los tejidos oculares y, especialmente, sobre la retina (Glickman, 2002; Remé, 2005), donde se ha descrito que causa la muerte celular por apoptosis de los fotorreceptores (Remé y cols., 1998; Wenzel y cols., 2005), y de las células del epitelio pigmentario (Hafezi y cols., 1997).

Desde que Noell describiera por primera vez la fototoxicidad en animales de laboratorio (Noell y cols., 1966), se han desarrollado distintos métodos de fotoexposición, en función de i) la calidad de la luz, ii) su intensidad y iii) la duración de la fotoexposición. La luz blanca fluorescente tiene una emisión similar al espectro visible, por lo que ha sido utilizada para imitar el efecto del exceso de exposición a la luz diurna. Los espectros de luz azul (403 ± 10 nm) y el de luz verde (550 ± 10 nm) se han utilizado para distinguir el efecto que tienen las emisiones de luz de mayor y menor energía. La duración de la fotoexposición varía en función de la fuente de luz utilizada. Por lo general la fotoexposición en los experimentos que usan luz azul (de mayor energía) tiene una menor duración, generalmente de unos minutos; en los experimentos que utilizan luz verde y blanca, la duración de la fotoexposición suele variar entre unas horas e incluso semanas. Además, la intensidad de la luz utilizada va a depender de la fuente de luz, de la duración de la fotoexposición y del animal utilizado.

Se ha documentado que las ratas pigmentadas son más resistentes a la fototoxicidad que las albinas (Noell y cols., 1966; Wasowicz y cols., 2002). Algunos autores piensan que las diferencias encontradas entre ratas albinas y pigmentadas podrían deberse a la presencia de melanina ya que ésta protegería a la retina mediante la absorción de luz (Rapp y Williams, 1980; LaVail y Gorrin, 1987; Wasowicz y cols., 2002), y ésta sería la razón por la que los animales albinos son más sensibles a la luz que los pigmentados. No obstante, existe cierta controversia entre los diversos autores en cuanto al efecto protector de la melanina, ya que se ha visto que, en función de la longitud de onda (energía) de la luz que absorbe, puede tener un papel protector o citotóxico para la retina (Putting y cols., 1994).

Una de las diferencias descritas anteriormente por otros autores para la fototoxicidad en la rata es que para lograr que la exposición a la luz cause muerte de los fotorreceptores retinianos en ratas pigmentadas hay que dilatar la pupila, mientras que en albinas no es necesario (Noell y cols., 1966; Rapp y Williams, 1980; LaVail y Gorrin, 1987; Peters y cols., 2006).

Originalmente Noell propuso 3 hipótesis sobre la fototoxicidad (Noell y cols., 1966) entre las que incluyó: i) un producto tóxico que surge de la vitamina A debido a la exposición continua a luz intensa, ii) una anomalía metabólica debida a la fotoexposición, iii) reacciones de oxidación inducidas por la fototoxicidad. Aunque algunas de ellas aún continúan siendo vigentes, a día de hoy sabemos que la fototoxicidad es un proceso multifactorial que implica factores genéticos y ambientales (Wenzel y cols., 2005).

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de degeneración de los fotorreceptores retinianos por fototoxicidad en ratas adultas pigmentadas, en el que se ha documentado que, a largo plazo, también ocurre una degeneración de las CGR (ver apartado 1.2.3.; Marco-Gomariz y cols., 2006a).

1.2.2 DEGENERACIÓN HEREDITARIA DE LOS FOTORRECEPTORES.

1.2.2.1. Modelos de degeneración hereditaria.

Muchas de las mutaciones genéticas que afectan a la visión afectan a los fotorreceptores y las células del EPR. Estas mutaciones afectan a una gran variedad de genes y la degeneración será distinta si el gen causante se expresa en conos, bastones o células del EPR. La retinosis pigmentaria está causada por mutaciones que suelen afectar a las proteínas de los bastones (ej. Rodopsina) y, por ello, causa en un primer momento la muerte de los bastones. La Amaurosis Congénita de Leber se debe a la mutación de genes que hacen que los fotorreceptores de la retina se desarrollen de forma anormal, por lo que en esta enfermedad la función de los conos y los bastones está muy comprometida desde el nacimiento y en algunos casos se encuentra ausente. Los modelos animales han sido muy útiles para el estudio de los mecanismos de estas y otras enfermedades hereditarias de los fotorreceptores retinianos.

En 1924 Keeler publicó por primera vez en un animal un defecto genético que producía la degeneración de los fotorreceptores retinianos: el ratón *retinal degeneration* (rd; Keeler, 1924; Baehr y Frederick, 2009). Desde entonces, se han descrito muchos modelos animales de degeneración retiniana, bien por mutaciones o bien transgénicos o por cambios genéticos, en diferentes especies animales (ratón, rata, perro). En algunos casos, estas mismas mutaciones han sido observadas en las enfermedades humanas, por lo que podemos decir que estos modelos animales reproducen fielmente estas enfermedades (Chader, 2002). En esta tesis nos vamos a centrar en los modelos desarrollados en rata para estudiar la retinosis pigmentaria.

Los modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores existentes en rata sufren una degeneración muy similar a la observada en las enfermedades humanas. De entre todos los modelos existentes en la actualidad vamos a realizar una breve revisión de los más utilizados a día hoy, aunque haremos mayor hincapié en la rata P23H, ya que ha sido el modelo utilizado para la realización de esta tesis doctoral.

1.2.2.1.1. La rata P23H.

Las ratas P23H sufren una de las mutaciones más comunes asociadas a la retinosis pigmentaria: una sustitución de un aminoácido en el codón 23 de la molécula de rodopsina, en concreto una prolina por una histidina (Dryja y cols., 1990; Steinberg y cols., 1996), que causa una distrofia de los fotorreceptores autosómica dominante (Chrysostomou y cols., 2009a).

Este modelo mutante fue desarrollado con el objetivo de estudiar la neuroprotección y regeneración de los fotorreceptores retinianos (Lewin y cols., 1998; La Vail y cols., 2000). Las ratas P23H sufren una pérdida progresiva de los fotorreceptores, en primer lugar bastones y posteriormente los conos. Esta pérdida es más rápida en los animales homocigóticos que en los heterocigóticos. De hecho a los 270 días de vida (P270) sólo se puede encontrar algún fotorreceptor aislado en la retina de las ratas P23H homocigóticas (Cuenca y cols., 2004; García-Ayuso y cols., 2010). Esta pérdida de fotorreceptores se correlaciona con un electroretinograma (ERG) anormal a las 4 semanas de vida del animal (Machida y cols., 2000; Pinilla y cols., 2005; Chrysostomou y cols., 2009b).

Existen tres líneas distintas de ratas P23H que se diferencian entre sí por la velocidad de pérdida de los fotorreceptores (Pennesi y cols., 2008). La línea 1 (P23H-1), que ha sido la utilizada en esta tesis doctoral, es la que sufre una degeneración más severa de los fotorreceptores.

Además de la degeneración de los fotorreceptores, se han descrito otros cambios en las ratas P23H que afectan a la retina interna tales como: neovascularización del EPR (Pennesi y cols., 2008) y cambios sinápticos y morfológicos en la CPE, CNI y CPI (Jones y cols., 2003; Cuenca y cols., 2004). Cuenca y colaboradores (2004) demostraron cambios evidentes en las bifurcaciones dendríticas de las células bipolares de bastón 21 días tras el nacimiento de los animales (cuando quedan aproximadamente el 50% de los fotorreceptores en la retina); además observaron que, con el paso del tiempo, estas células mostraban atrofia de sus axones, parecían disminuir en número y no se encontraban alineadas como en los animales controles. También observaron nuevas conexiones sinápticas entre los conos y las células bipolares de cono y de bastón, posibilidad que ya había sido propuesta por otros autores en otros modelos de degeneración retiniana como la rata RCS (ver más adelante, Peng y cols., 2003). Jones y colaboradores (2003) estudiaron diferentes modelos animales de degeneración de fotorreceptores. Y documentaron que en ratas P23H, entre otras, las células de la CNI migraban a la CCG cuando la degeneración retiniana estaba bastante avanzada. Estos estudios sugieren la posibilidad de que exista una reorganización global de la retina tras la pérdida de fotorreceptores (ver más adelante).

Recientemente, se ha sugerido que las ratas P23H sufren cambios eléctricos en las CGR y posterior muerte de las mismas (Jones y cols., 2003; Kolomiets y cols., 2010), pero no se ha cuantificado la pérdida de estas neuronas. Kolomiets y colaboradores (2010) demostraron que las

CGR que quedaban en la retina se mostraban sensibles a la estimulación eléctrica, por lo que sugirieron que estas mantenían sus funciones básicas.

1.2.2.1.2. Otros modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

La rata Royal College of Surgeons (RCS) es otro modelo de degeneración hereditaria de los fotorreceptores de la retina. Esta rata sufre una mutación recesiva del gen MERTK que impide la fagocitosis del EPR (D'Cruz y cols., 2000). Estos animales fueron descritos por primera vez por Bourne y colaboradores (1938). El defecto genético en este caso afecta a las células del EPR, que no pueden realizar una fagocitosis correcta de los fotorreceptores (Bok y Hall, 1971; LaVail, 1981). Como esta fagocitosis es un proceso vital para la supervivencia de los mismos, estos animales sufren una degeneración de sus fotorreceptores (Dowling y Sidman, 1962; LaVail y Battelle, 1975) que viene acompañada de cambios en el ERG (Bush y cols., 1995), cambios vasculares (Wang y cols., 2003) y posterior muerte de las CGR por compresión axonal (Villegas-Pérez y cols., 1998).

Otro modelo de degeneración hereditaria de los fotorreceptores utilizado en la actualidad es la rata transgénica S334ter. Este animal padece una mutación en el gen de la rodopsina (Steinberg y cols., 1996). La opsina mutada contiene un codón de terminación en la posición 334 lo que resulta en la expresión de una proteína a la que le faltan los 15 últimos aminoácidos, que son los encargados de la fosforilación de la molécula (Pennesi y cols., 2008). Esto conduce a degeneración de los fotorreceptores por apoptosis dependiente de caspasa-3 (Green y cols., 2000). Existen 5 líneas de ratas S334ter con diferentes niveles de degeneración de fotorreceptores que son proporcionales al nivel de expresión de la opsina mutante (Pennesi y cols., 2008).

1.2.3. DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES.

Un hecho común a determinadas enfermedades retinianas, como la retinosis pigmentaria o la DMAE, es la muerte de fotorreceptores por apoptosis. Por ello, si entendemos el proceso de muerte de los fotorreceptores por apoptosis podríamos quizás evitar esa muerte y la consecuente pérdida de visión en estas enfermedades.

El estudio de la apoptosis de los fotorreceptores inducida por fototoxicidad puede tener algunas ventajas sobre los modelos animales modificados genéticamente. Así, la exposición a la luz desencadena la apoptosis de los fotorreceptores de forma que la mayoría de estos pasan las diferentes etapas de la vía apoptótica más o menos a la vez, lo que facilita su detección. Por el contrario en los modelos genéticos de degeneración retiniana encontraremos a los fotorreceptores en diferentes fases de la apoptosis, y el número de células afectadas a la vez es menor, lo que dificulta

su detección. Además, los modelos de degeneración inducidos por exposición a la luz nos permiten variar la severidad de la degeneración en función de la intensidad o duración de la fotoexposición (Organisciak y cols., 1999; Wenzel y cols., 2005).

El estímulo luminoso provoca el inicio de la cascada de la fototransducción por la activación de la rodopsina de los bastones y las opsinas de los conos, pero la activación de la rodopsina por luz intensa genera señales que inician cambios patológicos en los bastones y, secundariamente, en los conos. No se conoce con exactitud por qué en este modelo experimental se afectan primero los bastones (Organisciak y Vaughan, 2010). Se ha documentado también que la severidad de la fototoxicidad depende del ritmo circadiano (Organisciak y cols., 2000).

En el modelo experimental de degeneración adquirida de los fotorreceptores retinianos por fototoxicidad desarrollado recientemente en nuestro laboratorio (Marco-Gomariz y cols., 2006a), se ha observado que el área de la retina que mostraba una degeneración de los fotorreceptores más temprana y severa era un área arciforme situada en la retina superotemporal (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Otros autores habían descrito que la retina superior es más sensible a la fototoxicidad en ratas normales (Rapp y Williams, 1980; Williams y Howell, 1983; Borges y cols., 1990; Vaughan y cols., 2002) y en varios tipos de ratas transgénicas con degeneraciones hereditarias de los fotorreceptores (Vaughan y cols., 2003); sin embargo, nuestro laboratorio ha sido el primero en describir la morfología y extensión de este área. Además, hemos observado que este área está situada en una zona similar al área de mayor densidad de CGR o estría visual de la rata adulta, que ha sido descrita recientemente en algunos estudios de nuestro laboratorio y que se sitúa en la hemiretina superior a 1 mm del disco óptico (Villegas-Pérez y cols., 2006; Salinas-Navarro y cols., 2009a). Se ha postulado que el área arciforme es la que degenera más pronto porque es la que recibe más luz, ya que disminuye de tamaño cuando la córnea se tapa parcialmente con conjuntiva y cambia de lugar cuando se rota el globo ocular previamente a la exposición a la luz de los animales (Marco-Gomariz y cols., 2006b).

Esta regionalidad en la degeneración de los fotorreceptores retinianos tras la fototoxicidad se ha atribuido a que los fotorreceptores del hemisferio inferior tienen un segmento externo más pequeño y expresan menor cantidad de rodopsina que los del hemisferio superior (Battelle y LaVail, 1978; Rapp y cols., 1985; Penn y Anderson, 1987). Se ha propuesto que el hecho de que la retina periférica no se vea afectada podría deberse a una menor irradiancia en esa zona (Organisciak y Vaughan, 2010). Además, se ha sugerido que esta degeneración regional se puede deber a una mejor circulación intrarretiniana en la retina inferior y a la síntesis de un factor neuroprotector como respuesta a la luz intensa, que será mayor en la retina inferior (Li y cols., 2003; Organisciak y Vaughan, 2010).

Se ha descrito en modelos animales con degeneración hereditaria de los fotorreceptores que el aumento de la intensidad de la luz ambiental provoca una aceleración en la apoptosis de los bastones y, por tanto, en la degeneración posterior de los conos (Chrysostomou y cols., 2009a). Esto viene a confirmar que existe una dependencia de la degeneración de los bastones para que tenga

lugar la apoptosis de los conos y se han propuesto diferentes teorías sobre la dependencia de los conos y los bastones. Se ha documentado que los bastones secretan un factor de supervivencia esencial para los conos (Leveillard y cols., 2004), que la pérdida de bastones causa un daño oxidativo a los conos (Stone y cols., 1999) y que los bastones en degeneración generan una toxina que llega a los conos mediante las uniones gap e induce la degeneración de éstos (Ripps, 2002). Aunque se ha propuesto que ninguno de estos mecanismos es exclusivo y que probablemente más de uno contribuya a la vulnerabilidad de los conos durante la degeneración de los bastones (Chrysostomou y cols., 2009a).

1.2.4. DEGENERACIÓN DE LAS OTRAS CAPAS DE LA RETINA.

Hasta hace poco se había asumido que tras la pérdida de fotorreceptores (conos y bastones), la retina neural sobrevivía, por lo que se pensaba que la pérdida de la retina externa no afectaba a las capas más internas de la misma. Sin embargo, hoy sabemos que en las degeneraciones retinianas la muerte de los fotorreceptores es solamente el principio de una serie de eventos que tienen lugar por toda la retina y cuyo final es la muerte de neuronas de retina interna y una remodelación del circuito neuronal (Marc y cols., 2008).

Cuando se habla de remodelación de la retina tras la muerte de fotorreceptores, estamos hablando de una serie de cambios anatómicos en las células retinianas que ocurren como consecuencia de la pérdida de un número importante de éstos (Marc y Jones, 2003). Se ha propuesto que la remodelación retiniana tiene 3 fases distintas, tanto en modelos de degeneración hereditaria (Jones y cols., 2003; Marc y Jones, 2003) como inducida por fototoxicidad (Marc y cols., 2008); estas fases son: i) estrés del EPR y degeneración de los fotorreceptores (acortamiento del segmento externo, alteraciones sinápticas, etc); ii) muerte de fotorreceptores, actividad de la microglia, alteraciones a nivel de las células bipolares y de Müller, etc; y iii) sinaptogénesis y neuritogénesis aberrantes. Se piensa que llegado este punto la remodelación retiniana es irreversible. Se ha propuesto una serie de variaciones en estas 3 fases cuando se habla de degeneración retiniana por fototoxicidad (Marc y cols., 2008), principalmente en la fase 3, donde los eventos patológicos suelen transcurrir tan rápido como en las degeneraciones hereditarias más severas conocidas y además existe migración de distintos tipos celulares hacia la coroides, comprometiendo la vascularización de la zona (Tanito y cols., 2007). Las consecuencias son una destrucción casi total de toda la arquitectura retiniana (Marc y cols., 2008; Organisciak y Vaughan, 2010).

Jones y colaboradores (2003), propusieron 3 cambios principales en la retina interna tras la degeneración de los fotorreceptores: i) hipertrofia de las células de Müller y la aparición de fuertes uniones gliales entre la retina y el EPR generándose un sello o cicatriz glial distal entre la retina y el EPR-coroides; ii) migración neuronal hacia otras capas retinianas; iii) nuevas conexiones sinápticas en la CNI y el resto de la retina. Estos autores propusieron que esta remodelación retiniana debía ser

inherente a todas las degeneraciones retinianas, independientemente de su etiología. Además describieron que a consecuencia de la degeneración de los fotorreceptores, se producía secundariamente la muerte de una parte de la población neuronal de la retina interna y añadieron que las neuronas que sobrevivían (bipolares, amacrinas y CGR) mantenían una expresión génica normal.

Marc y colaboradores (2008) describieron la remodelación de la retina tras la degeneración de fotorreceptores por fototoxicidad en la rata albina, y propusieron que la degeneración tras fototoxicidad era más severa que la degeneración hereditaria, ya que había una afectación mayor de la retina neural (Marc y cols., 2008).

1.2.5. AFECTACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

Tanto en humanos como en animales, las degeneraciones de los fotorreceptores causan alteraciones en todas las capas de la retina (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Milam y cols., 1998; Fariss y cols., 2000; Wang y cols., 2000, 2003, 2005; Jones y cols., 2003; Aleman y cols., 2007, 2008; Walia y Fishman, 2008). Ya que muchos de los tratamientos propuestos para la retinosis pigmentaria como el trasplante de fotorreceptores, de células del EPR o el uso de prótesis visuales se sustentan en la integridad de la retina interna, es importante conocer los efectos que tienen estas degeneraciones sobre las capas más internas de la retina, y en especial sobre las CGR, ya que son las neuronas retinianas eferentes.

Estudios recientes de nuestro laboratorio han documentado por primera vez que la degeneración de los fotorreceptores retinianos conduce a la compresión de los axones de las CGR provocando la posterior muerte de estas, independientemente de que la causa de la degeneración de fotorreceptores sea inducida (Marco-Gomariz y cols., 2006a; García-Ayuso y cols., 2009, 2011) o hereditaria (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003; García-Ayuso y cols., 2010). En concreto, se describió que tras la degeneración de fotorreceptores tienen lugar migraciones de células del EPR hacia los vasos de retina externa. Posteriormente, estas células del EPR migran por toda la retina, llegando a retina interna y arrastrando los capilares internos hacia la retina más externa, y esto provoca una tracción y compresión de los haces de axones de las CGR por estos vasos de retina interna, lo que termina por desembocar en la muerte de las CGR (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a). Otros autores han propuesto que, lo mismo que la compresión de los axones de las CGR por vasos causa la muerte de éstas, la compresión axonal por vasos sanguíneos podría ser la causa de otras enfermedades del sistema nervioso central o los nervios craneales como la neuralgia del trigémino, el espasmo hemifacial o la enfermedad de Alzheimer (Bell y Zlokovic, 2009; Campos-Benitez y Kaufmann, 2008; Prasad y Galetta, 2009).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general de este trabajo de investigación es analizar y comparar la degeneración retiniana que se produce en dos modelos experimentales con diferente etiología: uno inducido por fototoxicidad y otro debido a la mutación P23H de la rodopsina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.2.1. Caracterización morfológica de la degeneración de la retina de la rata albina tras la fotoexposición.

Se analizará la evolución de la degeneración de la retina en ratas albinas adultas tras su exposición continua a luz intensa.

Los objetivos específicos de este estudio son determinar si en este tipo de degeneración retiniana:

- a) La dilatación pupilar influye en la degeneración.
- b) Se produce una ruptura de la barrera hemato-retiniana.
- c) Existe un curso temporal de degeneración de fotorreceptores y de otras células retinianas.
- d) A largo plazo se produce una afectación de las capas más internas de la retina y, en concreto, una afectación de las CGR.
- e) Ocurre una reducción del número de CGR y si esta reducción se debe a la muerte de éstas.

2.2.2. Caracterización morfológica de la degeneración de la retina de la rata albina P23H-1, con degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

Se analizará la evolución de la degeneración de la retina de la rata P23H-1.

Los objetivos específicos de este estudio son determinar si en este tipo de degeneración retiniana:

- a) Existe un curso temporal de la degeneración de los fotorreceptores retinianos.

- b) A largo plazo se produce una afectación de las capas más internas de la retina y, en concreto, una afectación de las CGR.
- c) Ocurre una reducción del número de CGR y si esta reducción se debe a la muerte de éstas.

2.2.3. Comparación de ambos modelos de degeneración.

Por último se realizará una comparación entre los dos tipos de degeneración comentados.

Los objetivos específicos de esta comparación son determinar si:

- a) El curso temporal de degeneración de los fotorreceptores (por fototoxicidad y hereditario) y de otras células y capas de la retina es similar en los dos modelos.
- b) La afectación de la retina interna y de las CGR es similar en los dos modelos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA.

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) hembra adultas albinas Sprague-Dawley (SD) y P23H-1 homocigóticas, con un peso al comienzo del periodo experimental que oscilaba entre 180 y 200 grs. Las ratas transgénicas P23H-1 homocigóticas fueron proporcionadas por el Dr. M. LaVail (UCSF School of Medicine; [http:// www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml](http://www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml)). Las ratas Sprague-Dawley (SD) fueron obtenidas del Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia. Ambas cepas fueron criadas y mantenidas en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia, en habitaciones con control de temperatura ambiente (23-24°C) y con ciclos alternos de 12 horas de luz-oscuridad, (el periodo de luz comenzaba a las 8 horas de la mañana y la intensidad de la luz variaba dentro de las cajas entre 5 y 30 lux condiciones escotópicas-mesópicas dependiendo de la posición de las cajas con respecto al techo de la habitación, donde se encontraba la fuente de luz). Los animales eran alimentados "ad libitum". Los animales fueron tratados según la normativa europea y nacional vigente y, en concreto, según lo dispuesto en la Directiva 86/609/CEE, 2010/63/EU sobre la protección de animales utilizados para fines científicos y el R.D.1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y la Ley 32/2007 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. También se siguieron las directrices sobre el uso de animales en experimentación oftálmica y del sistema visual de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO).

Todas las manipulaciones quirúrgicas se efectuaron bajo anestesia general, obtenida por inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de ketamina (70 mg/kg de peso corporal; Ketolar[®], Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) y xilacina (10 mg/kg de peso corporal; Rompur[®], Bayer, Kiel, Alemania) en 0,1 ml de suero salino al 0,9%. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico OPMI-11-FC (Carl Zeiss, S.A.) instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado.

En el postoperatorio inmediato a los animales se les aplicó por vía tópica en la córnea un ungüento oftalmológico con tobramicina (Tobrex[®], Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación y lesión corneal. Los animales fueron devueltos a su jaula y colocados bajo una fuente de luz emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente fueron enviados al animalario, donde permanecieron hasta su sacrificio.

Los animales se sacrificaron con una sobredosis letal de una solución de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal[®], Vetoquinol, S.A., Lure, Francia) inyectada i.p. (0,5-1,0 ml).

3.2. FOTOEXPOSICIÓN.

Se fotoexpusieron ratas albinas SD. Antes de la fotoexposición, se instiló a los animales una gota de atropina al 1% (Colircusí atropina 1%®; colirio, Alcon Cusí S.A., Barcelona, España) en el ojo izquierdo para conseguir una midriasis máxima en este ojo. En el ojo derecho no se aplicaron midriáticos para poder comprobar si en estos animales albinos, presumiblemente más sensibles a la luz que los pigmentados, se observaban diferencias entre uno y otro ojo debidas a la midriasis. El periodo de fotoexposición siempre se inició entre las 10 y las 12 de la mañana, ya que está documentado que la severidad de la fototoxicidad en la rata depende de la hora de fotoexposición y es mayor durante periodos de adaptación a la oscuridad (Organisciak y cols., 2000; Vaughan y cols., 2002).

Los animales fueron expuestos a una fuente de luz blanca fría fluorescente, durante 48 horas. Cada 24 horas se comprobaba que la pupila del ojo izquierdo estuviera dilatada y, en caso de haber remitido los efectos de la atropina, se le instilaba otra gota para mantener durante todo el periodo de fotoexposición una midriasis máxima en el ojo izquierdo.

Durante el periodo de fotoexposición se estabularon los animales de forma individual en jaulas transparentes que permitían la entrada de la máxima cantidad de luz posible. Así, la tapadera y el suelo de la jaula, donde se colocaba la comida y la bebida a los animales, eran rejillas que permitían el paso de luz y la caja era de plástico transparente (Figura 3.1.A). Para el periodo de fotoexposición fueron utilizadas dos fuentes distintas de luz: en algunos experimentos se utilizaron tubos de luz fluorescente situados en el techo (Figura 3.1.B) y en otros tubos de luz fluorescente circulares que rodeaban las cajas (a este método lo denominamos de aquí en adelante “túnel de luz”; Figura 3.2). En el primer método, las cajas de los animales se colocaban sobre un estante situado a 20 cm de los tubos de luz y en el segundo las cajas se apoyaban directamente en los tubos de luz fluorescente. Con ambos métodos la intensidad de la luz dentro de las cajas durante el periodo de fotoexposición fue de 3.000 lux.

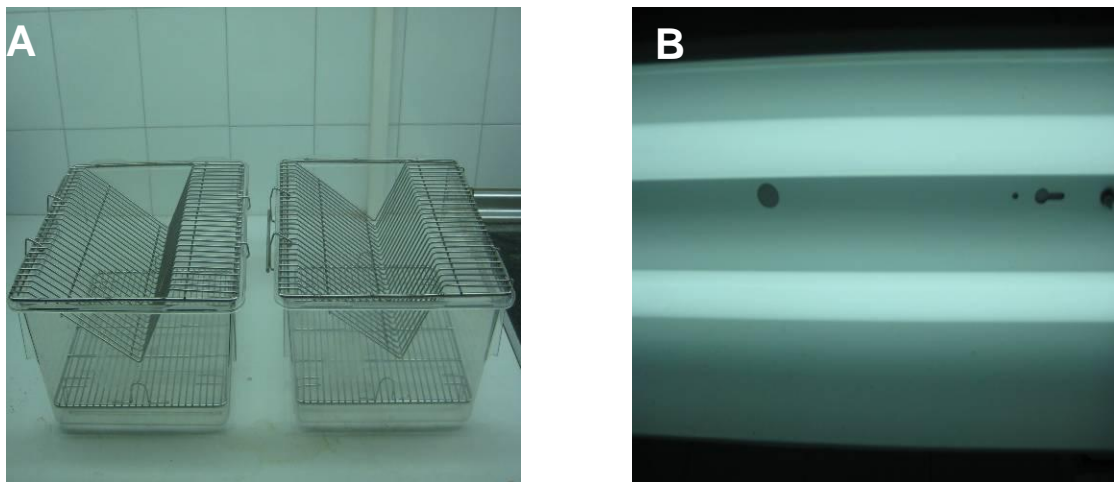


Figura 3.1. Método utilizado para la fotoexposición.

Jaulas en las que se colocaba a los animales para la fotoexposición (A) y tubos fluorescentes de luz blanca fría de intensidad regulable que se situaban en el techo de la habitación por encima de las cajas (B).

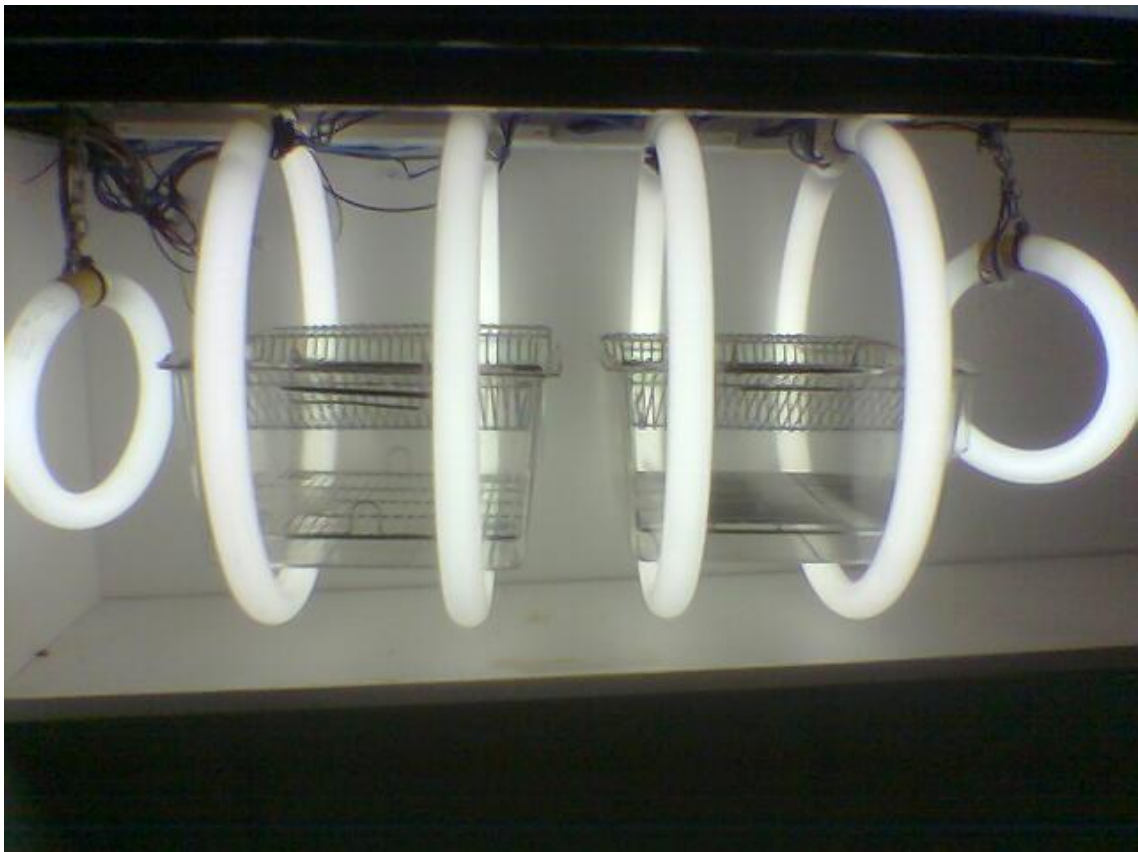


Fig. 3.2. Imagen de los tubos fluorescentes circulares (“túnel de luz”) de intensidad regulable que rodeaban a las cajas donde se colocaban los animales.

3.3 INYECCIÓN DE PEROXIDASA DE RÁBANO.

Con el fin de examinar la vascularización de la retina, algunos de los animales que iban a ser procesados para realizar montajes globales de la retina recibieron una inyección en la vena femoral de una solución de 100 mg de peroxidasa de rábano (Type-I horseradish peroxidase, MW 44 kDa, Sigma P 8125, 12.000 unidades, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) diluida en 0,7 ml de suero salino (Villegas-Pérez y cols., 1998; Marco-Gomariz y cols., 2006a) 15 minutos antes de sacrificarlos.

Tras la disección de la retina de estos animales (ver apartado 3.5.2) se realizó la reacción histoquímica modificada de Hanker-Yates para la detección de la peroxidasa (ver apartado 3.5.1.2.1).

3.4. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

El trazado de la población de células ganglionares de la retina (CGR) es imprescindible para poder identificar y cuantificar posteriormente las CGR supervivientes después de una lesión.

Para identificar las CGR en este estudio hemos utilizado el trazador neuronal fluorescente Fluorogold® (FG) (Fluorochrome Inc., Engelwood, CO, EEUU), aplicado en ambos colículos superiores, que son los principales territorios de proyección cerebrales de los axones de las CGR, de acuerdo con técnicas previamente descritas (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988; Marco-Gomariz y cols., 2006a; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a, c) (Figura 3.3). Este trazador produce un marcaje fiable y reproducible, y es muy eficaz para su utilización en el sistema visual (Salinas-Navarro y cols., 2009a). El FG es captado por los terminales axonales de las CGR en el colículo superior y transportado activa (Schmued y cols., 1986, 1989; Wessendorf, 1991) y retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumula, no difundiendo transcelularmente (Schmued y cols., 1986). Trabajos previos del Laboratorio de Oftalmología Experimental, donde hemos realizado esta Tesis, han documentado que el FG aplicado en los colículos superiores de la rata marca la práctica totalidad de la población de CGR de forma retrógrada y persiste en los somas de las células ganglionares por periodos superiores a las tres semanas (Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a).

El FG acumulado en el soma de las CGR se puede observar en el microscopio de fluorescencia con el filtro de luz adecuado y permite diferenciar las CGR de otros tipos de neuronas que están presentes en la misma capa de la retina y que no se trazan con FG, como las células amacrinas desplazadas, que suponen el 50% de las células de la capa de las CGR de la rata adulta (Perry, 1981).

Para la aplicación del trazador se siguió el método estándar descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Vidal-Sanz y cols., 1988, 1993, 2000, 2001, 2007; Lafuente López-Herrera y cols., 2002;

Salinas-Navarro y cols., 2009a, c; Nadal-Nicolás y cols., 2009). Para realizar este marcaje se rasura la parte dorsal de la cabeza y cuello del animal, realizando una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo, para exponer el cráneo del animal. A continuación se realiza una craneotomía parietal bilateral con ayuda de una fresadora (Free-Wheeler, Cordless Moto-tol, Model 850; Dremel Europe, Breda, Holanda). Se quitan las meninges que recubren el cerebro y, con una micropipeta conectada a un sistema de aspirado acoplado a una bomba de vacío (Ordisi S.A., L'Hospitalet, Barcelona, España), se succiona la porción de encéfalo e hipocampo necesaria para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos colículos superiores. A continuación se retira con sumo cuidado la piamadre que recubre los colículos superiores, y se aplica sobre ellos una pequeña porción de esponja de gelatina (Spongostan® Film, Ferrosan, Dinamarca) previamente empapada en una solución de FG disuelto al 3% en dimetil-sulfóxido disuelto al 10% en suero salino. Por último, se sutura la piel del animal con seda de 5/0 (Lorca Marín, Murcia, España).

Los animales se procesaban 7 días después de la aplicación de FG porque se ha documentado que este tiempo es suficiente para que el FG se transporte retrógradamente y se acumule abundantemente en el soma de todas las CGR (Peinado-Ramón y cols., 1996; Selles-Navarro y cols., 1996).

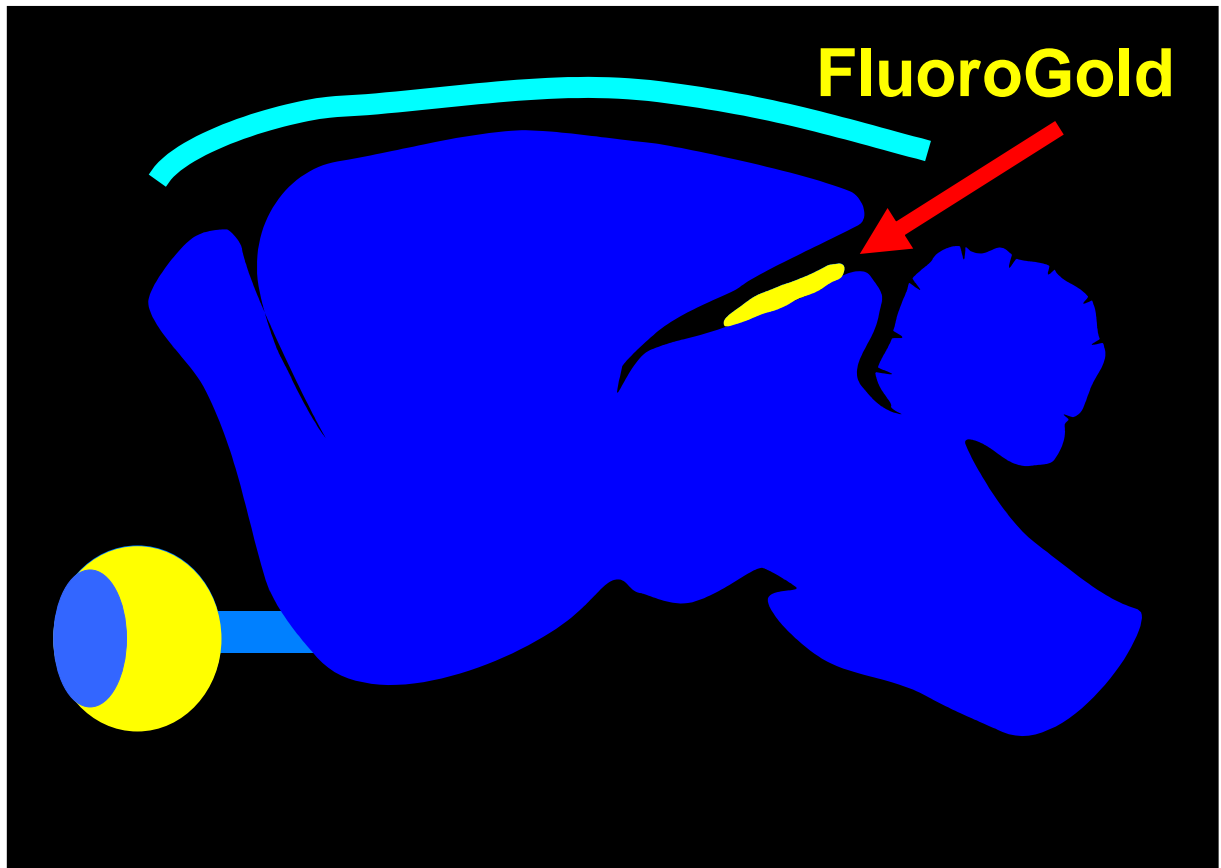


Fig. 3.3. Esquema representativo de una sección sagital del cerebro de roedor.

Aplicación del trazador neuronal retrógrado FluoroGold en ambos colículos superiores una semana antes del procesamiento del animal, para la identificación por transporte axonal retrógrado activo de las células ganglionares de la retina.

3.5. PROCESADO HISTOLÓGICO.

3.5.1. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.

Los animales de todos los grupos, excepto a los que se les inyectó HRP, fueron perfundidos como se señala a continuación.

Tras administrar a los animales por vía i.p. una sobredosis de pentobarbital sódico, y comprobar que eran insensibles a estímulos dolorosos, pero que mantenían aún el latido cardíaco. Se procedió a la perfusión intracardiaca de los animales: se corta la piel desde el apéndice xifoides hacia

los hombros. Se secciona el diafragma y posteriormente el músculo y las costillas desde la de línea esternal media hacia las clavículas, con cuidado de no cortar los pulmones. Se levanta y clampa el peto costal dejando al descubierto el tórax. Posteriormente, se clampa la aorta abdominal y se secciona la aurícula derecha dejando que la sangre salga durante unos segundos. Se realiza una pequeña incisión en el ventrículo izquierdo, donde se introduce una cánula hasta la aorta ascendente. La cánula se conecta por un sistema de tubos a una bomba peristáltica (ISM827, Ismatec S.A., Zurich, Suiza) y ésta a un reservorio de fluidos. Primero, el animal se perfundió con 50 ml de suero salino (NaCl al 0,9%) para limpiar la sangre de los vasos y órganos, a continuación se perfundía al animal con 150 ml de una solución de paraformaldehído (PF) al 4% en tampón fosfato 0,1 M, a 4°C de temperatura.

Una vez perfundidos los animales, el proceso de los tejidos fue diferente, dependiendo de si las retinas se disecaban completas (montajes globales; ver apartado 3.5.1.1.) o se procesaban las copas ópticas para la realización de secciones transversales (ver apartado 3.5.2.).

3.5.1.1. Montajes globales.

Los animales utilizados para realizar montajes globales de las retinas eran procesados de distinta forma dependiendo de si se les había inyectado HRP en la vena femoral o si se les había aplicado FG en ambos colículos superiores. No obstante, la disección de las retinas fue igual para ambos grupos de animales.

3.5.1.1.1. Disección y procesado histológico de las retinas.

Tras la perfusión del animal se colocó un punto de sutura en la conjuntiva perilímbica señalando el polo superior de los ojos del animal, para posteriormente poder identificar la región superior de la retina. A continuación, se enuclearon los globos oculares, y se postfijaron durante una hora en PF al 4%, posteriormente se colocaron en una placa Petri con base de cera de abeja y se sujetaron con alfileres entomológicos. Con pinzas y microtijeras se realizó una sección circular de la esclera a nivel del limbo esclero-corneal y se eliminaron todas las estructuras del polo anterior del ojo: córnea, iris y cristalino, quedando solamente la parte posterior del globo ocular o copa óptica. Seguidamente, se realizaban cuatro cortes de la copa óptica desde su zona anterior hacia el nervio óptico, de manera que uno de los cortes, el que se correspondía con el polo superior del ojo, fuera el más profundo. Estos cuatro cortes atravesaban todas las capas de la copa óptica: esclera, coroides y retina, que podían de esta forma aplanarse y quedaban divididas en cuatro cuadrantes (temporal superior, temporal inferior, nasal superior y nasal inferior). A continuación, se separaba la retina de la coroides y la esclera, se colocaba la retina “a plano” sobre un papel de filtro Whatman nº 1 (Whatman, Internacional Ltd. Maidstone, Reino Unido) al que quedaba adherida por su superficie vítrea y se

postfijaba unida a este papel en la misma solución fijadora utilizada durante la perfusión durante 1 hora. Posteriormente, la retina se separaba del papel de filtro, se lavaba en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M (pH 7,2-7,4) y se reaccionaba con diferentes técnicas de inmunohistoquímica (ver apartado 3.5.3). Por último, la retina se lavaba, para eliminar los restos de vítreo y suciedad adherida a la retina, y se montaba "in toto", colocando su cara vítrea hacia arriba sobre un portaobjetos y se cubría con medio de montaje, (glicerol al 50% y p-fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,0; Dodd y cols., 1984) y un cubreobjetos. Los bordes del cubreobjetos se sellaron con laca de uñas. Posteriormente se examinaron con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania).

3.5.1.2.1. Montajes globales en animales con inyección de peroxidasa de rábano.

Tras sacrificar al animal con una sobredosis de barbitúricos, se marcaba el polo superior de los ojos con un punto de sutura, se enucleaban los ojos y eran introducidos durante 1 hora en una solución fijadora de PF al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M (pH 7,2-7,4). A continuación, las retinas fueron disecadas, postfijadas y lavadas, como se señala en el apartado anterior, y reaccionadas utilizando la reacción histoquímica modificada de Hanker-Yates (Linden y Perry, 1983) para la detección de la peroxidasa (Raviola y Freddo, 1980). Por último, las retinas se montaron en cubreobjetos como se señala en el apartado anterior.

3.5.2. SECCIONES TRANSVERSALES.

Tras la perfusión (apartado 3.5.1), se enucleaban ambos ojos, se retiraba el tejido periocular dejando siempre un muñón del músculo recto superior para la posterior distinción del polo superior del ojo, se retiraba la sutura conjuntival que marcaba el polo superior del ojo y se marcaba la esclera del polo superior con tinta china. Utilizando pinzas y microtijeras, se realizó una sección de la esclera perilímbica y se retiraron la córnea, el iris y el cristalino, quedando solamente las copas oculares que fueron procesadas, bien para realizar secciones en el micrótomos o en el criostato, como veremos a continuación.

Secciones de microtomo: Las copas ópticas se postfijaron durante al menos 48 horas en una solución de PF al 4% en PB. A continuación se sumergieron en soluciones crecientes de alcoholes para su deshidratación y en 1-butanol y se incluyeron en bloques de parafina en los que se mantuvo la orientación del globo ocular. Se obtuvieron cortes histológicos sagitales de 3 µm de espesor de los bloques de parafina en un microtomo de rotación (Microm HM-340-E; Microm Laborgerate GmbH, Walldorf, Alemania). Las secciones fueron recolectadas sobre portaobjetos tratados con poly-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 0,01% en agua bidestilada y teñidas con hematoxilina-eosina de Harris o procesadas para la detección de núcleos apoptóticos con

un kit comercial de TUNEL (del inglés, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling). Para la tinción con hematoxilina-eosina, las secciones eran desparafinadas en baños sucesivos de xileno, hidratadas por inmersión en soluciones decrecientes de alcohol, teñidas, deshidratadas en soluciones crecientes de alcohol, montadas con medio de montaje (DePeX[®]; BDH Laboratory Supplies, Poole, Inglaterra) y cubiertas con un cubreobjetos. Para la detección de núcleos apoptóticos mediante la técnica de TUNEL se siguió el protocolo indicado por el fabricante (FragEL[™] DNA Fragmentation Detection Kit, Quiagen, Merck Bio, Nottingham, UK) con unas ligeras modificaciones (ver apartado 3.5.4).

Secciones de criostato: Se crioprotegieron las copas ópticas sumergiéndolas en una solución de Sacarosa 30% en PBS durante 8 horas a 4°C. A continuación, se incluyeron en Tissue-Tek[®] (OCT; Sakura, Finetek, Torrance, CA, EEUU) manteniendo su orientación y se congelaron rápidamente en isopentano a -70°C. Se obtuvieron secciones sagitales en un criostato (Leica, Jung CM3000) de 15 µm de grosor que fueron procesadas para la realización de inmunohistofluorescencia doble (ver apartado 3.6.3).

3.5.3. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA.

Las técnicas de inmunohistofluorescencia (Figura 3.4) fueron distintas dependiendo del tipo de muestra sobre el que se trabajó: montajes globales o secciones radiales.

3.5.3.1. Inmunohistofluorescencia en montajes globales de la retina.

Permeabilización: Las retinas se lavaron en PBS a temperatura ambiente y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en PBS conteniendo un 0,5% de Triton 100 (Tx; Triton[®] X-100, Sigma X100, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) tras los cuales se congelaron inmersas en el mismo tampón a -70°C durante 15 minutos. Después se atemperaron y se lavaron en PBS a temperatura ambiente.

Incubación de los anticuerpos primarios: Las retinas se incubaron en el tampón de bloqueo (PBS conteniendo un 2% de Tx y un 10% de suero normal de burro -Normal Donkey Serum, NDS, Jackson ImmunoResearch Inc., Cambridge, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (2% Tx, 2% NDS en PBS) durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas y posteriormente a un enjuague rápido en PBS, se lavaron en 0,5% Tx en PBS a temperatura ambiente.

Incubación con los anticuerpos secundarios: Los anticuerpos secundarios que se usaban estaban acoplados a distintos fluoróforos (ver apartado 3.6.4.3). Primero se incubaron las retinas en el tampón de bloqueo (2% Tx, 10% NDS en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario diluido en 0,5% Tx en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras acabar la incubación, se lavaron las retinas en 0,5% Tx en PBS a temperatura ambiente y posteriormente en PBS. La retina se montó "in toto" sobre un portaobjetos, colocando su cara vítrea hacia arriba, la solución de montaje ya mencionada en la sección 3.5.1.1.1. y un cubreobjetos.

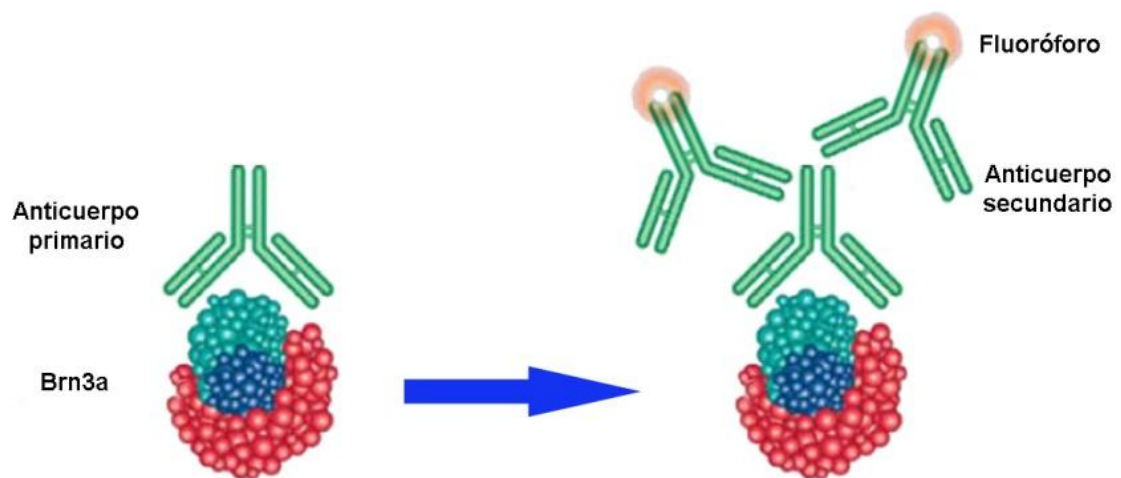


Figura 3.4. Esquema representativo del protocolo utilizado para detectar las células ganglionares de la retina por inmunohistofluorescencia con el anticuerpo anti-Brn3a.

El anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a reconoce y se une de manera específica al antígeno (Brn3a) presente en los núcleos de las células ganglionares de la retina. En un segundo paso se detecta la parte conservada del anticuerpo primario con un anticuerpo secundario de burro que está acoplado a un fluoróforo que al excitarse emite fluorescencia roja (Alexa 594).

3.5.3.2. Inmunohistofluorescencia en secciones radiales.

Permeabilización: Los cortes radiales obtenidos en el criostato se lavaron primero en PBS y después en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente para disolver el Tissue-tek[®] adherido a la sección y al porta.

Incubación con el anticuerpo primario: Las retinas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (2% Tx, 5% NDS en PBS) durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas, se lavaron en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente.

Incubación con el anticuerpo secundario: Se realizó la incubación del anticuerpo secundario diluido en 2% Tx en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las retinas en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente y, por último en PBS. Las retinas se montaron con un medio de montaje comercial conteniendo DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) para contrateñir los núcleos (Vectashield Mounting Medium con DAPI, Vector Atom, Alicante, España). El DAPI es un compuesto fluorescente que se une al ADN de doble cadena, preferentemente a las regiones ricas en A-T y forma un complejo estable que fluoresce 20 veces más que el DAPI solo. De esta manera, el DAPI tiñe los núcleos de todas las células de un determinado tejido. El pico de excitación es 358 nm y el de emisión es 461 nm (azul) y, por lo tanto, la señal del DAPI se observa con luz ultravioleta bajo el filtro azul.

3.5.3.3. Anticuerpos utilizados.

Detección de CGR: Para la inmunodetección de las CGR en los montajes globales se utilizó un anticuerpo de cabra anti-Brn3a (goat anti-Brn3a, C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Alemania) que se diluyó 1:100. Las CGR de estos animales ya habían sido trazadas retrógradamente mediante el trazador neuronal FG (ver apartado 3.4.).

Detección de los axones de las CGR: Para la detección de los axones de las CGR en los montajes globales se utilizó el anticuerpo RT97 de ratón que reconoce el pNFH (mouse anti-pNFH, Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa, EEUU) diluido 1:200. El RT97 es un anticuerpo monoclonal que está dirigido contra una de las subunidades constituyentes de los neurofilamentos, componentes del citoesqueleto axonal y por tanto permite identificar los axones. Los neurofilamentos están compuestos de tres subunidades que se distinguen según sus pesos moleculares: NF-L (68 kDa), NF-M (160 kDa) y NF-H (200kDa). El RT97 está dirigido contra esta última subunidad, la de mayor peso molecular, en su estado fosforilado (pNFH) (Anderton y cols., 1982).

Doble detección de vasos sanguíneos y axones de las CGR: Para la inmunodetección de los vasos sanguíneos en las secciones transversales se utilizó un anticuerpo de ratón anti-RECA (rat endotelial cell antigen) (mouse anti-RECA-1, AbD Serotec, Dusseldorf, Alemania), diluido 1:1.000. Para la detección de los axones de las CGR en las secciones transversales se utilizó un anticuerpo de conejo anti-NFH (rabbit anti-NFH, H-100, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Alemania) diluido 1:50.

Anticuerpos secundarios: Los anticuerpos secundarios (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) fueron: i) burro anti-cabra Alexa Fluor 594 (donkey anti-goat-alexa-594), que emite fluorescencia roja, para detectar el anticuerpo primario goat anti-Brn3a (CGR) ii) burro anti-ratón Alexa Fluor 488 (donkey anti-mouse-alexa-488), que emite fluorescencia verde, para detectar los primarios mouse anti-RECA (vasos sanguíneos) y mouse anti-pNFH (RT-97) y iii) burro anti-conejo Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit-alexa-488) para detectar el primario rabbit anti-NFH. Todos los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:500.

3.5.4. MARCAJE DE LOS NÚCLEOS EN APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL EN SECCIONES TRANSVERSALES DE RETINA.

En las secciones transversales de la retina de algunos animales se realizó la detección de la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), característica de las células apoptóticas, por medio de la técnica TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL). Para realizar esta técnica se utilizó el kit comercial FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, (Quiagen, Merck Bio, Nottingham, Reino Unido).

El TUNEL es una técnica que detecta si el ADN de una célula está fragmentado. Si es así, podemos suponer que la célula está en apoptosis y, por tanto, en proceso de muerte celular programada. En la apoptosis el ADN empieza a fragmentarse por las zonas internucleosomales, que son las menos protegidas.

La detección de ADN fragmentado se basa en una reacción en la que la enzima TdT (deoxynucleotidil transferasa terminal) añade desoxinucleótidos al extremo 3' libre de ADN fragmentado en las zonas internucleosomales sin necesidad de molde (Figura 3.5). En nuestro caso, uno de los desoxinucleótidos añadidos (dUTP) está marcado con Biotina, que es posteriormente detectada con avidina conjugada con tetrametil-rodamina (TRITC), que emite una fluorescencia roja.

Para el marcaje de las células en apoptosis en las secciones transversales se siguió el protocolo indicado por el fabricante (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Quiagen, Merck Bio, Nottingham, Reino Unido) con unas ligeras modificaciones:

En primer lugar se realizó la permeabilización del tejido en los portos con la enzima proteinasa K. Se detiene la digestión de esta enzima bajando el pH de la reacción, mediante lavados

en TBS (Tris 7,6 20 mM, NaCl 140 mM) y se incuba el tejido con la enzima TdT y una mezcla de nucleótidos (dUTP-biotina -nucleótido marcado- y dUTP -sin marcar-) disueltos en el tampón en el que funciona la TdT (Cacodilato de sodio 1M, Tris 0,15 M, 1,5 mg/ml Bovine Serum Albumine -BSA-, 3,75 mM CoCl₂, pH 6,6). La TdT incorpora, sin necesidad de molde, dUTP y dUTP-biotina allá donde el ADN esté fragmentado. Por último, se realizó detección de la biotina con avidina conjugada con tetrametil-rodamina (ExtrAvidin[®]-TRITC, Sigma E 3011, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) diluida 1:500 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los portas en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente, tras lo que las secciones se montaron en el medio de montaje comercial con DAPI (referido en el apartado 3.5.3.2.).

Para determinar que la técnica se llevaba a cabo correctamente se realizaron controles positivos: En las secciones contenidas en algunos portaobjetos se fragmentó el ADN de las células del tejido mediante incubación con DNasa, una enzima de la familia de las nucleasas que rompe el ADN en trozos. Después, estos portas se trataron como los experimentales para la detección de los núcleos fragmentados. Si la técnica se realiza de forma correcta, todos los núcleos de las secciones contenidas en estos portaobjetos aparecen marcados con fluorescencia roja. El control negativo utilizado fueron cortes de retinas control, en los que no se observó ningún núcleo apoptótico.

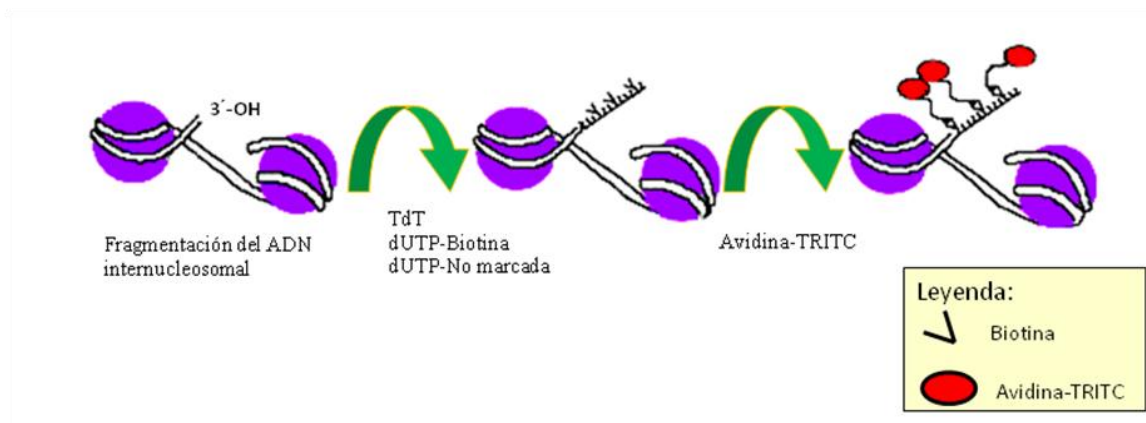


Figura 3.5. Técnica de TUNEL.

Esquema que representa las zonas de ruptura internucleosomales con el extremo 3' libre del ADN donde se une la enzima TdT y añade desoxinucleótidos, algunos marcados con biotina, a la que posteriormente se une la avidina fluorescente. Tomada y modificada del protocolo del Kit de detección de ADN fragmentado TdT-FragEL[™] (Quiagen, Merck Bio, Nottingham, Reino Unido).

3.6. GRUPOS EXPERIMENTALES.

En la siguiente tabla reseñamos los diferentes grupos experimentales que realizamos para los dos modelos de degeneración retiniana, el modelo de fototoxicidad y el de degeneración hereditaria, y dependiendo del proceso de las retinas en montajes globales o secciones transversales.

- ***Modelo de fototoxicidad:***
 - **Montajes globales de la retina:**

	ESTIRPE	ESTUDIO	TIEMPO TRAS LA FOTOEXPOSICIÓN (TFE)	TAMAÑO MUESTRAL (nº de retinas y método utilizado)
RATAS	SD	Vascularización retiniana	Control	n=10 HRP
			Inmediatamente tras la fotoexposición (TFE)	n=36 HRP
			7 días TFE	n=18 HRP
			1 mes TFE	n=14 HRP
			3 meses TFE	n=12 HRP
		Supervivencia de CGR	Control 2 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			Control 20 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			Inmediatamente TFE	n=16 FG y pNFH
			1 mes TFE	n=12 FG y pNFH
			3 meses TFE	n=14 FG y pNFH
			6 meses TFE	n=14 FG y pNFH
			9 meses TFE	n=12 FG y pNFH
				n=10 FG, Brn3a y pNFH
			12 meses TFE	n=10 FG y pNFH
n=10 FG, Brn3a y pNFH				

○ **Secciones transversales:**

	ESTIRPE	METODO DE OBTENCION DE LAS SECCIONES	TIEMPO TRAS LA FOTOEXPOSICIÓN (TFE)	TAMAÑO MUESTRAL (nº de retinas y método utilizado)
RATAS	SD	MICROTOMO	Control	n=8 TUNEL y H&E
			Inmediatamente TFE	n=8 TUNEL y H&E
			7 días TFE	n=8 TUNEL y H&E
			1 mes TFE	n=8 TUNEL y H&E
			3 meses TFE	n=8 H&E
			6 meses TFE	n=8 H&E
			9 meses TFE	n=8 H&E
			12 meses TFE	n=4 H&E
		CRIOSTATO	Control	n=4 RECA y NFH
			12 meses TFE	n=4 RECA y NFH

• ***Modelo de degeneración hereditaria (P23H-1):***

○ **Montajes globales de la retina:**

	ESTIRPE	ESTUDIO	TIEMPO DESPUES DEL NACIMIENTO	TAMAÑO MUESTRAL (nº de retinas y método utilizado)
RATAS	P23H-1	Supervivencia de CGR	SD 2 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			SD 12 meses	n=8 FG, Brn3a y pNFH
			1 mes	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			3 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			6 meses	n=12 FG, Brn3a y pNFH
			9 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH
			12 meses	n=10 FG, Brn3a y pNFH

○ **Secciones transversales:**

	ESTIRPE	METODO DE OBTENCION DE LAS SECCIONES	TIEMPO DESPUES DEL NACIMIENTO	TAMAÑO MUESTRAL (nº de retinas y método utilizado)
RATAS	P23H-1	MICROTOMO	SD	n=8 H&E
			1 mes	n=4 H&E
			3 meses	n=4 H&E
			6 meses	n=4 H&E
			9 meses	n=4 H&E
			12 meses	n=4 H&E
		CRIOSTATO	SD	n=4 RECA y NFH
			9 meses	n=4 RECA y NFH
			12 meses	n=4 RECA y NFH

Leyenda:

- TFE: Tras la Fotoexposición.
- H&E: Hematoxilina y Eosina.
- HRP: Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de Rábano).
- FG: Fluorogold. Trazado de CGR.
- RECA: Rat Endothelial Cell Antigen (Vasos sanguíneos).
- NFH: Neurofilament High subunit isoform (Neurofilamentos).
- TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labelling (Núcleos en apoptosis).
- Brn3a: Inmunodetección de CGR.
- pNFH: Phosphorylated Neurofilament High subunit isoform (Neurofilamentos).

3.7. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE LAS RETINAS.

3.7.1. PROCESADO DE IMÁGENES.

Tanto los montajes globales como las secciones transversales de las retinas se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico y de fluorescencia (Axioscop 2 plus, Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de la fluorescencia blanca dorada del FG y del DAPI, el de rodamina (BP 546/12, LP 590) para observar la fluorescencia roja de los anticuerpos conjugados con Alexa-594 (Brn3a y RECA), y el de fluoresceína (BP 450/490, LP 515-565) que permite la observación de los anticuerpos conjugados con Alexa-488 (pNFH y NFH). El microscopio estaba también equipado con una cámara digital de alta resolución (ProgResTM c10, Jenoptik, Jena, Alemania) y una platina motorizada (ProScanTM H128 Series Motor Controller; Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido) conectada a un sistema de análisis de imagen que permite capturar y grabar las imágenes (Image-Pro Plus 5.1 for Windows[®] Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EEUU) con un módulo de control de microscopio controlado por ordenador (Scope-Pro[®] 5.0 for Windows[®]; Media Cybernetics, Inc., Silver Springs, MD, EEUU).

Para realizar la reconstrucción y fotomontaje de las retinas montadas a plano, se realizó la adquisición secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos, siguiendo un patrón de muestreo en matriz de celdas regulares con un área total de muestreo preestablecida que cubría la superficie de la retina, usando un objetivo de 10 aumentos (Plan-Neofluar, 10x/0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania), siguiendo métodos descritos anteriormente en nuestro laboratorio (Marco-Gomariz y cols., 2006; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a). Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente dentro del programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 5.1 for Windows[®]. Dependiendo del tamaño y orientación de cada retina en el portaobjetos se establecía un área de escaneo que cubriese completamente cada retina. Este área consistía en una matriz de m campos microscópicos verticales y n horizontales (m x n). El tamaño de cada campo de captura fue de 0,627 mm², y normalmente se tomaban 154 imágenes de cada retina (Figura 3.6).

Todas las imágenes que componen una retina se guardaron en un archivo como imágenes de color de 24 bit, tras esto, las imágenes eran combinadas automáticamente en una sola imagen de alta resolución que reconstruye la retina montada a plano (Fotomontaje; Figura 3.7) usando el programa IPP[®] para Windows[®] para su posterior estudio y análisis.

En el fotografiado de retinas completas primero se adquirió la señal de FG (azul), después la de Brn3a (roja) y por último la de pNFH (verde).

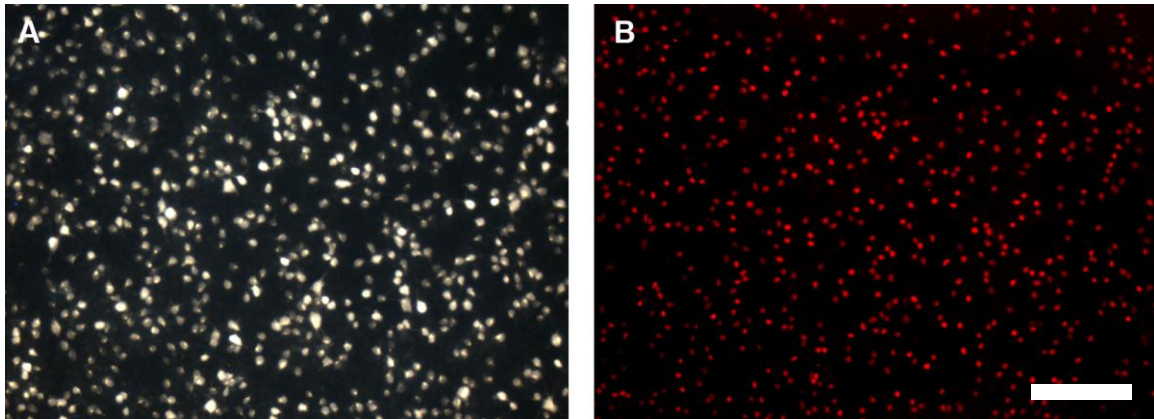


Figura 3.6. Microfotografías realizadas para la reconstrucción de los fotomontajes.

Microfotografías del mismo área del mismo montaje global de la retina adquiridas a 10x en las que podemos observar la señal de FG (A) y Brn3a (B). La adquisición secuencial de estas microfotografías y su posterior combinación automática nos permitía la reconstrucción de los fotomontajes de los montajes globales de las retinas. Barra = 20 μm .

3.7.1.1. Contaje automático de células ganglionares de la retina marcadas con Fluorogold.

Las microfotografías tomadas de cada retina fueron procesadas individualmente por medio de una subrutina informática específica para el contaje de las CGR en retinas a plano marcadas con FG (Salinas-Navarro y cols., 2009a), recientemente desarrollada en nuestro laboratorio, que automatiza tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros IPBasic del programa de análisis de imagen Image-Pro® Plus (IPP; Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EEUU). Así, aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada microfotografía se logra separar cada célula individualmente, de modo que el programa puede contar automáticamente las células de cada fotografía.

El proceso de transformación de las imágenes para el contaje de las CGR se realizaba siguiendo varios pasos. En primer lugar, las imágenes fueron convertidas a escala de grises de 8-bit para descartar el exceso de información del color. En segundo lugar se eliminaron las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio mediante el filtro de mejora del aplanado del programa IPP que elimina las variaciones de iluminación de fondo. Seguidamente se aumentó los bordes de las células utilizando el filtro espectro grande, el cual resalta las células teñidas de fluorescencia brillantes del fondo oscuro. Los pequeños artefactos y el ruido se quitaron mediante tres pasos del filtro de mejora de la mediana. Por último, los agrupamientos de células fueron separados con dos pasos por medio del filtro de separación del IPP, que primero erosiona los bordes de las células que se están tocando hasta que se separan y luego los vuelve a dilatar pero sin llegar a

tocarse. Las células fueron contadas utilizando unos parámetros predeterminados para excluir objetos que fueran mayores de $300 \mu\text{m}^2$ ó menores de $7 \mu\text{m}^2$. Finalmente, el número de células contadas en cada fotografía se exportó a una hoja de cálculo de Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA), donde se guardaron para su análisis posterior.

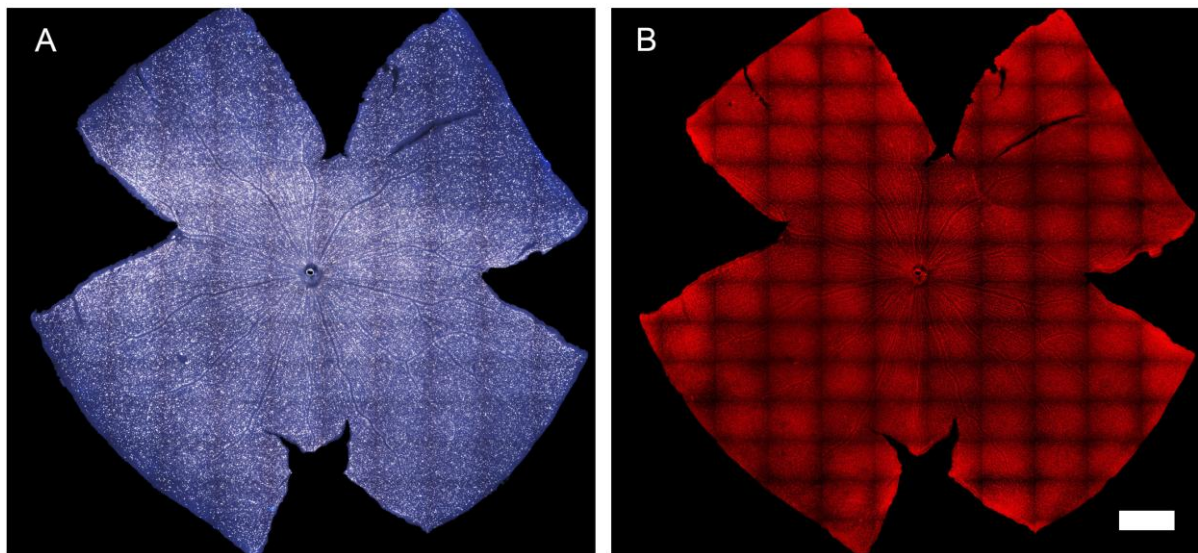


Figura 3.7. Reconstrucción de los fotomontajes.

Fotomontajes de una retina control completa en la que se han trazado las células ganglionares de la retina con FG (A) e inmunodetectado con Brn3a (B). Barra = 1 mm.

3.7.1.2. Contaje automático de células ganglionares de la retina detectadas con Brn3a.

Al igual que para contar las CGR marcadas FG, las imágenes fueron procesadas por medio de un modelo informático específico para el contaje de los núcleos de CGR inmunodetectados con Brn3a en retinas completas, que ha sido puesto a punto recientemente en nuestro laboratorio (Nadal-Nicolas y cols., 2009).

Las imágenes fueron procesadas usando una subrutina informática específica, automatizando las tareas repetitivas mediante la programación en IPBasic, lenguaje de macros del programa de análisis de imagen Image-Pro® Plus. Así, aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen salvada podemos contar las células resultantes, exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) para su análisis. Para contar el número de CGRs y medir el área de la retina en una de las imágenes de alta resolución obtenidas a partir de fotomontajes se aplica la correspondiente calibración espacial a la imagen reconstruida basada en las características usadas para su captura. En el primer paso para el

contaje de núcleos, los datos de la imagen se procesan usando el filtro HiGauss que resalta los núcleos positivos. En un segundo paso, la imagen resultante se vuelve a procesar con el filtro LoPass, que normaliza las variaciones de fondo. Finalmente, la imagen resultante se procesa de nuevo con el filtro HiPass. Los grupos de núcleos se separaron aplicando dos veces el filtro de separación para poder diferenciarlos como objetos independientes. Los núcleos se cuentan bajo parámetros específicos que excluyen los objetos en función de su tamaño, descartando aquellos objetos que no cumplen dicho requisito y no puedan ser núcleos inmunodetectados con Brn3a. Finalmente, los datos de cada contaje (retina completa) se exportan (dynamic data Exchange) a una hoja de Excel (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) donde los datos se salvan para análisis posteriores. Ambas subrutinas han sido descritas en detalle recientemente (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a).

3.7.2. MAPAS DE ISODENSIDAD.

Los fotomontajes fueron procesados automáticamente usando una rutina informática previamente desarrollada al efecto en el programa de imagen IPP (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas Navarro y cols., 2009a). Para estudiar el patrón de distribución de las CGR sobre toda la retina, la densidad celular obtenida en cada microfotografía se representó gráficamente como mapas de isodensidad (Figura 1.5) usando el programa de representación gráfica SigmaPlot® 9.0 for Windows® (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU).

La subrutina principal de procesado consistió en la división de todas las microfotografías en áreas rectangulares conocidas de igual tamaño, denominadas áreas de interés, el número de estas áreas de interés fue de 64 por microfotografía para las retinas trazadas con FG y de 36 para las inmunodetectadas con Brn3a. Para cada área de interés, el número de CGR fue obtenido usando las subrutinas de contaje celular descritas previamente (ver apartado anterior) y se calculó la densidad celular en cada una de estas áreas. Los datos de densidad de las CGR fueron exportados y almacenados de manera secuencial y ordenada en una hoja de cálculo Microsoft® Office Excel 2003. Finalmente, los datos fueron representados como un mapa de isodensidad usando el programa de representación gráfica (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU), en una escala de colores con 45 pasos diferentes (cada 125) con un rango de valores que va desde 0 hasta 3.500 células/mm².

Con este sistema de creación de mapas de isodensidades, los posibles errores que se pudieran producir en el cálculo de la densidad de las CGR debido a microfotografías ocupadas sólo parcialmente por tejido retiniano en el contorno de las retinas a plano se minimizó con el alto número de áreas de interés de pequeño tamaño.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaStat® 3.1 para Windows® (Systat Software, Inc, Richmond, CA, EEUU). Previamente todos los datos a comparar de cada grupo se almacenaron en hojas de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU). La significación estadística se situó en $p < 0,05$ para todos los test estadísticos.

Para comparar los datos cuantitativos de número total de CGR, se utilizó el test de Kruskal–Wallis para comparar más de 2 grupos y el test de Mann-Whitney para comparar los datos de 2 grupos. Además de los animales controles de este estudio, se utilizaron como control los animales controles obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio (Nadal-Nicolas y cols., 2009; Salinas-Navarros y cols., 2009a).

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (DEM).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

A continuación se presentan los resultados del análisis de la retina de los dos modelos de degeneración de fotorreceptores estudiados. Los resultados obtenidos fueron similares en ambos modelos, aunque se encontraron algunas pequeñas diferencias, como veremos a continuación.

4.1. DEGENERACIÓN DE LA RETINA TRAS FOTOTOXICIDAD.

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos para la rata albina SD tras la fotoexposición. Compararemos los resultados obtenidos en los animales controles con los obtenidos a diferentes tiempos tras la exposición a la luz, desde inmediatamente después de ésta hasta 12 meses mas tarde. La fotoexposición causa en estos animales, en primer lugar, una degeneración progresiva de los fotorreceptores, cuya severidad depende de la fuente de luz utilizada, la región de la retina estudiada y la dilatación pupilar. Secundariamente a esta pérdida de fotorreceptores, observamos una disminución en el número de CGR, causada por vasos sanguíneos que arrastran y comprimen sus axones.

4.1.1. RUPTURA DE LA BARRERA HEMATO-RETINIANA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD: EL ÁREA ARCIFORME.

El marcaje de los vasos sanguíneos con HRP en los montajes globales de las retinas, nos permitió documentar extravasación de esta sustancia en las retinas de algunos de los animales fotoexpuestos (ver más adelante).

Se realizó un grupo de animales control (n=5), a los que no se les dilató la pupila y que no fueron sometidos a fotoexposición. En estos animales albinos los vasos de la retina se encontraban marcados con peroxidasa y no se observaron alteraciones de la vascularización retiniana ni roturas de la barrera hemato-retiniana (Figura 4.1).

En los animales fotoexpuestos, pudimos observar una extravasación difusa de HRP con forma de arco inmediatamente TFE (n=18; Figura 4.2), que se mantenía hasta los 7 días TFE (n=9; Fig 4.3) y que ocurría en el mismo área de la retina, cuadrante superotemporal, en el que había sido descrita previamente en ratas pigmentadas (Figura 4.1; Marco-Gomariz y cols., 2006). El tamaño de este área arciforme de extravasación variaba entre animales pero, normalmente, era mayor en los animales procesados inmediatamente TFE, que en los procesados 7 días TFE.

En los animales procesados 1 mes (n=7; Figura 4.4) y 3 meses (n=6) TFE no se observaron signos de extravasación retiniana de HRP en ninguno de los dos ojos.

Este área de extravasación de HRP se observó tanto en los ojos dilatados como en los no dilatados. En conjunto, la extravasación ocurrió en 22 (41%) de las 54 retinas analizadas inmediatamente TFE (18 retinas izquierdas y 18 derechas) y 7 días TFE (9 retinas izquierdas y 9 derechas).

De las 22 retinas que mostraron extravasación, 16 eran del grupo analizado inmediatamente TFE y, de ellas, 13 eran retinas izquierdas (72% de las 18 analizadas a este tiempo) y 3 derechas (23% de las 18 analizadas a este tiempo). Sin embargo, a los 7 días solamente 3 retinas derechas y 3 izquierdas (18% del total analizado a 7 días) mostraban una extravasación masiva de HRP.

Como conclusión, podemos decir que en la rata albina se observa extravasación de HRP con mayor frecuencia en los ojos izquierdos (dilatados) que en los derechos (sin dilatar) y que esta extravasación ocurre muy pronto tras el periodo de fotoexposición.

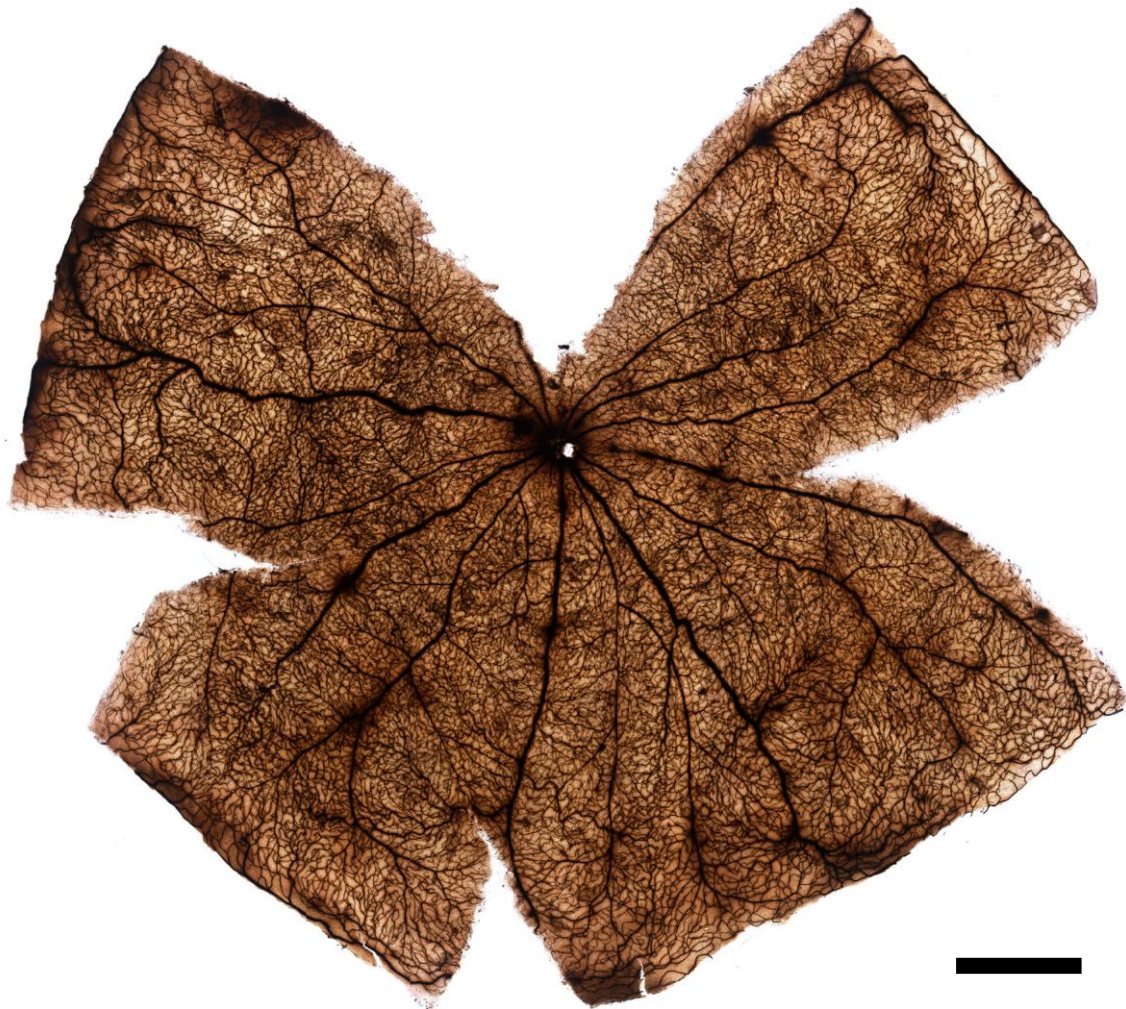


Figura 4.1. Marcaje de los vasos de la retina con peroxidasa de rábano (HRP).

Reconstrucción fotográfica de un montaje global de una retina izquierda representativa de una rata albina del grupo control. Se pueden observar los vasos retinianos marcados con peroxidasa. Barra= 1 mm.

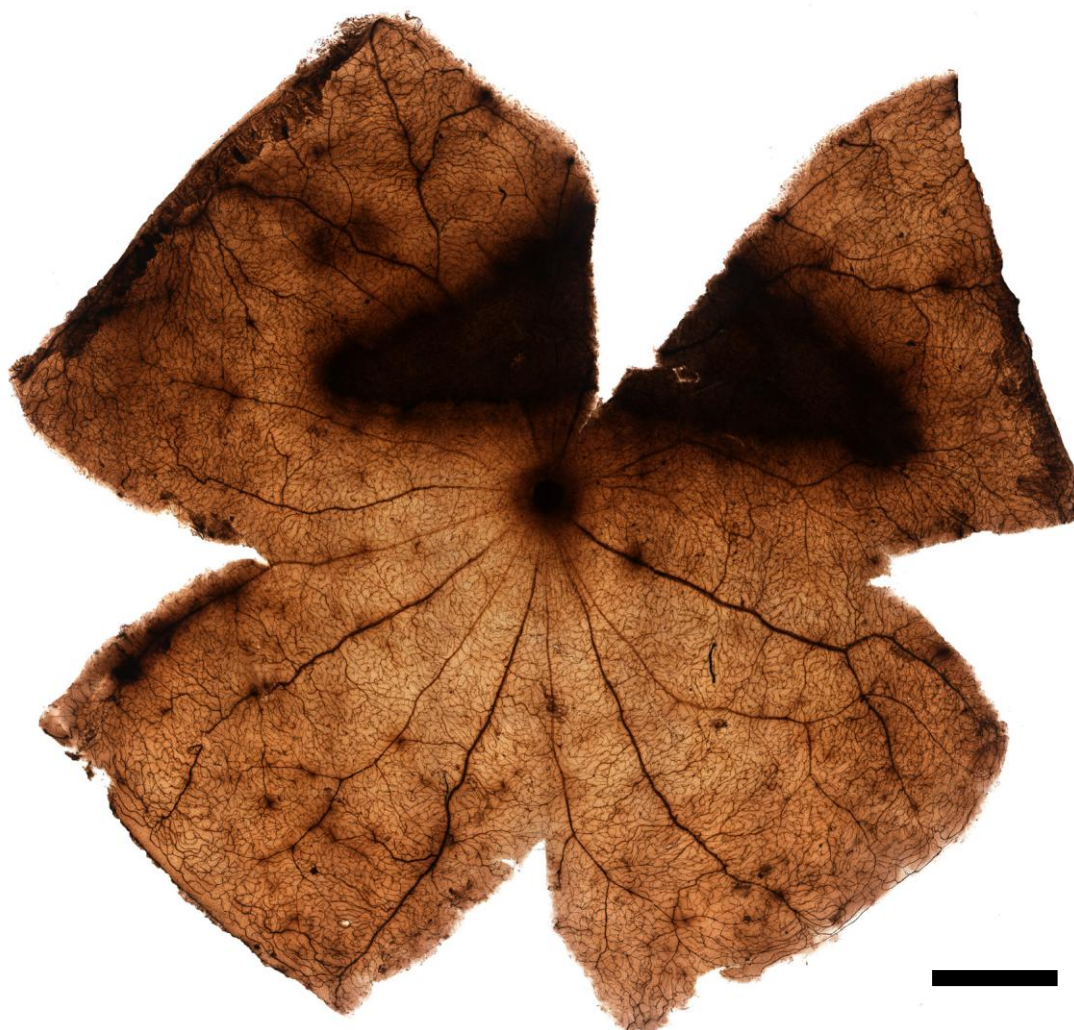


Figura 4.2. Extravasación difusa de HRP: el área arciforme.

Reconstrucción fotográfica de un montaje global de una retina izquierda representativa de un animal albino fotoexpuesto a 3000 luxes durante 48 horas y procesado inmediatamente después de la fotoexposición. Podemos observar en la retina superior un área con forma de arco más oscura debido a que en ella hay una extravasación masiva de peroxidasa. Este área es la que más precozmente se afecta por la fototoxicidad y se ha llamado área arciforme (Marco-Gomariz y cols., 2006). Barra = 1mm.

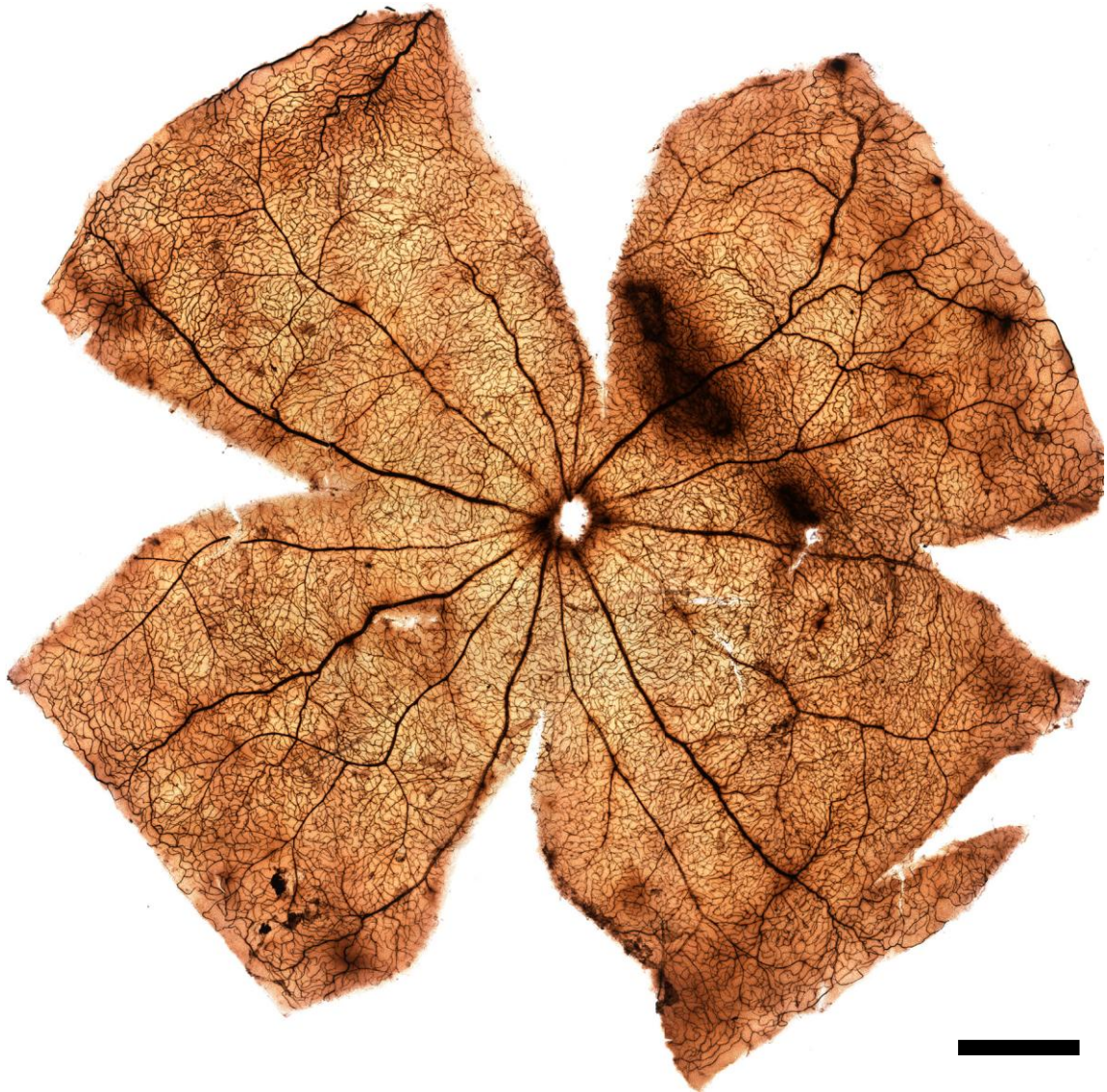


Figura 4.3. Área arciforme 7 días tras la exposición a la luz.

Reconstrucción fotográfica de un montaje global de una retina izquierda representativa de un animal albino fotoexpuesto a 3000 luxes durante 48 horas y procesado 7 días tras la fotoexposición. Podemos observar un área arciforme de extravasación de peroxidasa en la retina superior pero de tamaño reducido. Barra= 1 mm.

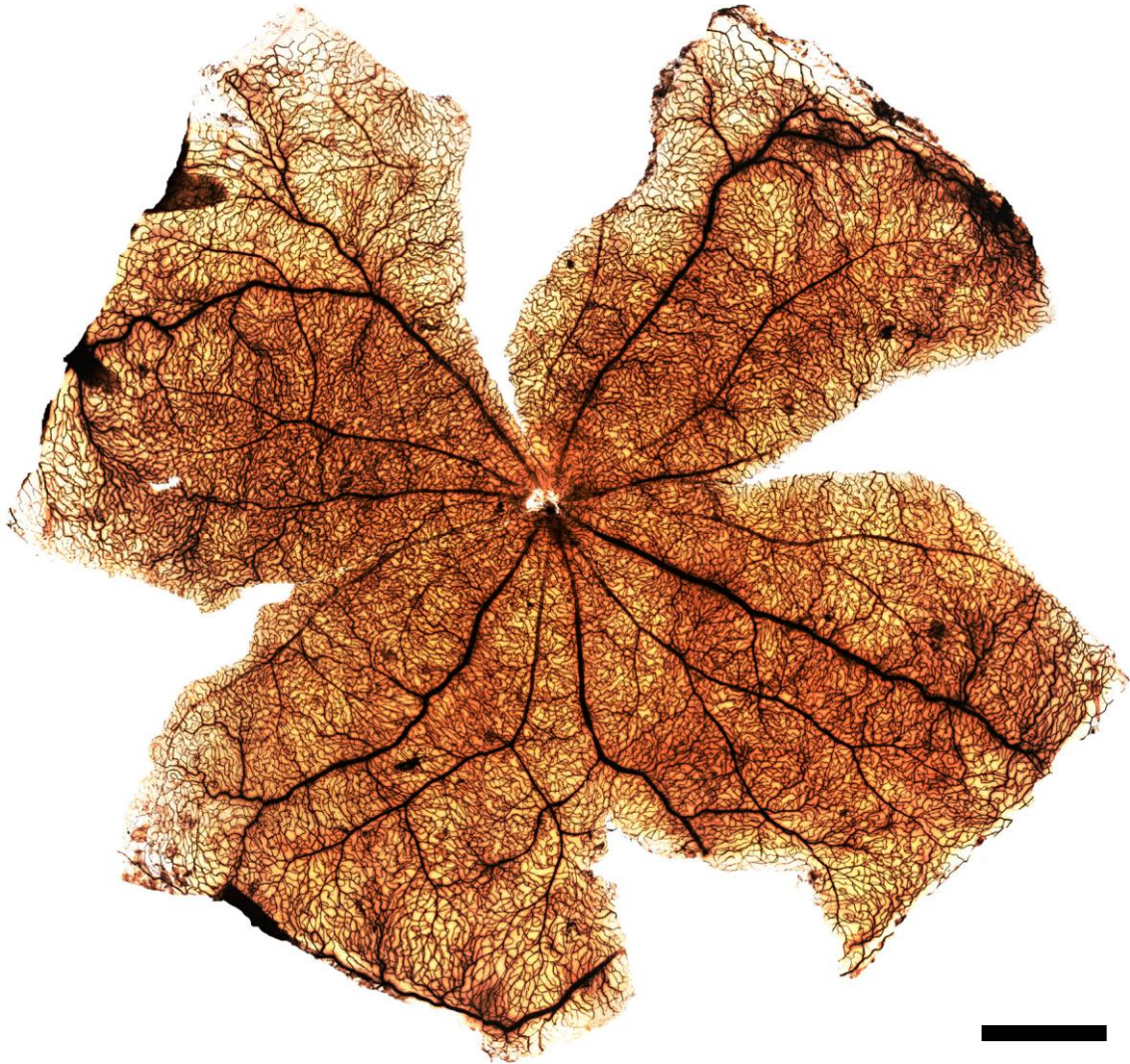


Figura 4.4. Un mes tras la exposición a la luz no se observa extravasación de peroxidasa.

Reconstrucción fotográfica de un montaje global de una retina izquierda representativa de un animal albino expuesto a 3000 luxes durante 48 horas y procesado 1 mes tras la fotoexposición. No se observa en esta retina extravasación de peroxidasa. Barra= 1 mm.

4.1.2. ESTUDIO TEMPORAL DE LA MUERTE DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.

4.1.2.1. Grupo Control (sin fotoexposición).

En las secciones transversales, tanto de las retinas derechas como izquierdas de los animales del grupo control, se observan todas las capas de la retina sin alteraciones apreciables (Figura 4.5). La CNE, la de mayor interés para nuestro estudio ya que es en la que se encuentran los núcleos de los fotorreceptores, tenía un grosor medio de 10-12 núcleos y la CNI, en la que se encuentran los núcleos de las células bipolares, amacrinas, horizontales y Müller, mostró un grosor medio de 3-4 núcleos.

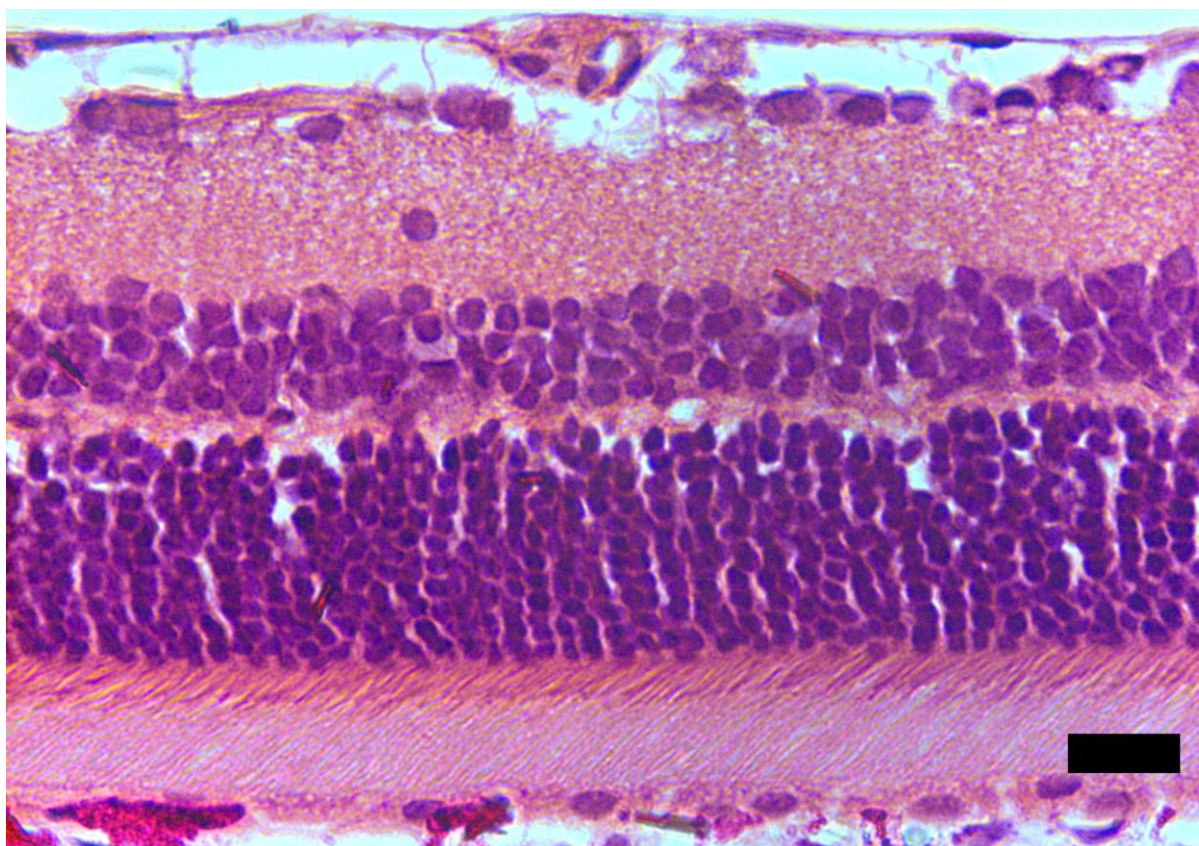


Figura 4.5. Retina control teñida con hematoxilina y eosina.

Microfotografía de una sección transversal de una retina izquierda de un animal del grupo control, tomada en la región dorsal media de la retina, zona donde generalmente se encuentra la extravasación masiva de peroxidasa en las retinas montadas a plano de los animales albinos fotoexpuestos durante 48 horas. Se puede observar que el grosor de la capa nuclear externa en esta región es de 10-12 núcleos. Barra= 100 μ m.

4.1.2.2. Animales fotoexpuestos en el “túnel de luz”.

En los animales expuestos en el “túnel de luz”, se observó inmediatamente tras la fotoexposición un adelgazamiento de la CNE en la región dorsal media superior de la retina. Esta zona coincide con la región de la retina donde ocurría la extravasación masiva de HRP (ver Figura 4.2). A este nivel, el grosor medio de la CNE era de 4-6 núcleos en los ojos izquierdos (Figura 4.6A) y de 5-7 núcleos en los ojos derechos de los animales fotoexpuestos. El resto de la retina se veía también afectada en los ojos izquierdos, aunque en menor medida, siendo el grosor medio de la CNE en otras regiones de la retina de 6-8 núcleos (Figura 4.6B). En los ojos derechos el resto de la retina aparecía con una CNE de grosor normal (10-12 núcleos).

Siete días tras la fotoexposición se observó, en ambos ojos, un adelgazamiento todavía mayor de la CNE en toda la extensión de la retina, siendo este adelgazamiento más severo en la zona dorsal media de la retina, región donde la CNE casi desapareció por completo en los ojos izquierdos. Así la CNE tenía un grosor medio de 0-1 núcleos en la región dorsal media en los ojos izquierdos (Figura 4.6C) y de 1-2 núcleos en los ojos derechos.

Un mes tras la fotoexposición, la pérdida de fotorreceptores era similar en ambos ojos (derechos e izquierdos), la CPE casi había desaparecido y la CNE estaba prácticamente ausente en la región dorsal media de la retina con un grosor de 0-1 núcleos (Figura 4.6E). En este periodo, en ambos ojos, la CNE en la zona ventral de la retina tenía un grosor de 1-3 núcleos (Figura 4.6F).

Tres meses tras la fotoexposición prácticamente no se observaron núcleos en la CNE, apenas una hilera de fotorreceptores en la zona ventral, y se encontró un adelgazamiento muy severo de la práctica totalidad de las capas de la retina, tanto en la retina dorsal como en la ventral (Tabla 4.1; Figura 4.6G,H).

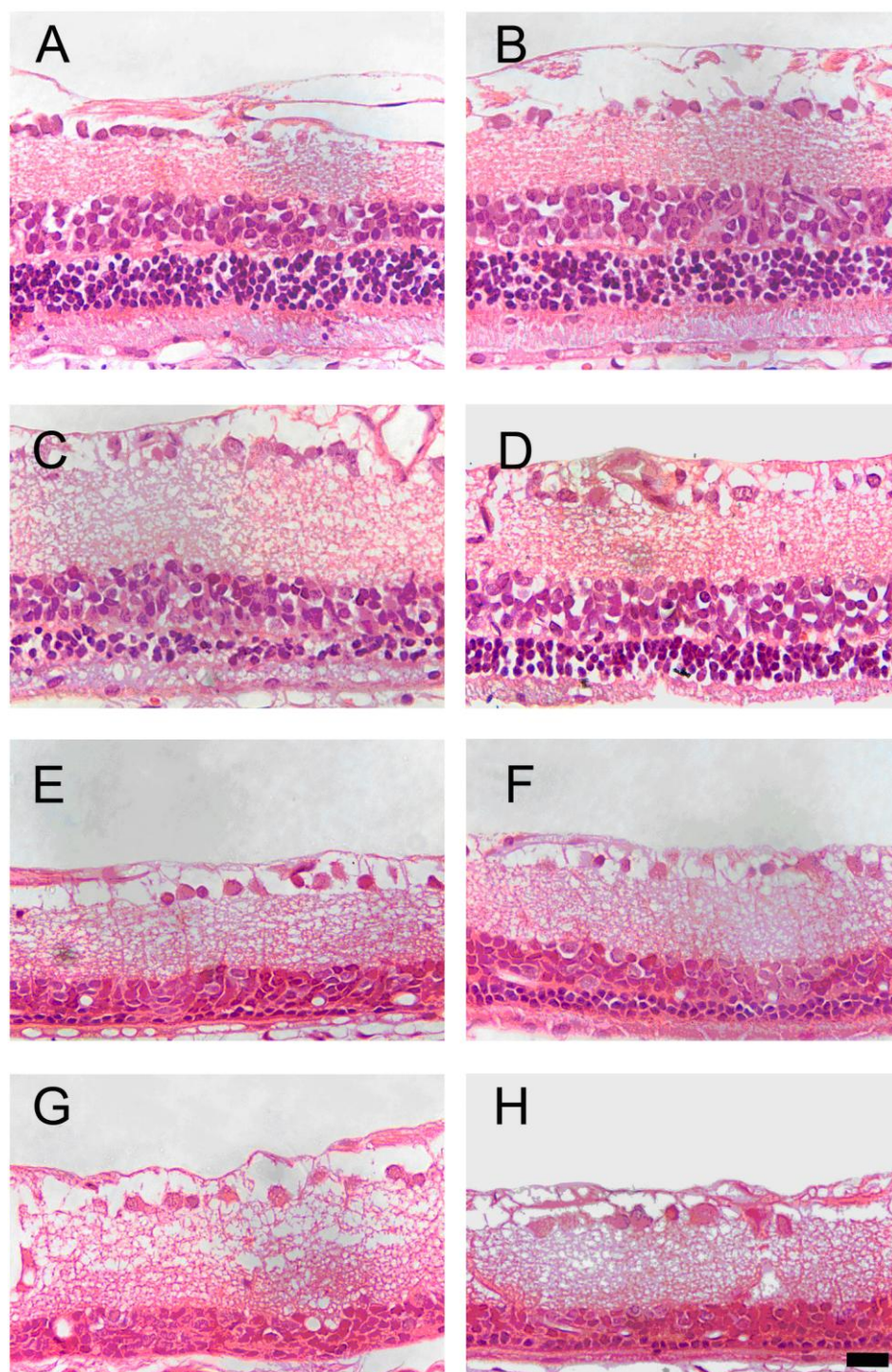


Figura 4.6. Degeneración de la retina tras la fotoexposición en el “túnel de luz”.

Microfotografías de secciones de la retina teñidas con hematoxilina y eosina de ojos izquierdos representativos del grupo de animales que fueron fotoexpuestos en el túnel de luz y procesados inmediatamente (A,B), 7 días (C,D), 1 mes (E,F) y 3 meses (G,H) tras la fotoexposición. La columna de la izquierda corresponde a secciones de la retina dorsal, el área que muestra extravasación de peroxidasa en los montajes globales, mientras que la columna de la derecha corresponde a secciones de la retina ventral. Barra= 100 μ m.

4.1.2.3. Animales fotoexpuestos con tubos de luz en el techo.

En los animales expuestos a los tubos de luz en el techo, se observó inmediatamente tras la fotoexposición un adelgazamiento de la CNE en la región dorsal media superior de la retina, aunque este adelgazamiento fue menor que el observado para los animales expuestos en el “túnel de luz”. A este nivel, el grosor medio de la CNE era de 5-7 núcleos en los ojos izquierdos (Figura 4.7A) y de 6-8 núcleos en los ojos derechos. En el resto de la retina se observaba un grosor normal de la CNE tanto en los ojos izquierdos como en los derechos (grosor medio 10-12 núcleos; Figura 4.7B).

Siete días tras la fotoexposición se observó, en ambos ojos, un adelgazamiento de la CNE en toda la extensión de la retina, siendo este adelgazamiento más severo en la zona dorsal media de la retina. Así la CNE tenía un grosor medio de 1-2 núcleos en la región que coincidiría con el área arciforme (ver Figura 4.2) en los ojos izquierdos (Figura 4.7C), y de 1-3 núcleos en los ojos derechos. La anatomía de estas retinas derechas era muy similar a la anteriormente descrita en el modelo del “túnel de luz”.

Un mes tras la fotoexposición la CNE estaba aún mas adelgazada, y tenía un grosor en la región dorsal media de la retina de 0-2 núcleos, y en el resto de la retina de 1-3 núcleos en ambos ojos (Figura 4.7E,F).

Tres meses tras la fotoexposición, no se observaron prácticamente núcleos en la CNE, apenas una hilera de fotorreceptores en la zona ventral, y se encontró un adelgazamiento muy severo de la práctica totalidad de las capas de la retina, similar al descrito anteriormente para los animales expuestos al “túnel de luz” (Tabla 4.1; Figura 4.7G,H).

En conclusión, la dilatación pupilar no es necesaria para causar la pérdida de fotorreceptores por fototoxicidad en la retina de la rata albina. Sin embargo, esta pérdida es más rápida cuando se dilata la pupila del animal y cuando los animales se fotoexponen en el “túnel de luz”.

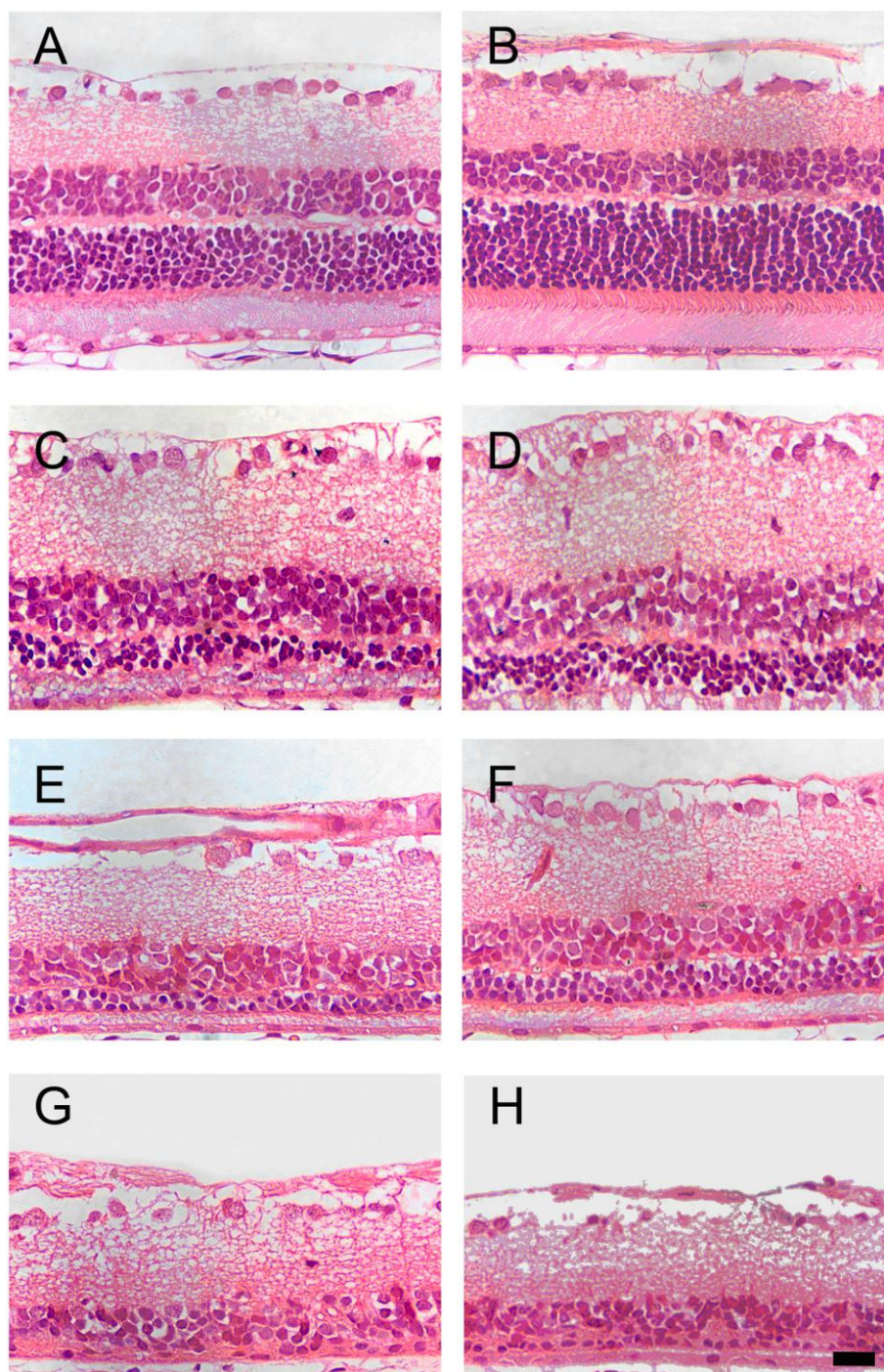


Figura 4.7. Degeneración de la retina tras la fotoexposición con tubos de luz en el techo.

Microfotografías de secciones teñidas con hematoxilina y eosina de unos ojos izquierdos representativos del grupo de animales que fueron fotoexpuestos con tubos de luz en el techo y procesados inmediatamente (A,B), 7 días (C,D), 1 mes (E,F) y 3 meses (G,H) tras la fotoexposición. La columna de la izquierda corresponde a secciones de la retina dorsal, el área que muestra extravasación de peroxidasa en los montajes globales, mientras que la columna de la derecha corresponde a secciones de la retina ventral. Barra= 100 μ m.

4.1.2.4. Degeneración de la retina a partir de los 6 meses tras la fotoexposición.

A partir de los 6 meses TFE, se comprobó como el grado de desorganización retiniana continuaba avanzando: la CNE había desaparecido y se observaba una CNI bastante reducida. El resto de las capas de la retina (CPI, CCG y CFN) también se veían afectadas (Tabla 4.1; Figura 4.8), además ya no se advirtieron diferencias entre las retinas de los animales fotoexpuestos a las distintas fuentes de luz.

A partir de este tiempo tras la fotoexposición, se empezaba a observar la aparición de complejos vasculares subretinianos situados entre el EPR y la membrana de Bruch (Tabla 4.1; Figura 4.8A,B,D). En algunas ocasiones, se veía que estos vasos subretinianos estaban conectados con vasos verticales que venían desde el plexo vascular de la retina interna y que estaban rodeados de células del EPR que migraban a lo largo de su superficie (Figura 4.8A-D; 4.14). Estos vasos verticales, eran vasos de retina interna que eran arrastrados hacia los vasos subretinianos. La frecuencia de aparición y la cantidad de estos vasos aumentaba conforme aumentaba el tiempo TFE. Se ha descrito que estos vasos arrastran los axones de las CGR (Figura 4.8, 4.14; Marco-Gomariz y cols., 2006a; Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003) dañándolos y causando la muerte de las CGR (ver más adelante).

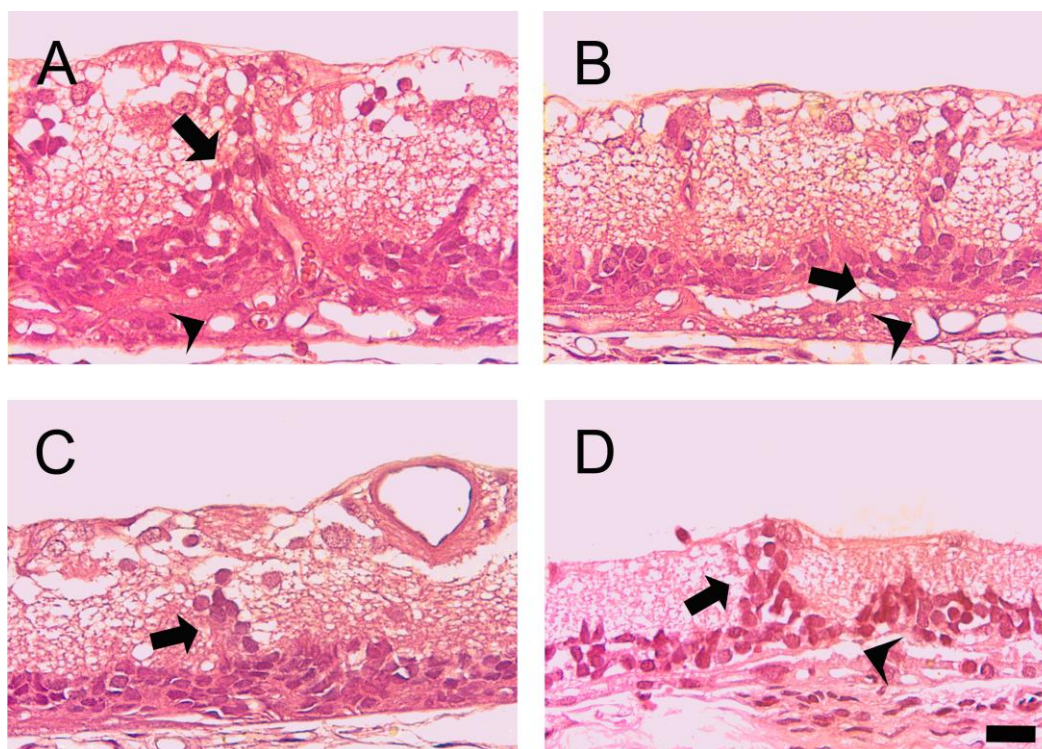


Figura 4.8. Degeneración de la retina tras la pérdida de los fotorreceptores retinianos.

Microfotografías de secciones teñidas con hematoxilina&eosina de ojos representativos del grupo de animales que fueron fotoexpuestos y procesados 6 (A), 9 (B,C) y 12 (D) meses tras la fotoexposición. Se observan complejos vasculares (puntas de flecha) en el espacio subretiniano conectados con vasos verticales que están cubiertos por células del EPR (flechas). Barra= 100 μ m.

	Túnel de luz				Tubos en el techo			
	Retina dorsal		Retina ventral		Retina dorsal		Retina ventral	
Tiempo TFE	Ojo izquierdo (dilatado)	Ojo derecho (sin dilatar)	Ojo izquierdo (dilatado)	Ojo derecho (sin dilatar)	Ojo izquierdo (dilatado)	Ojo derecho (sin dilatar)	Ojo izquierdo (dilatado)	Ojo derecho (sin dilatar)
0 h	4-6	5-7	6-8	10-12	5-7	6-8	10-12	10-12
1 semana	0-1	1-2	2-4	3-5	1-2	1-3	3-5	3-6
1 mes	CPE reducida, CNE prácticamente ausente		CPE reducida, CNE:1-3 núcleos		CPE reducida, CNE: 0-2 núcleos		CPE reducida, CNE: 1-3 núcleos	
3 meses	CNE prácticamente ausente, CPE prácticamente ausente, CNI reducida: 2-3 núcleos.							
6 meses o más	Solo queda una fina CNI: 1-2 núcleos, la CCG y la CFN. Comienzan a aparecer complejos vasculares.							

Tabla 4.1. Curso temporal de la degeneración de la retina tras la fotoexposición en función de la fuente de luz y la dilatación pupilar.

Los animales control mostraron una CNE de un grosor de entre 12-14 núcleos y una CNI de entre 3-4 núcleos. Los números en las filas de 0 horas y 1 semana corresponden al grosor en núcleos de la CNE.

4.1.2.5. Detección de los núcleos en apoptosis mediante la técnica TUNEL.

Para comprobar si la pérdida de fotorreceptores observada en las secciones transversales era debida a apoptosis, se utilizó la técnica de TUNEL (ver apartado 3.6.4). En las retinas control no se observaron núcleos TUNEL positivos. En las retinas de los animales experimentales se observó la presencia de núcleos TUNEL positivos (detectados con fluorescencia roja). Esta señal roja siempre colocalizaba con núcleos teñidos con DAPI, lo que aseguraba que eran núcleos en apoptosis. Se observaron núcleos en apoptosis en los animales procesados hasta 7 días TFE (Figura 4.9A-D). Un mes TFE (Figura 4.9E-F) ya no se encontraron núcleos TUNEL positivos, a pesar de que según lo observado en las secciones teñidas con hematoxilina y eosina, los fotorreceptores continúan degenerando hasta al menos 3 meses TFE.

Los núcleos TUNEL positivos se observaron tan sólo en la CNE de la retina y eran más abundantes en la retina dorsal media (Figura 4.9A,C), zona en la que se sitúa el área arciforme de

extravasación de peroxidasa, que en la retina ventral, corroborando así la mayor pérdida de fotorreceptores en la retina dorsal observada en esta zona en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

El número de núcleos TUNEL positivos fue cualitativamente similar en las retinas izquierdas (ojos dilatados) y las derechas (ojos no dilatados) de cada animal en los diferentes tiempos de estudio. Sin embargo, el número de núcleos TUNEL positivos variaba con el tiempo de supervivencia tras la fotoexposición, ya que eran más abundantes inmediatamente TFE (Figura 4.9A,B) que a los 7 días TFE, aunque a este tiempo de estudio continuaba habiendo una mayor cantidad de núcleos apoptóticos en la región dorsal media de la retina que en el resto de las regiones de la retina (Figura 4.9C,D).

Como conclusión de esta parte del estudio podemos decir que la fotoexposición a la luz de ratas albinas produce muerte de fotorreceptores que se debe, al menos en parte, a apoptosis.

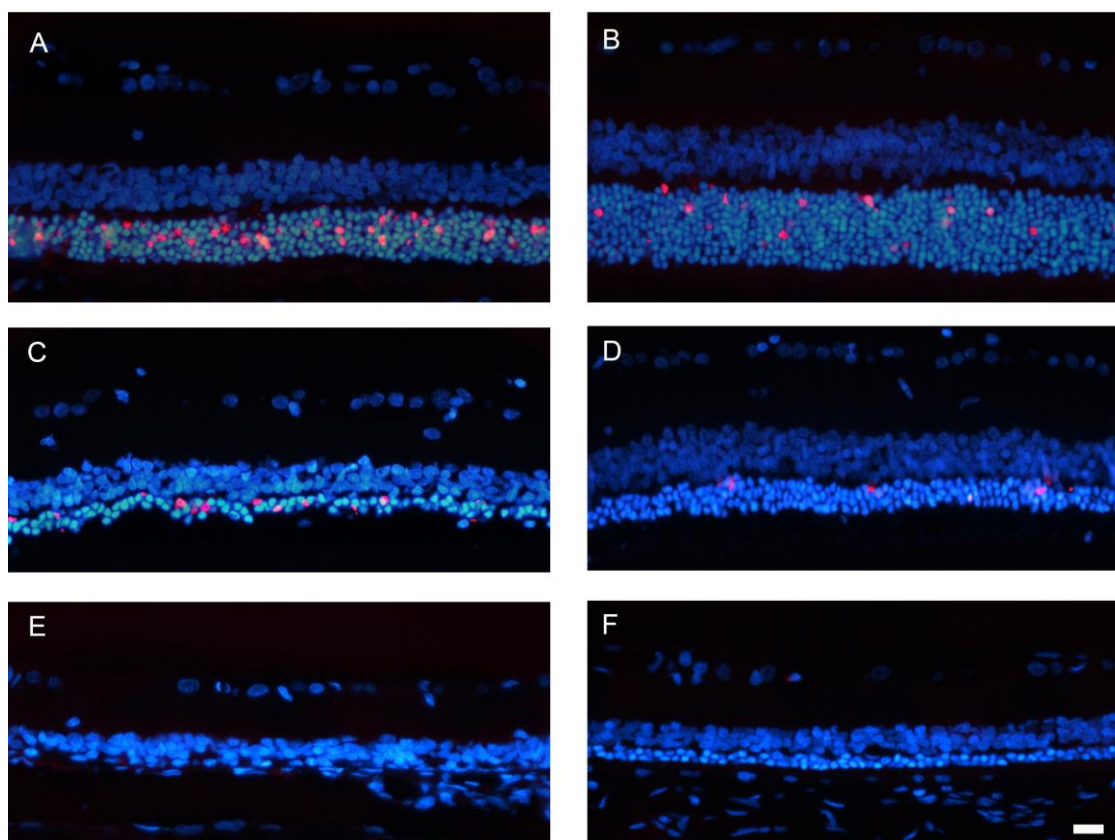


Figura 4.9. La fotoexposición induce la apoptosis de los fotorreceptores.

Microfotografías de secciones transversales de retina dorsal (columna izquierda) y retina ventral (columna derecha) de animales expuestos a la luz y procesados inmediatamente (A, B), 7 días (C, D) y 1 mes (E, F) TFE en las que se ha realizado la técnica de TUNEL para detectar núcleos en apoptosis (rojo). Se contratiñeron todos los núcleos con DAPI (azul). Inmediatamente TFE, el número de núcleos TUNEL positivos era muy abundante en la retina dorsal (A), mientras que en la ventral solo se observaron algunos núcleos TUNEL positivos aislados. Siete días TFE, el número de núcleos TUNEL positivos ha disminuido, aunque continúa habiendo una mayor cantidad de éstos en la zona dorsal de la retina (C) que en la ventral (D). Un mes TFE (E, F) no se observaron núcleos TUNEL positivos. Barra= 100 μ m.

4.1.3. ESTUDIO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS EN LA CAPA DE FIBRAS DE LA RETINA TRAS LA DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.

4.1.3.1. Aspecto de las retinas control.

En las retinas control, correspondientes a animales no fotoexpuestos, se apreciaban los axones pNFH positivos mostrando una trayectoria rectilínea, convergente y centrípeta hacia el disco óptico (Figura 4.10, 4.11), tal y como ha sido descrito previamente por nuestro grupo (Parrilla-Reverter y cols., 2009b). El marcaje de pNFH se observaba en los axones de las CGR y era más intenso en las porciones más centrales de la retina ya que esta isoforma se expresa en axones maduros (Parrilla-Reverter y cols., 2009b). En retinas control esta proteína no se expresa en los somas de las CGR ni en sus prolongaciones dendríticas (Figura 4.10).

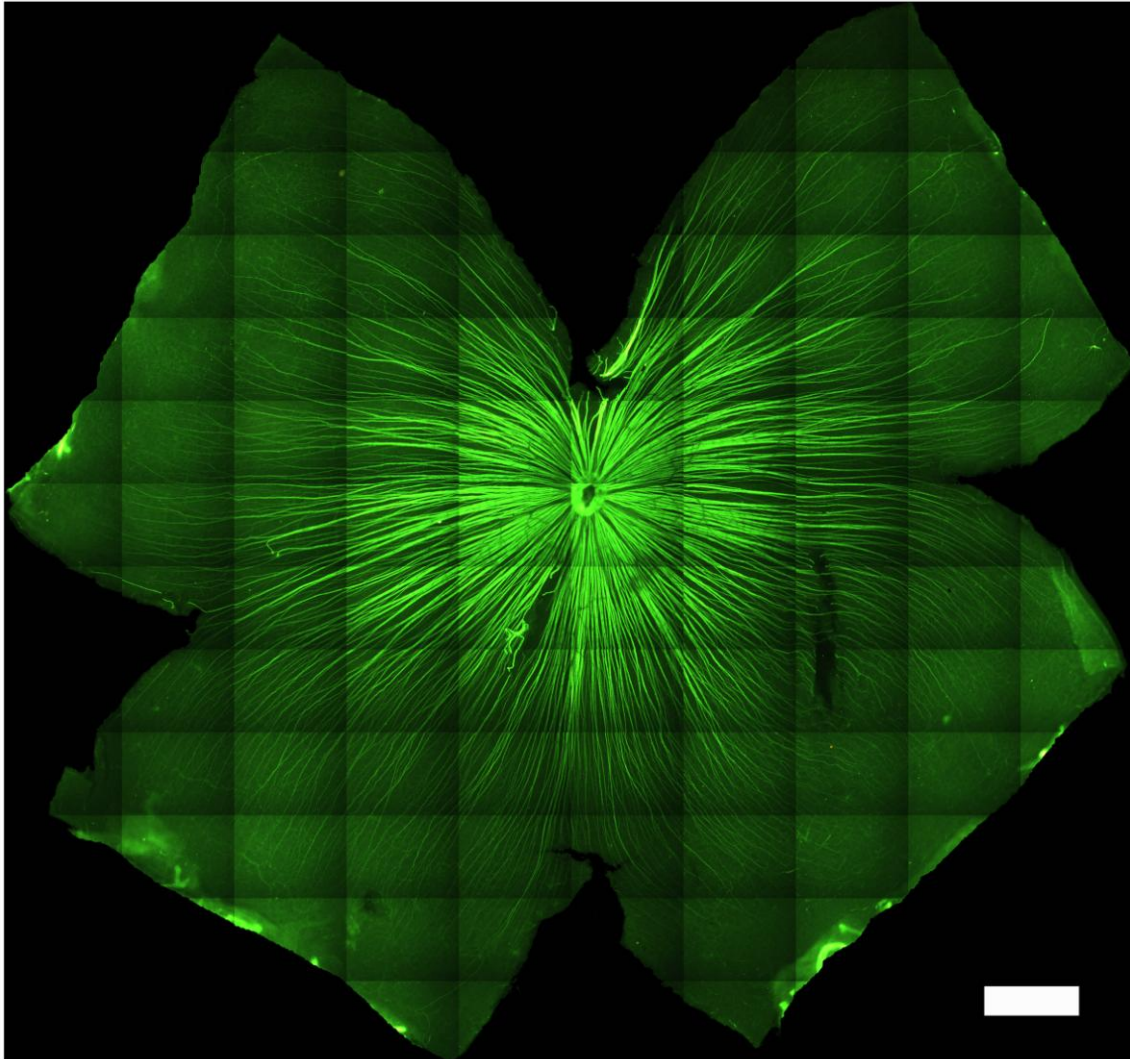


Figura 4.10. Análisis de los axones de las células ganglionares de la retina.

Reconstrucción fotográfica obtenida en el microscopio de fluorescencia de un montaje global de una retina de un animal control, tras la reacción de inmunofluorescencia con el anticuerpo RT97 que reconoce la subunidad fosforilada de alto peso molecular, del triplete de los neurofilamentos (pNFH). En una típica retina control, esta isoforma de los neurofilamentos se expresa en los axones de las células ganglionares de la retina, en concreto, en la porción madura (estabilizada). Barra= 1 mm.

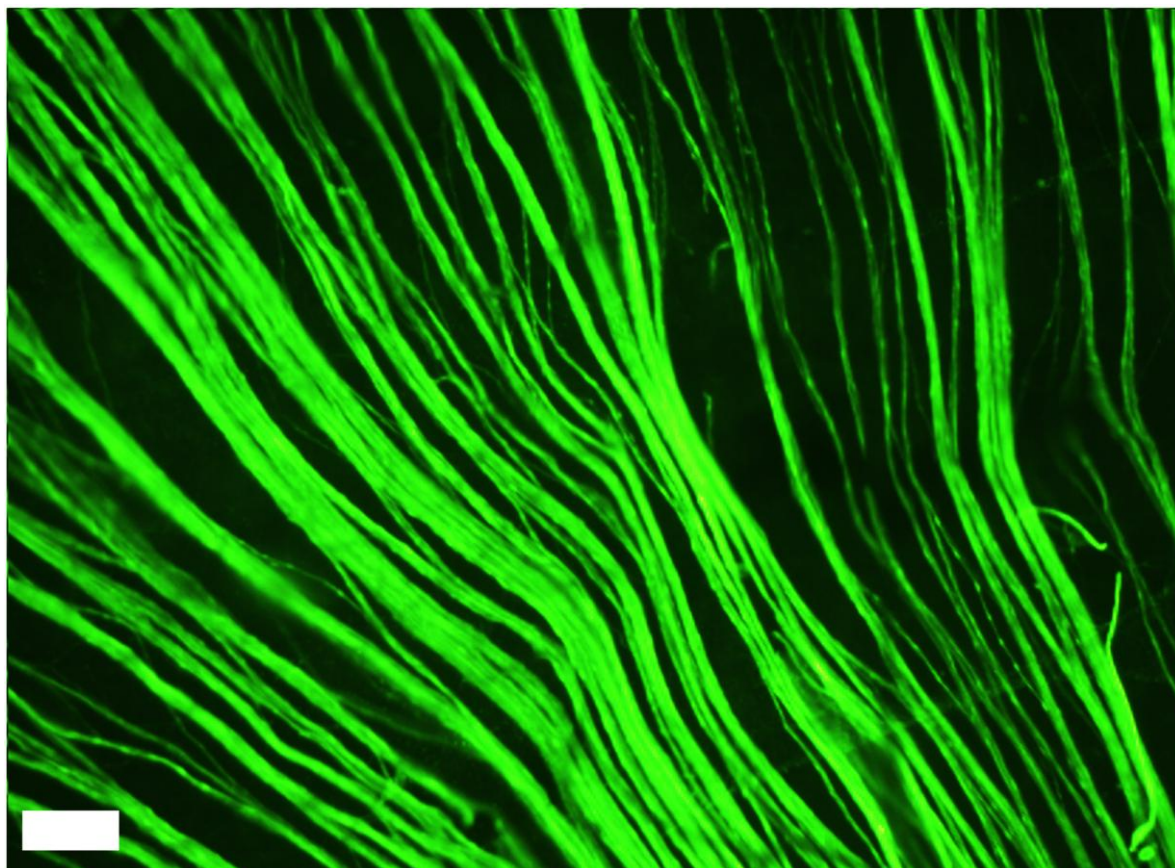


Figura 4.11. Detalle de los axones de las células ganglionares de la retina en una retina control.

Microfotografía tomada en el microscopio de fluorescencia (10x) de una retina control en la que se han inmunodetectado los neurofilamentos pNFH. Se observa la trayectoria rectilínea normal de los axones de las células ganglionares de la retina. Barra= 50 μ m.

4.1.3.2. Cambios en la capa de fibras tras la degeneración de los fotorreceptores.

La trayectoria lineal y el patrón de expresión de pNFH observado en las retinas controles se mantuvo en las retinas procesadas a tiempos cortos TFE. Sin embargo, aunque al observar las retinas de los animales procesados 3 meses o más TFE con objetivos de pocos aumentos, éstas mostraban una densidad axonal similar a la de las retinas controles (Figura 4.12 A,B), si se observa con objetivos de mayor aumento y por tanto con más detalle, podían advertirse algunos cambios en zonas concretas de la retina. En primer lugar las trayectorias de los axones pNFH positivos estaban distorsionadas, mostrando áreas de estrangulamiento axonal (Figura 4.12 C,D). Estos estrangulamientos eran el resultado de compresiones axonales causadas por el desplazamiento de los vasos de retina interna que cruzan la CFN (Figura 4.14; Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a). Estas zonas de compresión axonal se observaban desde los 3 meses TFE, y eran más frecuentes alrededor del área arciforme.

Con el tiempo, estas compresiones axonales se extendían por toda la retina y eran cada vez más frecuentes y severas (Figuras 4.13, 4.15). Seis meses TFE aparecían “bulbos axonales”, por encima y por debajo de las compresiones axonales, lo que sugiere una interrupción del transporte axonal. Así, lo que en un principio era un desplazamiento de los axones hacia retina más externa, se transformaba posteriormente, una vez vencido el límite de flexibilidad de estos axones, en compresión axonal. Además en estas retinas se observó cómo algunos cuerpos de CGR y sus dendritas más próximas expresaban pNFH (Figura 4.12 E, 4.15 A-C,E). Este es un patrón de expresión anormal que ha sido descrito como una señal de degeneración neuronal (Parrilla-Reverter y cols., 2009b).

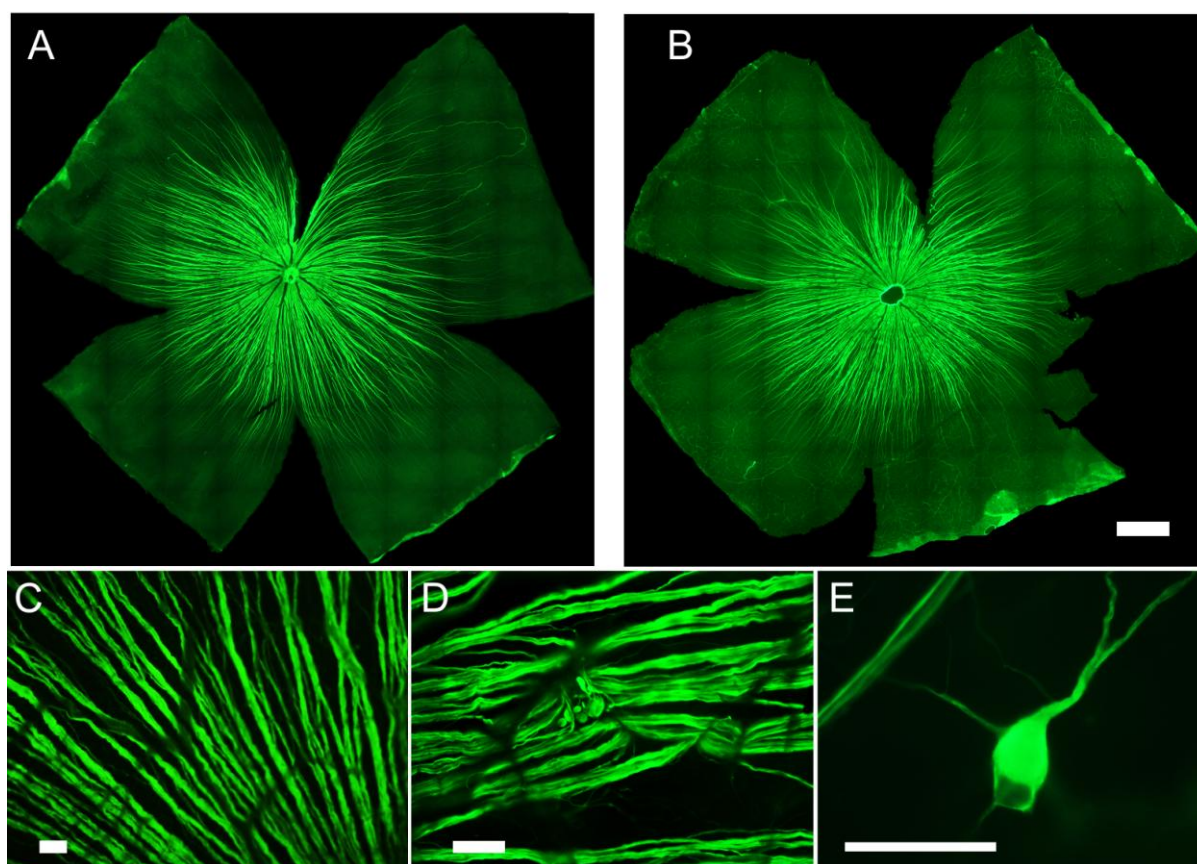


Figura 4.12. Alteraciones de la capa de fibras nerviosas en los 6 primeros meses tras la degeneración de fotorreceptores por fototoxicidad.

Las fotografías superiores (A,B) corresponden a dos reconstrucciones fotográficas obtenidas con el microscopio de fluorescencia de los montajes globales de una retina de un animal procesado 3 meses TFE (A) y de otro animal procesado 6 meses TFE (B), tras la inmunodetección de los pNFH. Las fotografías inferiores, corresponden a microfotografías tomadas al microscopio de fluorescencia a diferentes aumentos, de una retina de unos animales procesados 3 meses (C) y 6 meses (D,E) TFE. En ellas podemos observar como las trayectorias de los axones pNFH positivos aparecen distorsionadas (D) y como ya a los 6 meses TFE algunos cuerpos de CGR y sus dendritas más próximas comienzan a mostrarse pNFH positivas (E). Barra (A,B)= 1 mm. Barra (C-E)= 50 μ m.

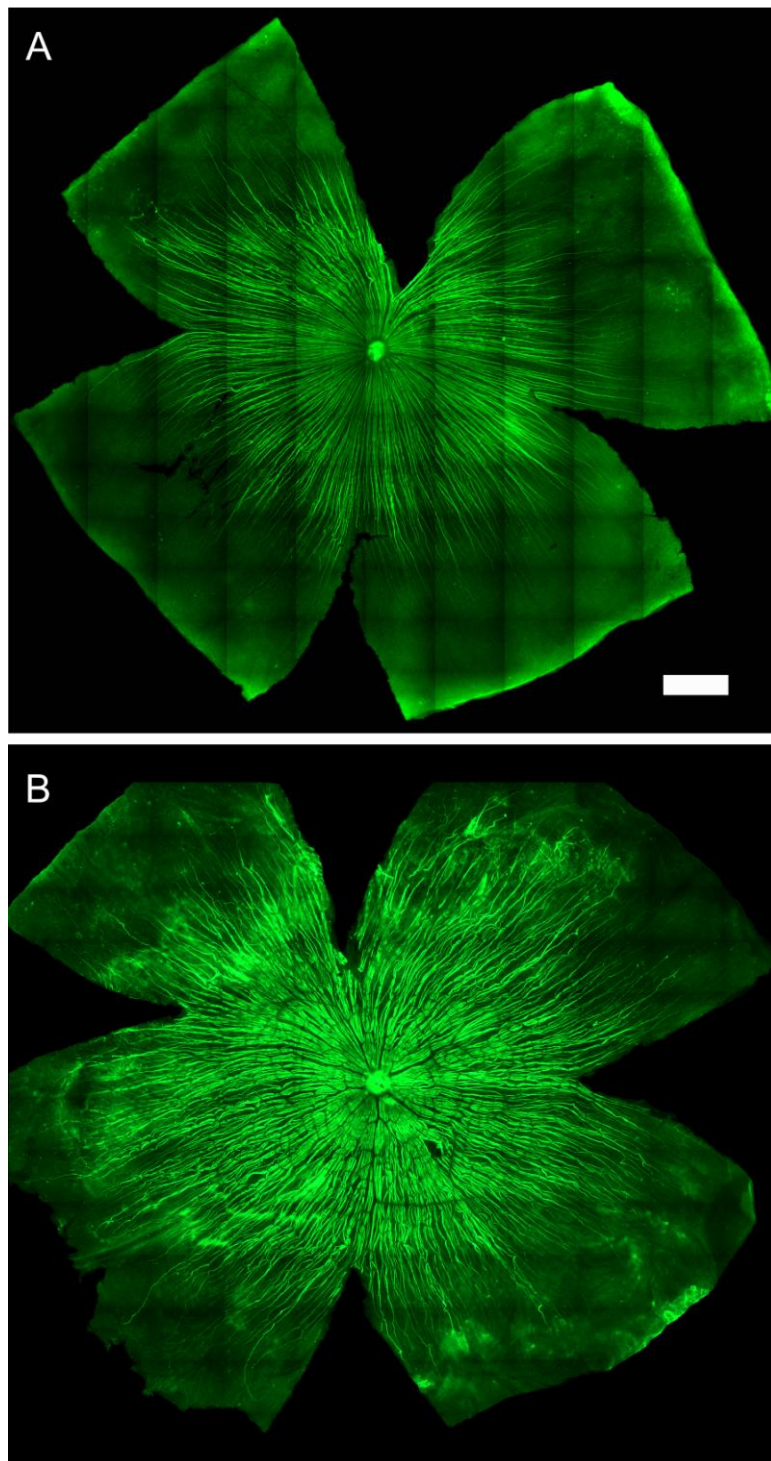


Figura 4.13. Alteraciones de la capa de fibras nerviosas de 9 a 12 meses tras la fotoexposición.

Reconstrucciones fotográficas obtenidas con el microscopio de fluorescencia de dos montajes globales de dos retinas tras la inmunodetección de los pNFH. La superior corresponde a un animal procesado 9 meses TFE (A) y la inferior a un animal procesado 12 meses TFE (B). Se observa como las compresiones de los axones aumentan con el tiempo tras la fotoexposición. Barra= 1 mm.

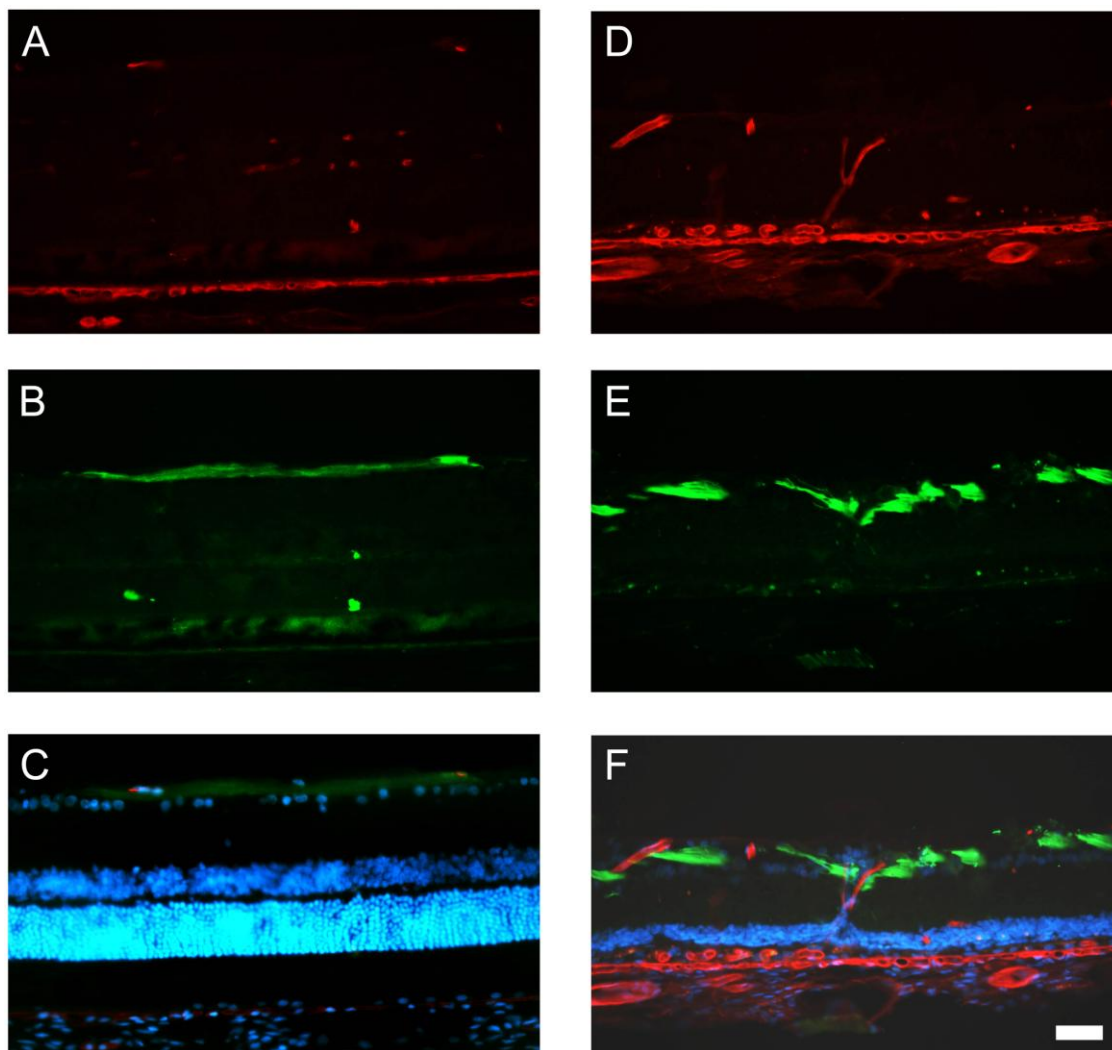


Figura 4.14. Los axones de las células ganglionares de la retina son arrastrados por vasos retinianos desplazados.

Microfotografías de secciones transversales de la retina representativas en las que se han inmunodetectado los vasos sanguíneos con un anticuerpo anti-RECA (fila superior; rojo) y los axones de las células ganglionares con un anticuerpo anti-NFH (fila intermedia; verde) y teñido todos los núcleos con DAPI (fila inferior; azul). La columna de la izquierda (A-C) muestra tres imágenes tomadas con diferentes filtros de fluorescencia de la misma sección de la retina una rata control SD de 2 meses de edad. La columna de la derecha (D-F) muestra tres imágenes tomadas con diferentes filtros de fluorescencia de la misma sección de la retina una rata SD 12 meses TFE. En la retina control no se observan desplazamientos axonales (A-C), mientras que en la retina analizada 12 meses TFE se observa que los vasos que cruzan verticalmente la retina y conectan el plexo vascular retiniano interno con complejos vasculares subretinianos, arrastran a los axones de las CGR (E). También se observa cómo las células del EPR migran para cubrir estos vasos retinianos (F). Barra= 100 μ m.

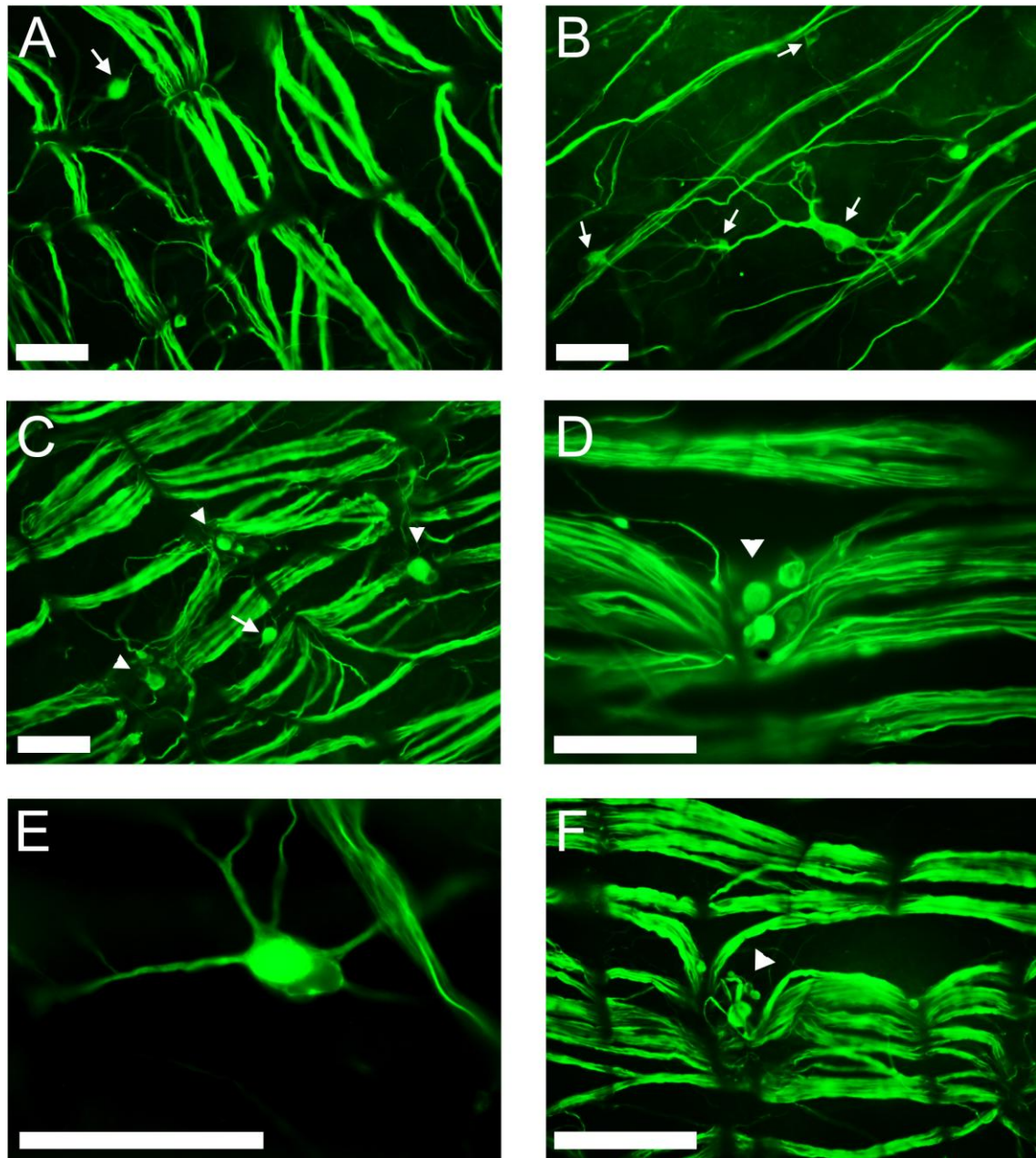


Figura 4.15. Detalles de las alteraciones de la capa de fibras nerviosas tras la degeneración de fotorreceptores inducida por fototoxicidad.

Microfotografías tomadas al microscopio de fluorescencia a diferentes aumentos de montajes globales de retinas de animales experimentales examinadas a los 9 (A, B, C) y 12 meses (D, E, F) TFE. Podemos observar las compresiones axonales que realizan los vasos de la retina (A, C, D, F), bulbos axonales (puntas de flecha) que revelan una detención del transporte axonal y somas de CGR que expresan pNFH (flechas, E). Barra= 50 μ m.

4.1.4. ESTUDIO TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS LA DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.

4.1.4.1. Estudio de la población de células ganglionares de la retina en animales control.

Se realizaron 2 grupos de animales control (SD) de diferentes edades, concretamente un grupo de 2 meses de edad, coincidiendo con la menor edad de los animales utilizados en el estudio y otro grupo de 625 días de edad (aproximadamente 20 meses de edad), algo mayores que los animales de mayor edad utilizados para el estudio. En los dos grupos las CGR fueron marcadas con FG y posteriormente inmunodetectadas con Brn3a. Con estos dos grupos pretendíamos comprobar si había diferencias entre la población de CGR que tiene transporte retrógrado activo funcional (FG⁺) y la población total de CGR.

En estos grupos de ratas SD control el número medio de CGR trazadas con FG fue de 81.381 ± 3.722 (Media \pm DEM) en los animales de 2 meses de edad (Figura 4.16 A,B; Tabla 4.1) y de 81.871 ± 4.040 en los animales procesados a los 20 meses de edad (Figura 4.17; Tabla 4.1). Estos valores medios de población de CGR fueron similares a los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio realizados en ratas SD (81.486 ± 4.340 ; n=37; Salinas-Navarro y cols., 2009a) e indicaban que el número medio de CGR que transportan retrógradamente el FG no variaba con la edad, al menos durante los primeros 20 meses de vida.

La inmunodetección de CGR con Brn3a reveló un número medio de CGR de la retina de 85.997 ± 3.562 en los animales de 2 meses de edad (Figura 4.16 C,D; Tabla 4.2) y de 82.810 ± 3.544 en los animales procesados a los 20 meses de edad (Figura 4.17; Tabla 4.2). Estos valores fueron similares a los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio en ratas SD (84.682 ± 7.601 ; n=14; Nadal-Nicolás y cols., 2009) y confirmaban que la población total de CGR no sufría variaciones con la edad en las ratas SD utilizadas en este estudio.

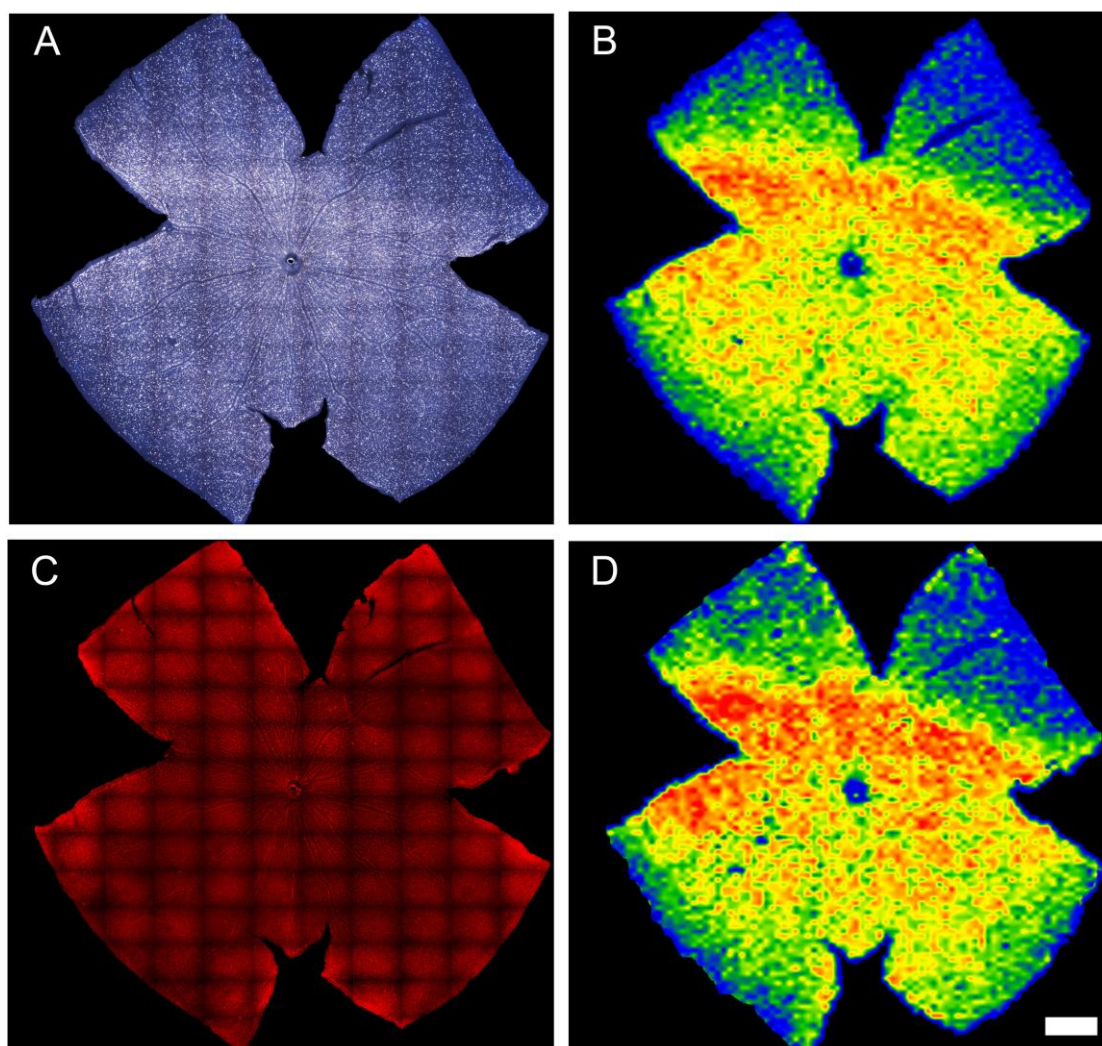


Figura 4.16. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales control de 2 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de la misma retina de una animal SD control de 2 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las CGR trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de CGR con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

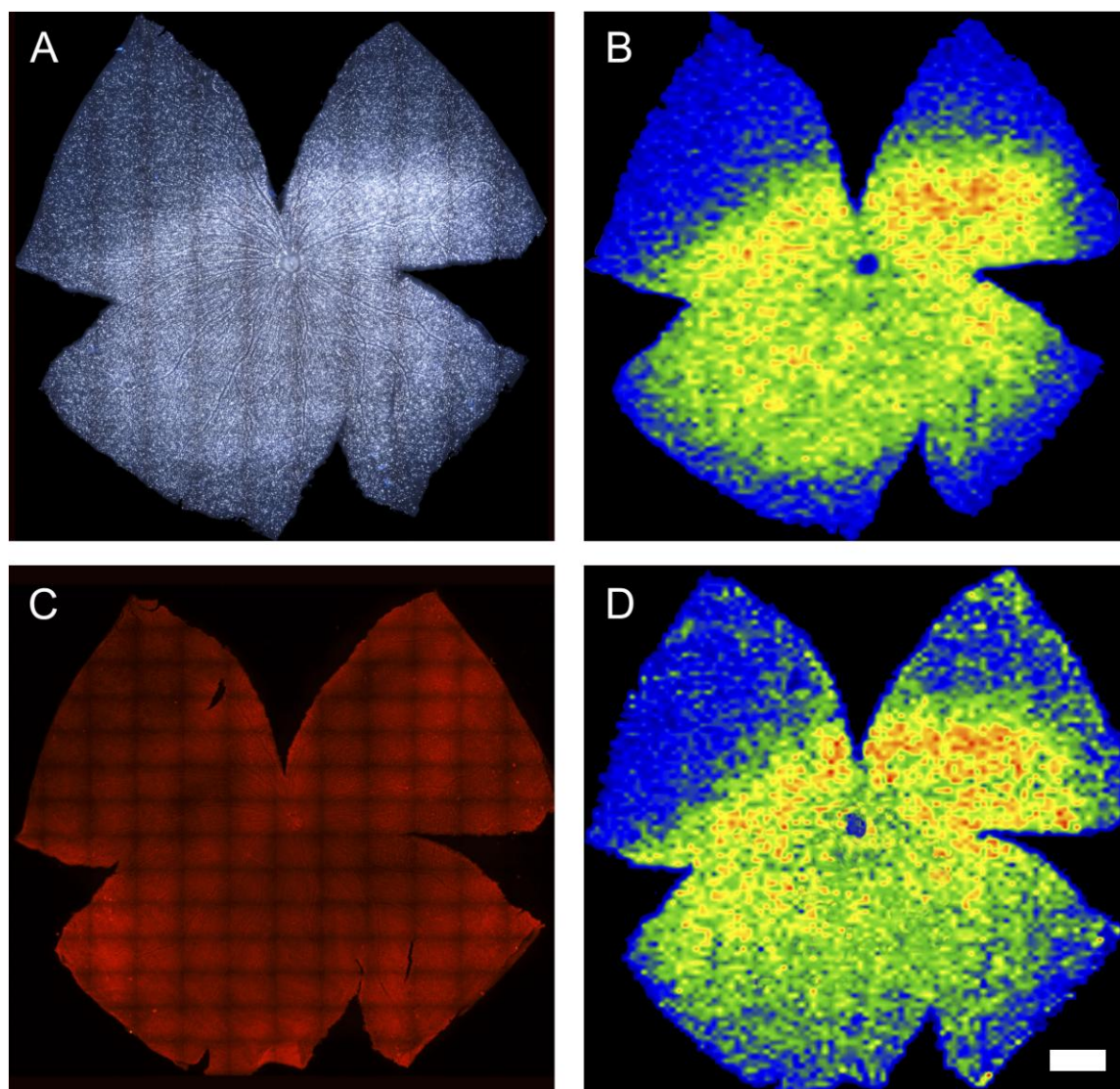


Figura 4.17. Población de células ganglionares de la retina en retinas controles de animales de 20 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una animal SD control de 20 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las CGR trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de CGR con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

4.1.4.2. Estudio temporal de la población de CGR en los animales fotoexpuestos.

Se contaron los números de CGR marcadas con FG de los ojos izquierdos y derechos de todas las retinas experimentales a los diferentes tiempos TFE (Tabla 4.2; Figura 4.20, 4.21). Se compararon los números de CGR marcadas con FG obtenidos en las retinas derechas e izquierdas no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (test Mann-Whitney), en ninguno de los periodos analizados.

En los intervalos de tiempo más cortos analizados tras la fototoxicidad, inmediatamente, 1 y 3 meses TFE, la población media de CGR marcadas con FG fue de 82.212 ± 5.298 (media \pm DE) (n=16), 79.865 ± 2.633 (n=12) y 79.108 ± 4.549 (n=14), respectivamente, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre los mismos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

En los periodos de supervivencia posteriores (6, 9 y 12 meses TFE) la población media de CGR marcadas con FG disminuía con el tiempo tras la fotoexposición, ya que el número medio de CGR marcadas con FG fue de 72.219 ± 9.652 (n=14), 68.890 ± 10.192 (n=12) y 67.849 ± 8.959 (n=10) a los 6, 9 y 12 meses TFE, respectivamente (Tabla 4.2; Figura 4.18). Cuando comparamos la población de CGR encontrada en los diferentes tiempos de estudio, pudimos observar que a partir de 6 meses TFE existía una diferencia estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) en cuanto al número de CGR comparado con ambos grupos de animales control y con los experimentales procesados inmediatamente o 1 mes TFE (Mann-Whitney $p < 0,05$). Concluimos de esta parte del estudio que el número de CGR que se puede marcar con FG por transporte axonal retrógrado disminuye significativamente a partir de los 6 meses TFE. El porcentaje de CGR marcadas con FG disminuye aproximadamente un 11% a los 6 meses TFE, un 15% a los 9 meses y un 17% a los 12 meses TFE (Figura 4.18).

Con los números de células ganglionares marcadas con FG y su distribución espacial en las retinas se construyeron mapas de isodensidad de CGR que muestran la distribución espacial de estas células en estos animales (Figura 4.20, 4.21). Durante los primeros 6 meses TFE la distribución de estas células permanecía similar a la observada en las retinas control (Figura 4.20). Sin embargo, a partir de los 6 meses TFE, los colores cálidos en estos mapas de isodensidad tendían a desaparecer, reflejando la pérdida de CGR. Esta pérdida parecía no estar distribuida equitativamente por toda la retina, si no que se observaban algunas áreas de la retina más afectadas por la fototoxicidad que otras (Figura 4.21, 4.24) y algunas retinas mostraron pérdidas sectoriales de CGR a los 12 meses TFE (Figura 4.21E, F, 4.24).

Para poder comprobar si la disminución del número de CGR trazadas con FG se debía a un problema de transporte axonal o a una muerte de estas células, realizamos otros 2 grupos de animales que fueron procesados 9 y 12 meses TFE (Tabla 4.3; Figura 4.22, 4.23). En estos animales las CGR fueron trazadas con FG y posteriormente inmunodetectadas con el anticuerpo anti-Brn3a.

Se contó en estos animales la población de CGR trazadas con FG (FG⁺) y la población de CGR inmunodetectadas con el anticuerpo anti-Brn3a (Brn3a⁺), siendo la población media de CGR trazadas con FG de 70.806 ± 2.422 (n=8) y 67.228 ± 5.121 (n=10) e inmunodetectadas con Brn3a de 72.260 ± 1.816 (n=8) y 68.651 ± 3.825 (n=10) a los 9 y 12 meses TFE, respectivamente (Tabla 4.3; Figura 4.19). No hubo diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los números de CGR marcadas FG⁺ o Brn3a⁺ en estas retinas (Tabla 4.1 y 4.2), lo que nos indica que todas las CGR presentes en la retina, y por ello Brn3a⁺, eran capaces de transportar FG retrógradamente, y eran por ello FG⁺, observándose también en sus correspondientes mapas de isodensidad una distribución de la población de CGR muy similar a estos (Figura 4.22, 4.23).

Sin embargo, los números de CGR trazadas con FG o inmunodetectadas con Brn3a a 9 y 12 meses TFE eran menores que los observados en retinas control o en animales procesados antes de 6 meses después de la fotoexposición. Así, los números de CGR contadas disminuían un 18% ó 19%, según se trate de FG o Brn3a, a los 12 meses TFE (Figura 4.19).

Retina	Animales control _{p60}		Animales experimentales (TFE)					
	Izquierda	Derecha	Inmediatamente		1 mes		3 meses	
			Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
	79.090	82.653	77.599	83.222	77.056	76.898	75.042	73.903
	77.567	74.237	72.212	81.476	78.765	83.769	78.143	75.253
	76.965	79.478	79.741	81.811	78.222	81.657	85.926	86.537
	82.944	84.076	79.566	82.836	75.421	78.090	75.422	78.678
	86.150	86.657	84.260	70.931	81.745	81.662	85.240	83.579
			85.777	86.247	82.745	82.350	78.962	81.399
			88.858	81.813			72.119	77.312
			88.846	90.211				
Media±DE	80.534±3.492	81.420±4.274	82.107±5.470	82.318±5.120	78.992±2.543	80.737±2.423	78.693±4.822	79.523±4.219
Media±DE	80.981±3.928		82.212±5.298		79.865±2.633		79.108±4.549	
Retina	Animales control _{p625}		Animales experimentales (TFE)					
	Izquierda	Derecha	6 meses*		9 meses*		12 meses*	
			Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
	80.535	86.019	69.502	68.920	79.691	74.467	76.939	81.085
	82.306	83.783	76.384	69.076	79.849	77.367	73.287	72.567
	77.599	76.522	74.067	65.018	63.045	67.771	49.278	58.418
	82.363	75.536	67.569	59.964	50.506	49.366	70.271	61.707
	87.124	86.927	85.791	85.077	79.281	73.755	70.240	64.704
			83.231	74.394	64.954	66.632		
			70.240	75.843				
Media±DE	81.985±3.098	81.757±4.798	75.255±6.487	71.184±7.545	68.226±9.233	69.554±11.028	68.003±9.680	67.696±8.172
Media±DE	81.871±4.040		73.219±7.324		68.890±10.192		67.849±8.959	

Tabla 4.2. Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con FG en retinas de animales controles y experimentales a diferentes tiempos tras la fotoexposición.

Valor medio (± Desviación Estándar) de células ganglionares de la retina trazadas con FG en cada uno de los ojos izquierdos y derechos de cada uno de los animales controles y experimentales en cada uno de los tiempos de estudio. *Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el valor obtenido en las ratas SD control (segunda columna de la izquierda; Kruskal-Wallis, p<0,001).

Retina	Animales control _{p60}		Animales control _{p625}		Animales experimentales (TFE)			
	FG		FG		FG		FG	
					9 meses*		12 meses*	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
	79.090	82.653	80.535	86.019	71.375	73.308	64.199	71.006
	77.567	74.237	82.306	83.783	71.112	71.992	66.378	70.817
	76.965	79.478	77.599	76.522	70.420	69.746	54.433	70.131
	82.944	84.076	82.363	75.536	65.203	73.296	71.656	63.259
	86.150	86.657	87.124	86.927			70.404	70.004
Media±DE	80.534±3.492	81.420±4.274	81.985±3.098	81.757±4.798	69.527±2.910	72.085±1.677	65.414±6.834	69.043±3.261
Media±DE	80.981±3.928		81.871±4.040		70.806±2.422		67.228±5.121	
Retina	Animales control _{p60}		Animales control _{p625}		Animales experimentales (TFE)			
	Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a	
					9 meses*		12 meses*	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
	78.732	87.628	85.923	80.348	72.185	73.010	67.899	69.783
	90.197	93.896	82.264	86.695	73.506	72.970	64.725	67.955
	87.835	81.566	73.943	84.896	73.952	69.119	67.779	70.999
	90.263	82.157	85.813	84.025	69.397	73.944	61.138	76.592
	83.680	90.021	82.157	82.043			69.647	69.997
Media±DE	86.141±4.410	87.053±4.691	82.020±4.871	83.601±2.471	72.260±2.050	72.261±2.142	66.238±3.001	71.065±2.932
Media±DE	86.597±4.575		82.810±3.544		72.260±1.816		68.651±2.413	

Tabla 4.3. Número de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con FG e inmunodetectadas con Brn3a en las retinas de animales controles y experimentales, 9 y 12 meses después de la fotoexposición.

Valor medio de células ganglionares de la retina (media ± Desviación Estándar) FG⁺ (filas superiores) o Brn3a⁺ (filas inferiores) en los ojos izquierdos y derechos de los animales controles y experimentales 9 y 12 meses tras la fotoexposición. *Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con los valores obtenidos en los animales control (columnas a la izquierda; Kruskal-Wallis, p<0,001).

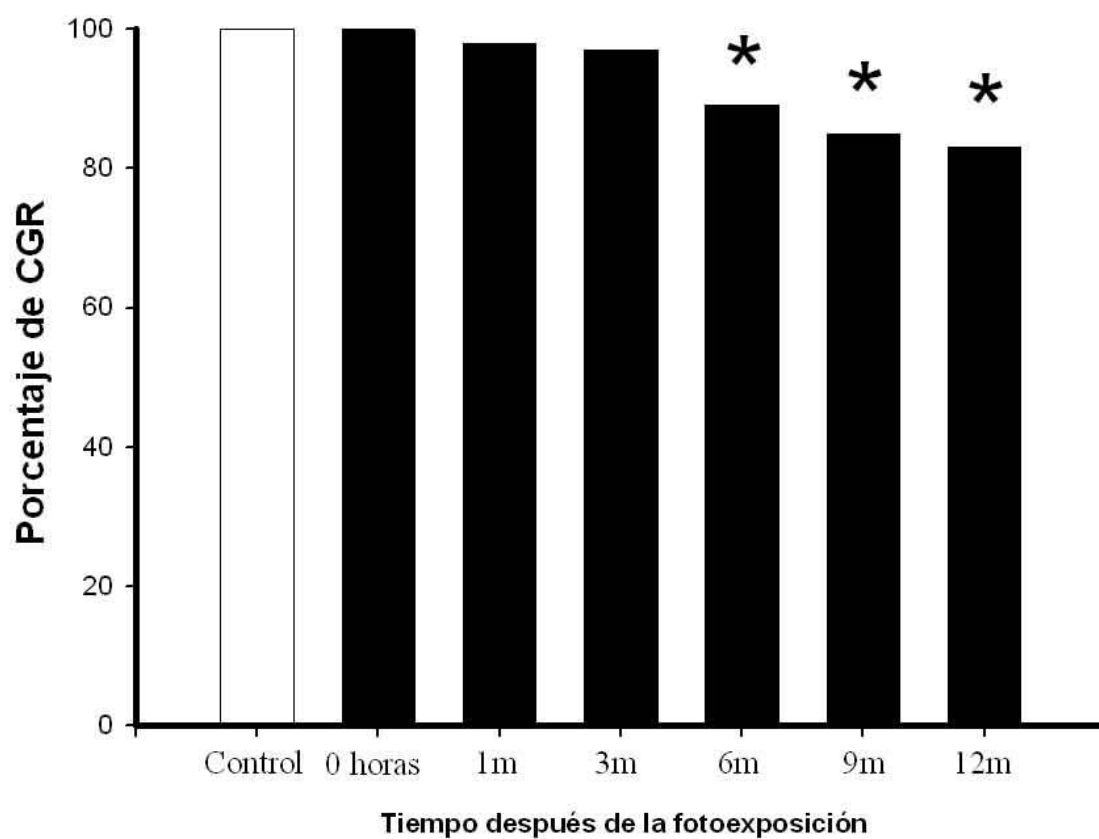


Figura 4.18. Porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con FG en animales controles y experimentales.

Porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con FG en las retinas de animales experimentales, procesados desde inmediatamente hasta 12 meses TFE (barras negras) con respecto a los valores control que se ha considerado como 100% (barra blanca). Se observa que a partir de 6 meses TFE, la población de CGR se ha reducido. *Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con los valores control (Mann-Whitney $p < 0,05$).

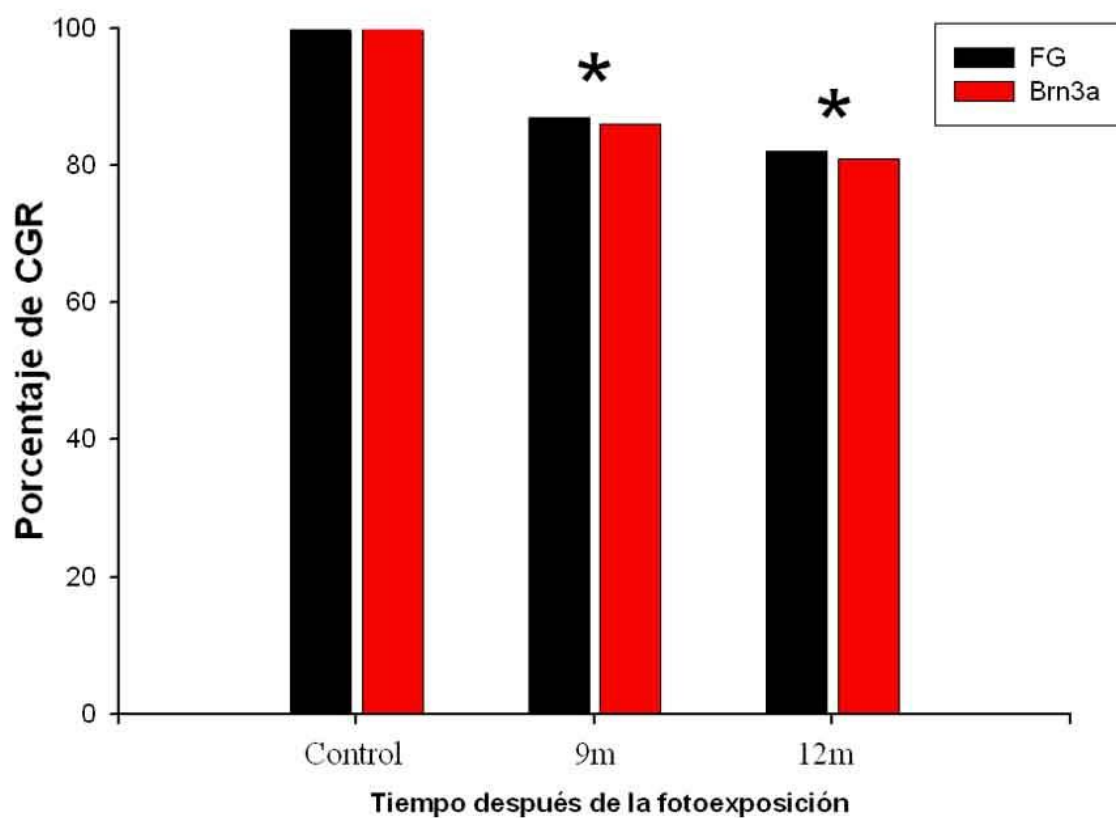


Figura 4.19. Porcentaje de células ganglionares de la retina FG^+ o $Brn3a^+$ en animales control y experimentales.

Porcentaje de células ganglionares de la retina FG^+ o $Brn3a^+$ (barras negras y rojas, respectivamente) presentes en las retinas de animales analizados 9 y 12 meses TFE con respecto a los animales control (datos de P60 y P625 agrupados) que se ha considerado como 100%. Se observa que 9 meses y 12 meses TFE la población de células ganglionares de la retina se ha reducido. *Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con los valores control (Mann-Whitney $p < 0,05$).

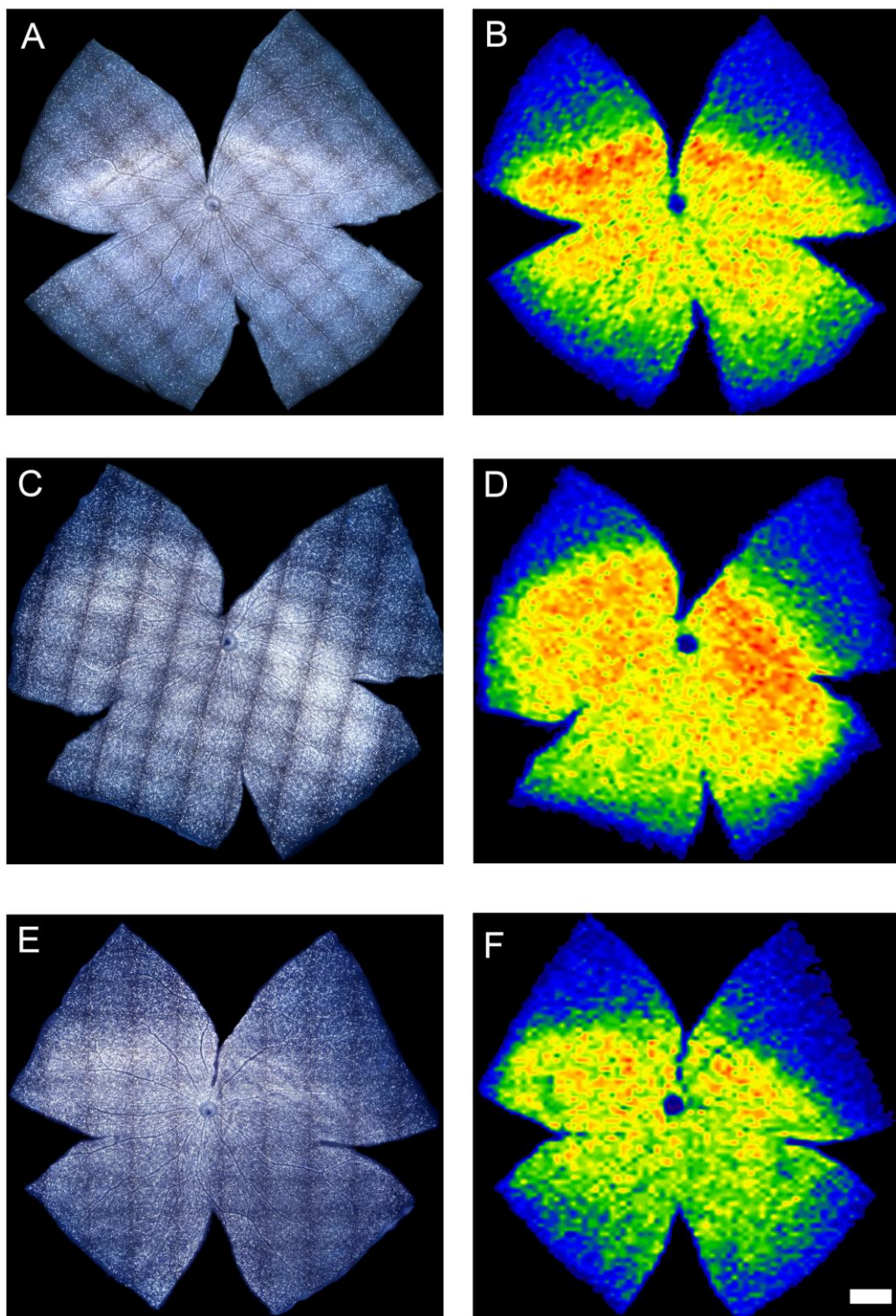


Figura 4.20. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales fotoexpuestos.

Reconstrucciones fotográficas realizadas con el microscopio de fluorescencia de varias retinas de animales fotoexpuestos y procesados inmediatamente (A), 1 mes (C) o 3 meses (E) TFE en las que se observan las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A,C,E) y sus correspondientes mapas de isodensidad (B, D, F). Barra = 1 mm.

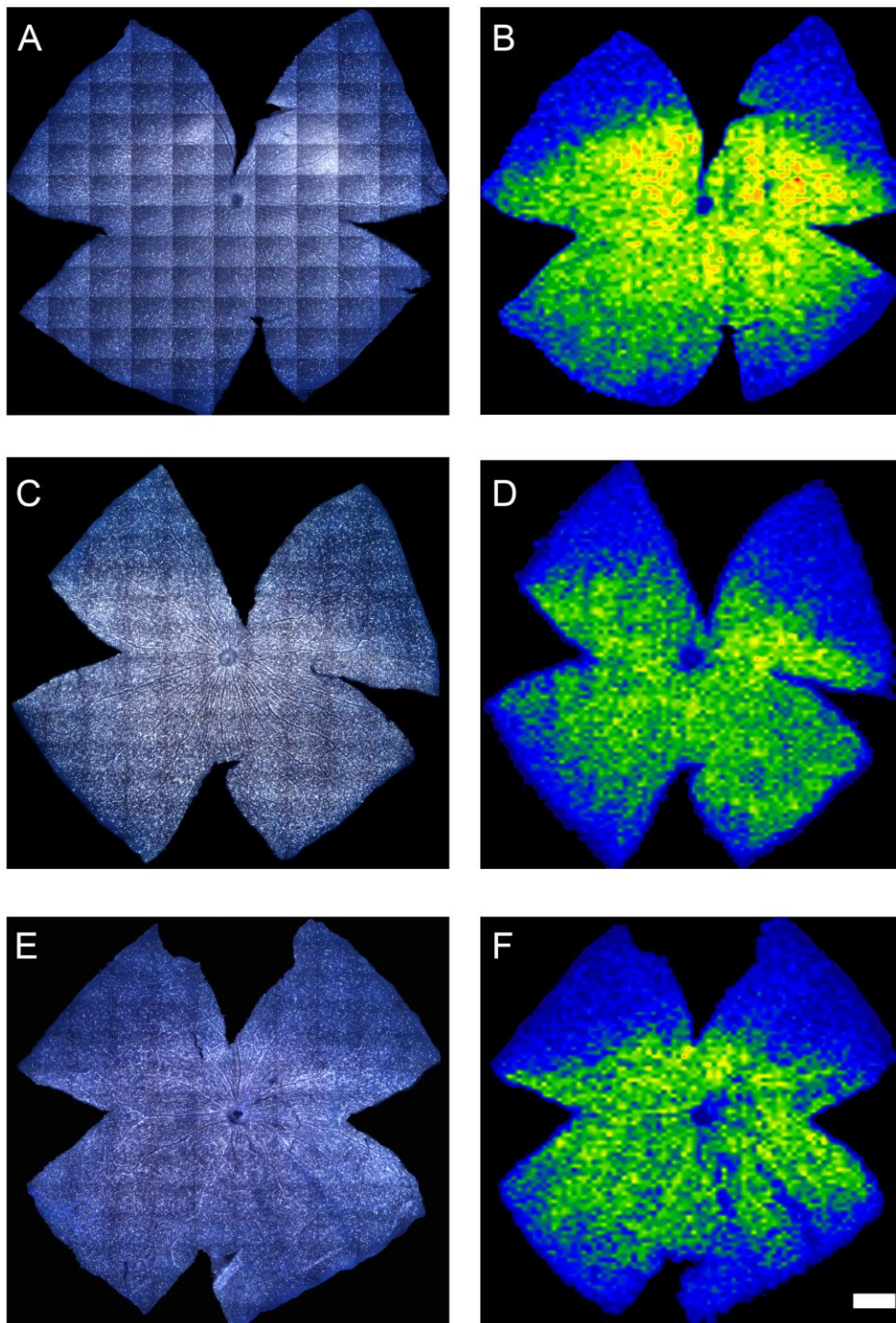


Figura 4.21. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales fotoexpuestos.

Reconstrucciones fotográficas realizadas con el microscopio de fluorescencia de varias retinas de animales fotoexpuestos y procesados 6 meses (A), 9 meses (C) o 12 meses (E) TFE en las que se observan las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A,C,E) y sus correspondientes mapas de isodensidad (B,D,F). Doce meses TFE se observan sectores de pérdida de células ganglionares de la retina (E, F). Barra = 1 mm.

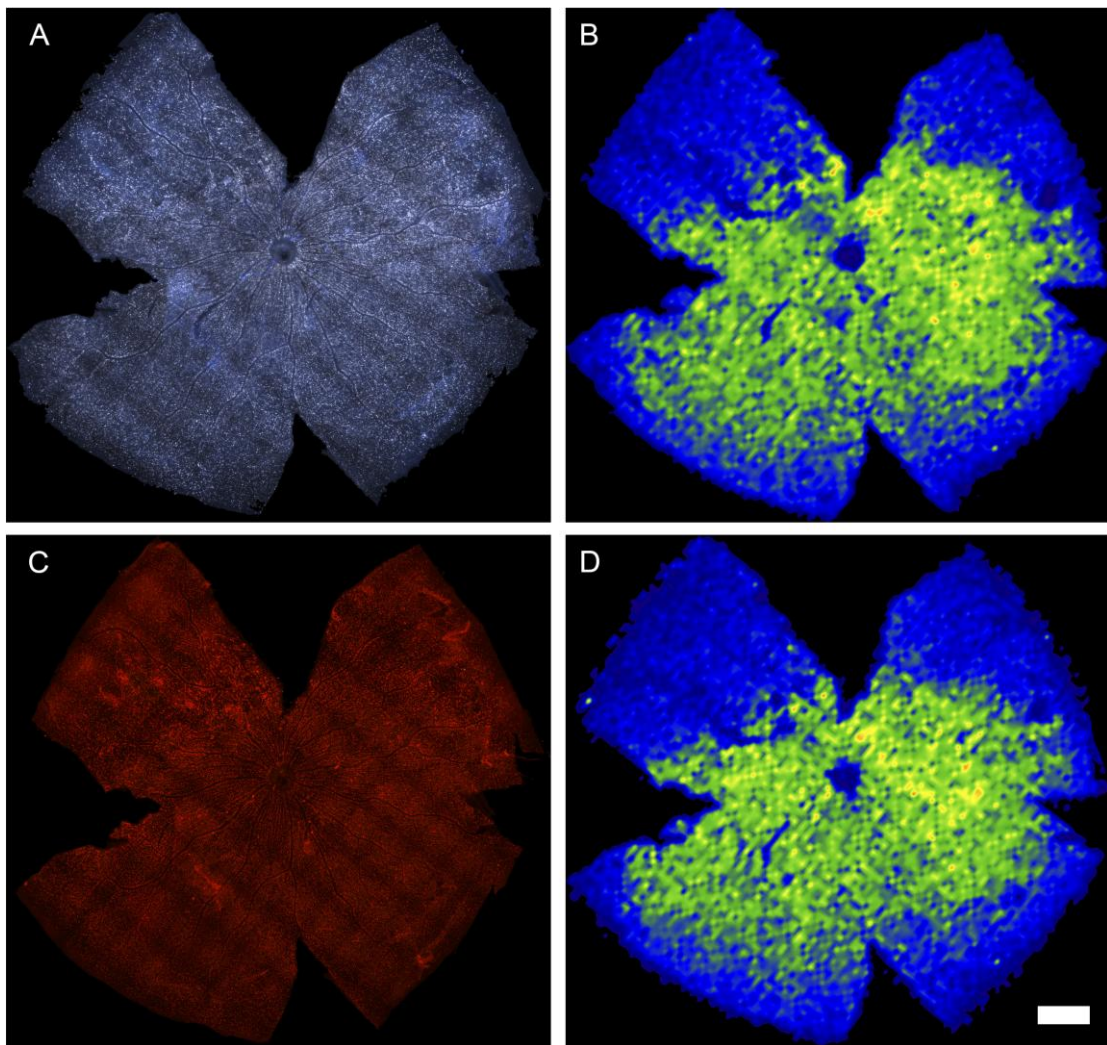


Figura 4.22. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales fotoexpuestos.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata SD fotoexpuesta y procesada 9 meses TFE. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las CGR trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

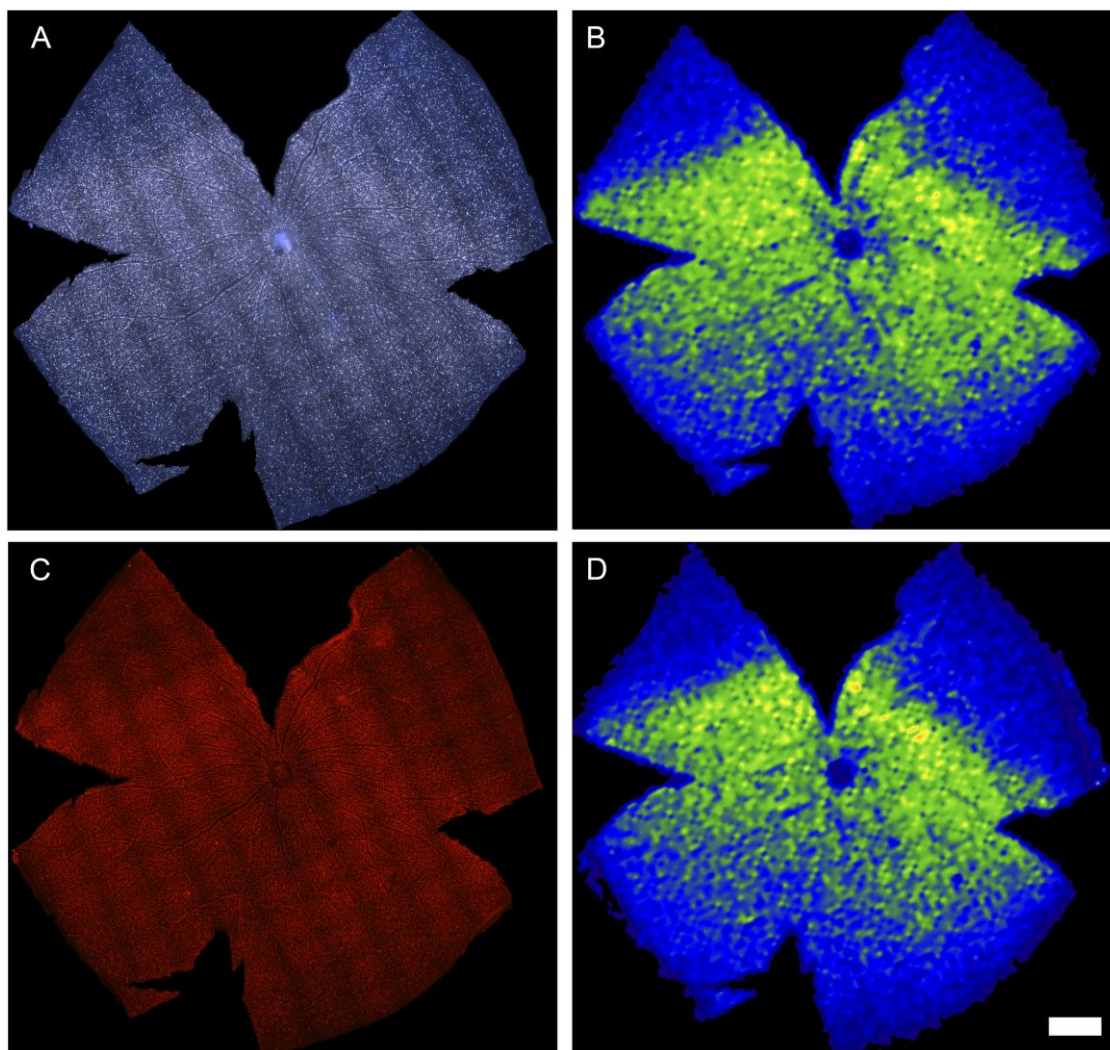


Figura 4.23. Población de células ganglionares de la retina en retinas de animales fotoexpuestos.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata SD fotoexpuesta y procesada 12 meses TFE. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D de la derecha podemos observar los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

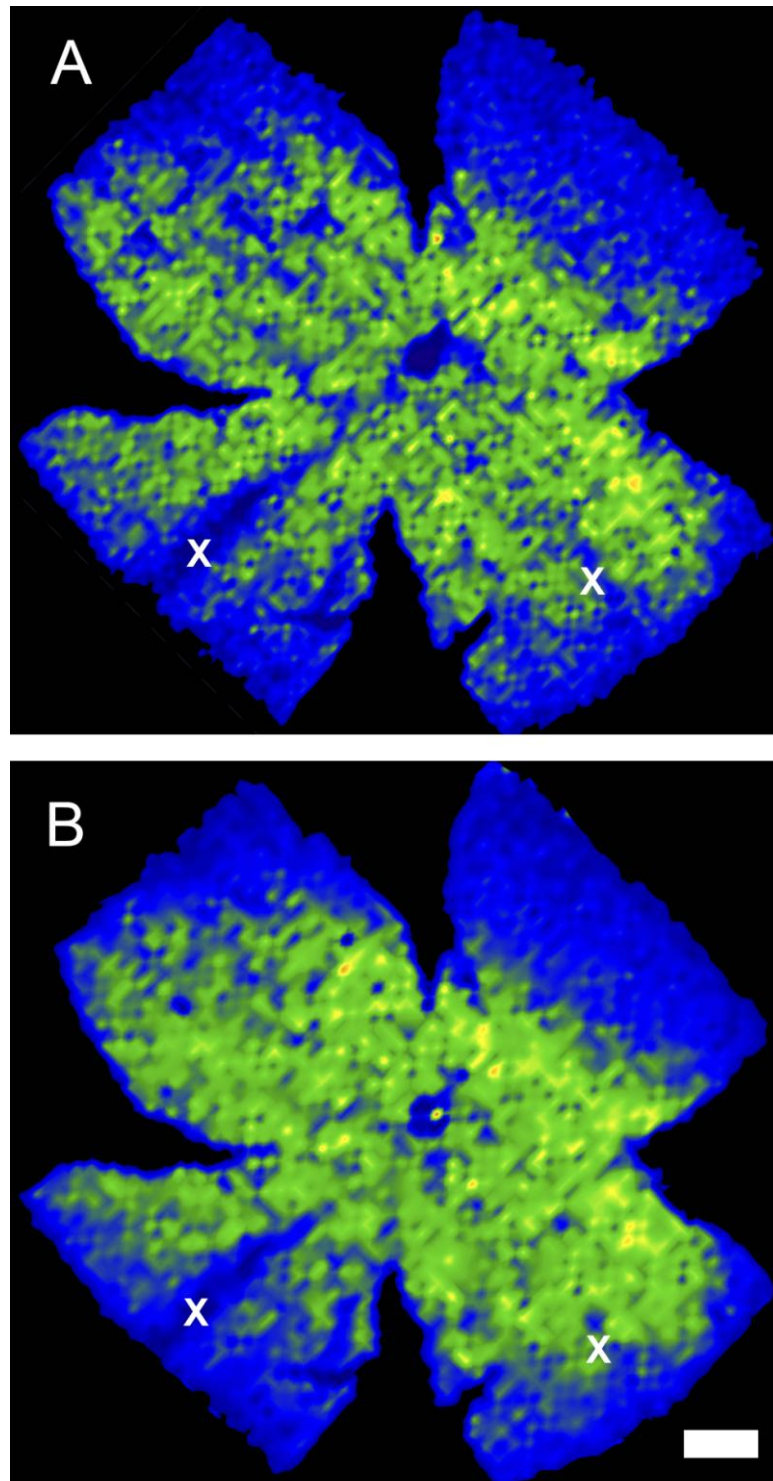


Figura 4.24. Pérdida sectorial de células ganglionares de la retina en retinas de animales fotoexpuestos.

Mapas de isodensidad de las CGRs, correspondientes a las reconstrucciones fotográficas de una retina de una rata SD fotoexpuesta y procesada 12 meses TFE, trazadas con FG (A) e inmunodetectadas con Brn3a (B). En estas imágenes se observa pérdida sectorial (X) de células ganglionares de la retina que es similar con ambos marcadores. Barra= 1 mm.

4.2. DEGENERACIÓN DE LA RETINA EN LA RATA P23H-1.

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos en el análisis de la retina de la rata albina P23H-1 que sufre una degeneración hereditaria de los fotorreceptores. Compararemos los resultados obtenidos en los animales controles (SD) tras la fotoexposición, con los obtenidos en estos animales transgénicos hasta los 12 meses de edad. La mutación P23H causa en estos animales, en primer lugar, una degeneración progresiva de los fotorreceptores. Secundariamente a esta, observamos una disminución en el número de CGR, causada por vasos sanguíneos que arrastran sus axones, repitiéndose un proceso muy similar al explicado los apartados anteriores en la degeneración inducida por fototoxicidad.

4.2.1. ESTUDIO TEMPORAL DE LA MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES EN LA RATA P23H-1.

4.2.1.1. Grupo control de ratas Sprague-Dawley.

En las secciones transversales, tanto de las retinas derechas como izquierdas de los animales este grupo, que eran ratas SD de 2 y 12 meses de edad, se podían observar todas las capas de la retina sin alteraciones apreciables (Figura 4.5). La CNE tenía un grosor medio de 10-12 núcleos en los animales de este grupo mientras que la CNI mostró un grosor medio de 3-4 núcleos.

4.2.1.2. Degeneración de los fotorreceptores en la retina de la rata P23H-1.

Las ratas homocigóticas P23H-1 muestran una rápida y progresiva pérdida de fotorreceptores con la edad.

Al mes de edad el grosor de la CNE de estos animales había disminuido a 2-3 núcleos en la retina ventral (Figura 4.25 B) y 3-4 núcleos en la dorsal (Figura 4.25 A), mientras que en la retina más central (alrededor del disco óptico) el número medio de núcleos en la CNE era de 4-6 núcleos.

A los 3 meses de edad, se observaba una CNI más fina que en los animales control (Figura 4.25 C,D) además, la CNE prácticamente había desaparecido en la retina ventral y dorsal quedando, en estas zonas, solamente algún fotorreceptor aislado, mientras que en la retina central aún se observaba una hilera de núcleos de fotorreceptores. La pérdida de fotorreceptores continuaba con el paso del tiempo y, a partir de los 6 meses de edad, tanto en la retina dorsal y ventral como central, solamente podíamos observar algún fotorreceptor aislado. La degeneración retiniana progresaba afectando también a la CNI, que era cada vez más fina.

A los 6 meses de edad, se empezaban a observar complejos vasculares que aparecían entre el EPR y la membrana de Bruch, y algunos vasos verticales que conectaban estos complejos vasculares con el plexo vascular de retina interna (Figura 4.25 E). Estos complejos vasculares no se observaron en las retinas control (Figura 4.5). Los vasos verticales eran vasos de retina interna que eran arrastrados hacia los vasos subretinianos. Se ha documentado que estos vasos traccionados arrastran en su trayecto a los axones de las CGR (Figura 4.25 E-F, 4.30 D-F), dañándolos y causando posteriormente la muerte de las CGR (ver más adelante; Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a). El número y frecuencia de estos complejos vasculares aumentaba con la edad.

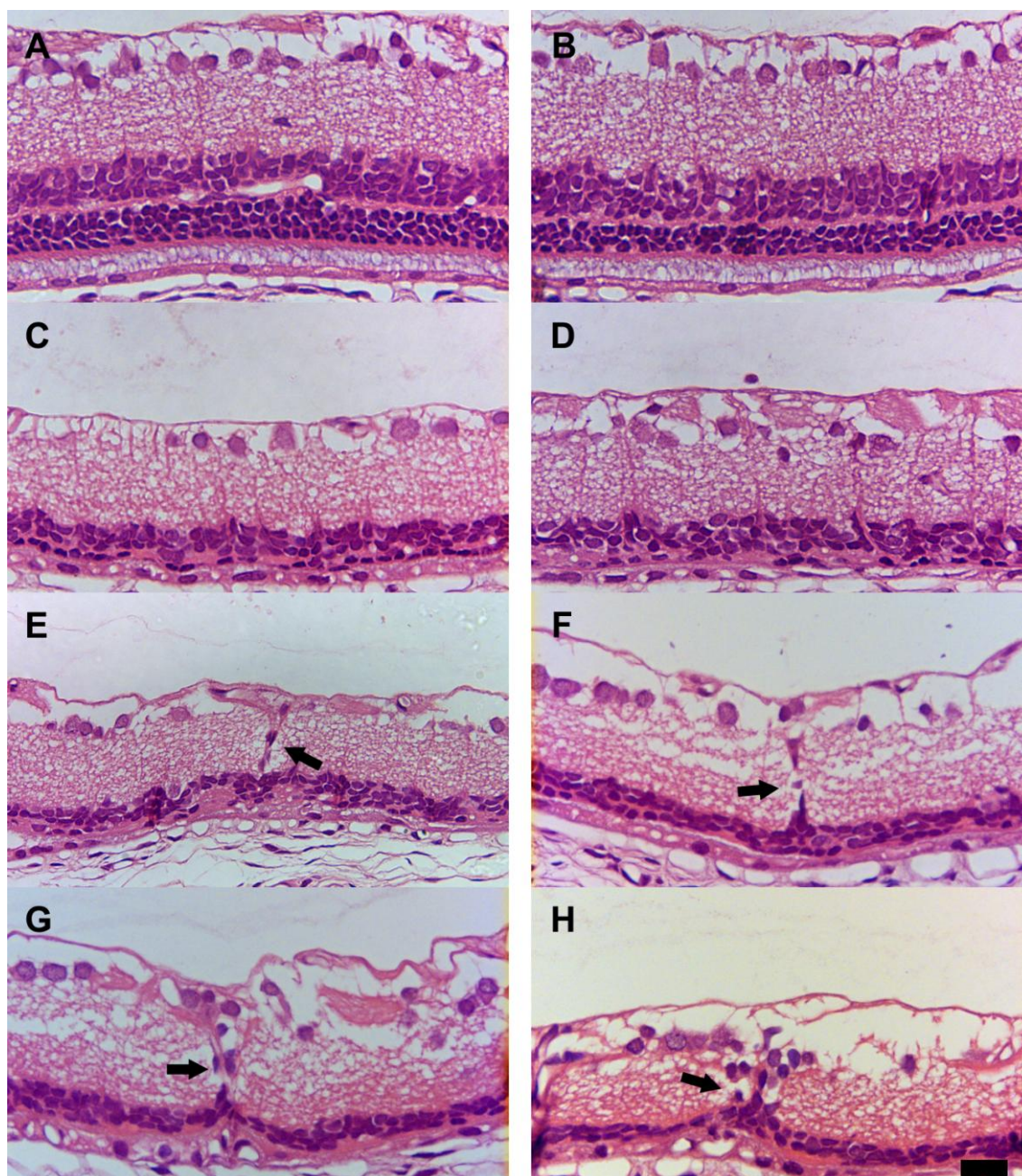


Figura 4.25. Curso temporal de la degeneración retiniana en la rata P23H-1.

Microfotografías de secciones transversales de la retina teñidas con hematoxilina y eosina tomadas de la retina dorsal (columna de la izquierda) o ventral (columna de la derecha) de 5 ratas P23H-1 de diferentes edades: 1 mes (A,B), 3 meses (C,D), 6 meses (E), 9 meses (F) y 12 meses (G,H). A los 9 y 12 meses de edad podemos observar vasos verticales que conectan la retina interna y la externa (flechas) y complejos vasculares en la zona inferior de estos vasos y por debajo del EPR. Barra= 100 μ m.

4.2.2. ESTUDIO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS EN LA CAPA DE FIBRAS DE LA RETINA EN LA RATA P23H-1.

4.2.2.1 Aspecto de las retinas controles.

En las retinas control, correspondientes a ratas SD, se apreciaban los axones pNFH positivos (pNFH⁺) mostrando una trayectoria rectilínea, convergente y centrípeta a la papila óptica (Figura 4.26), tal y como ha sido descrito previamente por nuestro grupo en estos animales (Parrilla-Reverter y cols., 2009b). La señal de pNFH se observaba con más intensidad en las porciones centrales de la retina, próximas a la papila, e iba haciéndose más tenue hacia la periferia. Los somas de las CGR y sus prolongaciones dendríticas no expresaban pNFH (Figura 4.26).

4.2.2.2. Cambios en la capa de fibras tras la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

El patrón de expresión de pNFH observado en las retinas control se mantuvo en las retinas de las ratas P23H-1 homocigóticas de menos de 6 meses de edad. Sin embargo, aunque al observar las retinas de los animales procesados a los 6 meses de edad con objetivos de poco aumento éstas mostraban una densidad axonal similar a la de las retinas control, al analizarlas con objetivos de mayor aumento y por tanto, con más detalle, se advertían algunos cambios en zonas concretas de la retina: los axones pNFH⁺ presentaban trayectorias deformadas, no lineales, causadas por regiones de estrangulamiento axonal (Figura 4.27, 4.28, 4.29). Estas estrangulaciones eran el resultado de la compresión axonal por los vasos de la retina interna (Figura 4.30 F), como ha sido documentado con anterioridad (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; García-Ayuso y cols., 2010). A los 6 meses de edad, estos estrangulamientos axonales ocurrían principalmente en la retina ventral.

A partir de los 9 meses de edad, la compresión de los axones de las CGR se había propagado por toda la retina (Figura 4.27 B). Conforme aumentaba el tiempo de supervivencia de los animales, estas compresiones axonales eran más frecuentes y severas. Alrededor del año de edad, aparecían “bulbos axonales” (Figura 4.28, 4.29 E) y axones “deambulando” por encima y por debajo de las zonas de compresión axonal. Eso indicaba que la compresión que realizaban los vasos sobre los axones había interrumpido el transporte axonal, causando la sección de los mismos y la regeneración abortiva de algunos de ellos (Figura 4.29 C-E). Además, algunos somas de CGR y sus dendritas más próximas se tornaron pNFH⁺ (Figura 4.29 F), principalmente en la retina ventral (Figura 4.28). Este es un patrón de expresión de pNFH anormal que ha sido descrito como una señal temprana de degeneración neuronal (Parrilla-Reverter y cols., 2009b).

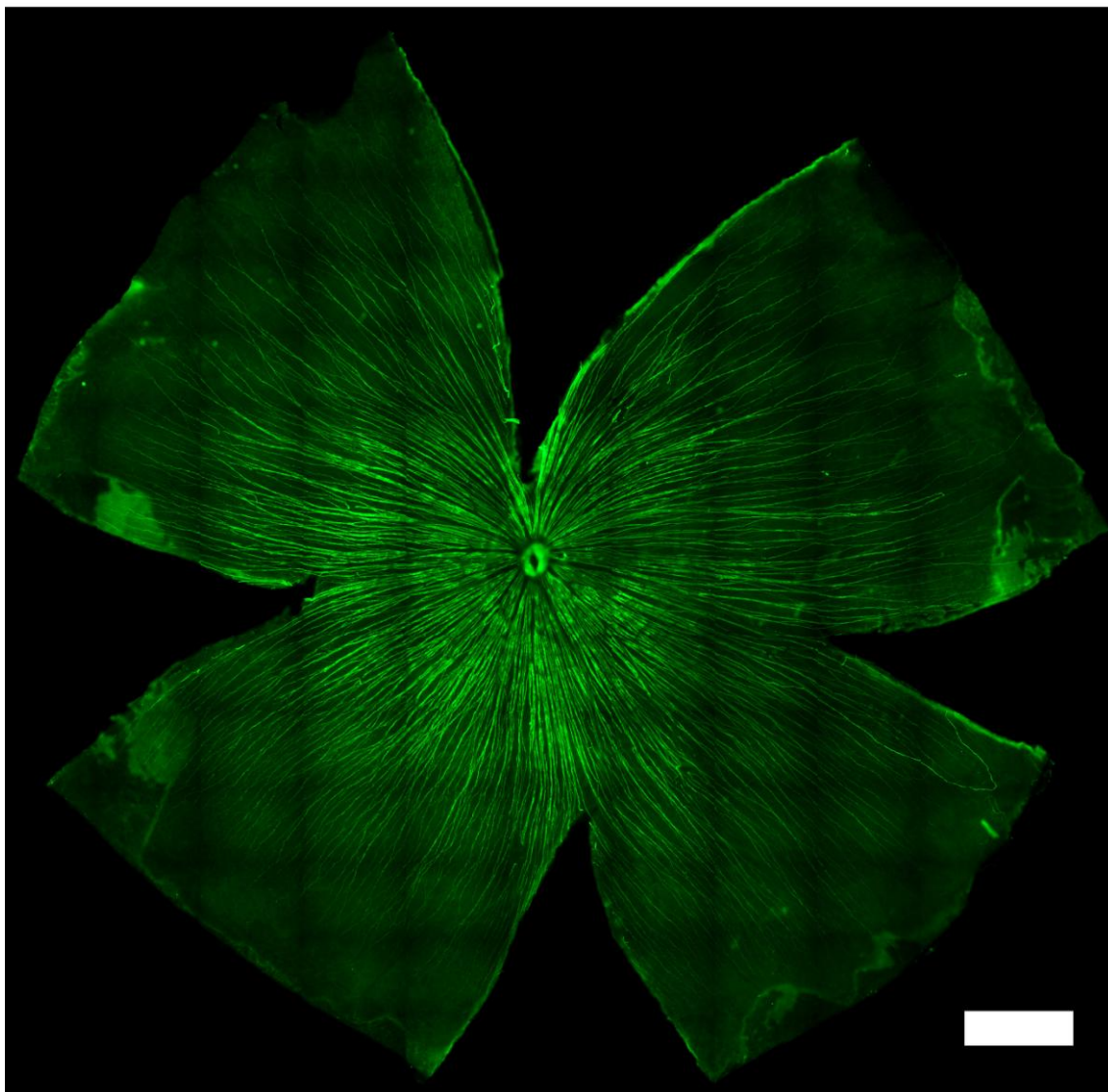


Figura 4.26. Axones de las células ganglionares de la retina en ratas SD controles: inmunodetección de pNFH.

Reconstrucción fotográfica obtenida con el microscopio de fluorescencia de un montaje global de una retina de un animal SD control, tras la reacción de inmunohistoquímica para detectar la subunidad de alto peso molecular fosforilada del triplete de los neurofilamentos (pNFH). Se observan los axones de las células ganglionares marcados con el anticuerpo pero no se aprecian los somas ni las dendritas de las CGR. Barra= 1 mm.

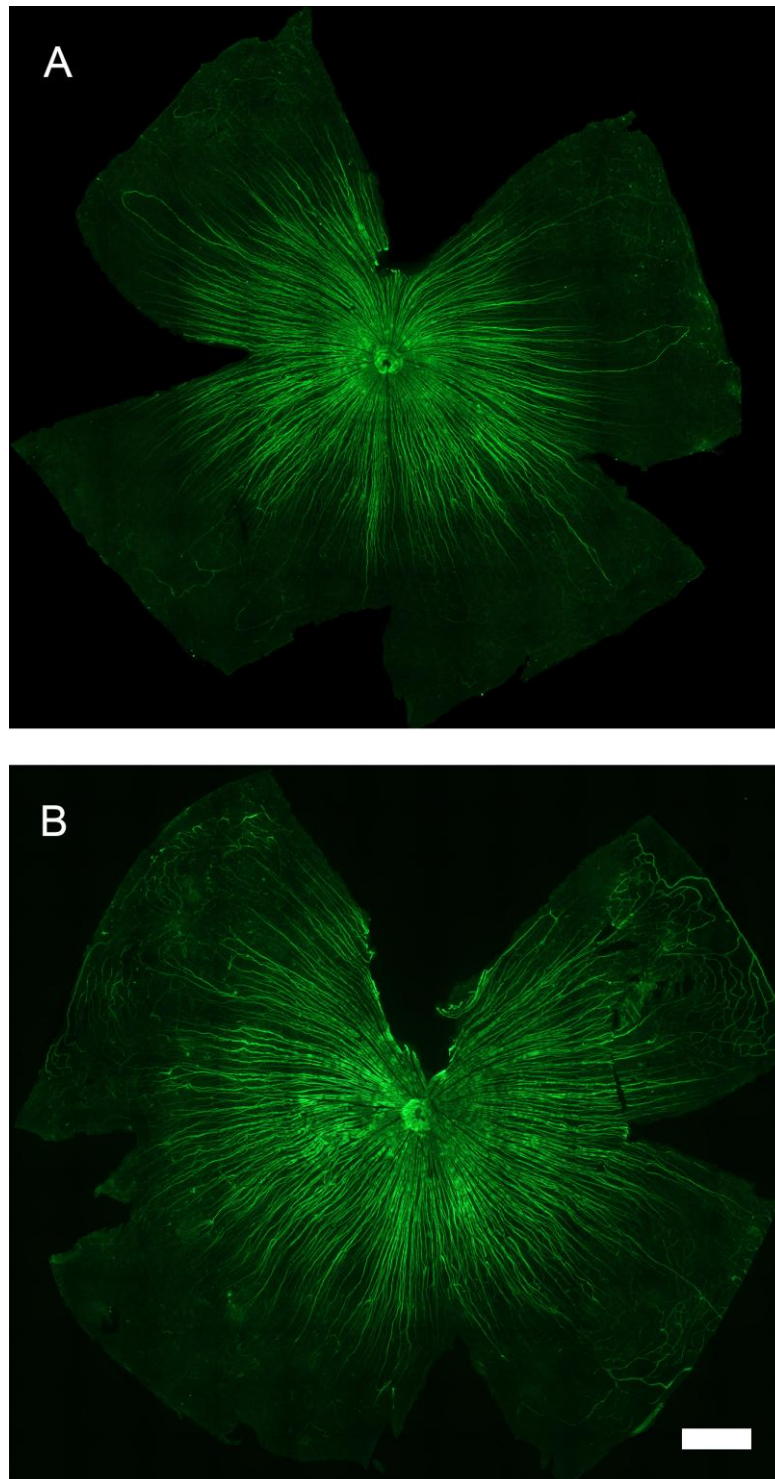


Figura 4.27. Alteraciones de la capa de fibras nerviosas en la rata P23H.

Reconstrucción fotográfica obtenida con el microscopio de fluorescencia de un montaje global de una retina de un animal procesado a los 6 meses de edad (A) y de otro animal procesado a los 9 meses de edad (B), tras la inmunodetección de pNFH. Se observan cambios en la expresión de pNFH con respecto a las retinas de los animales control Sprague-Dawley, que son más frecuentes y severos a los 9 meses de vida que a los 6. Barra= 1 mm.

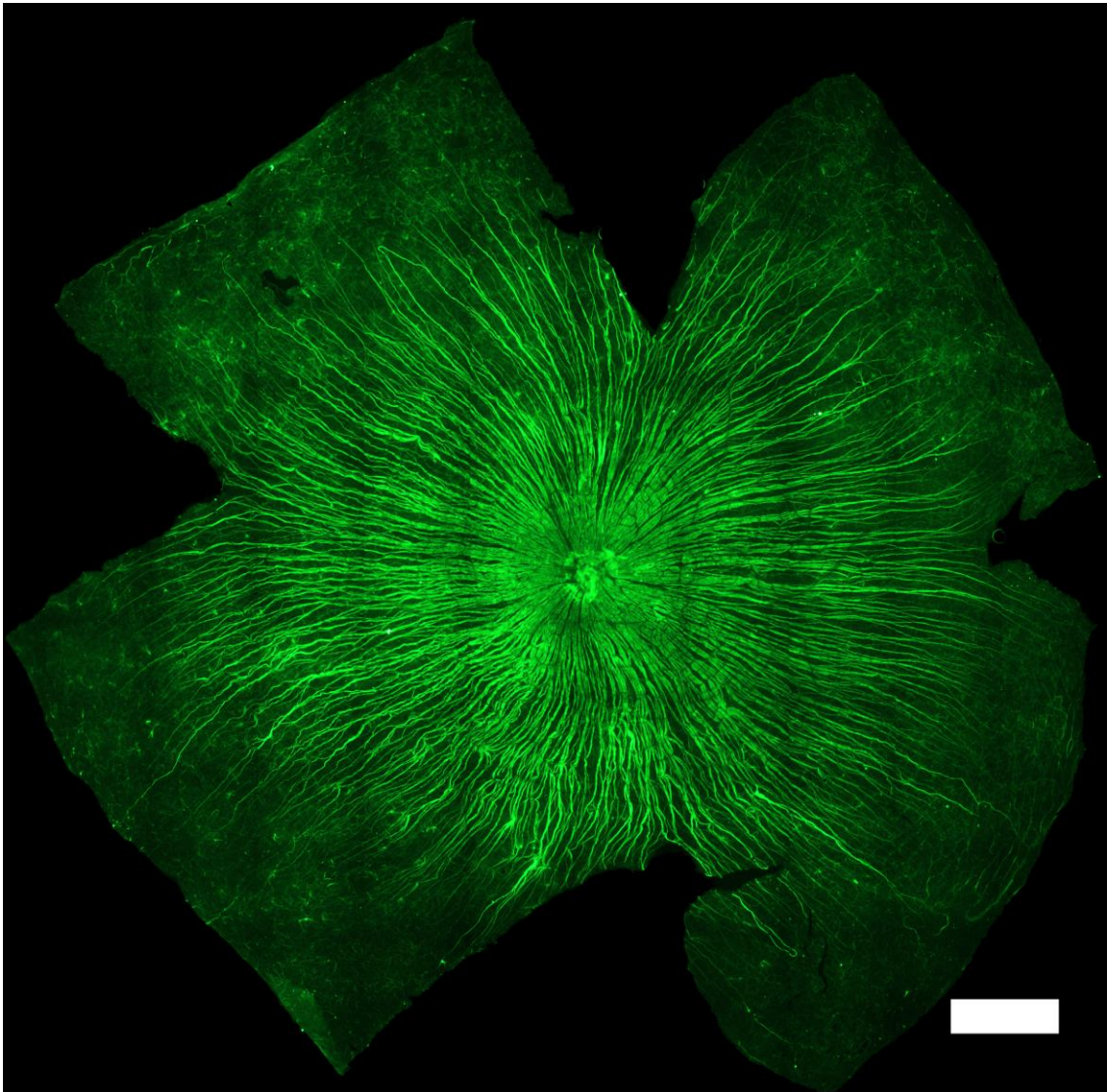


Figura 4.28. Alteraciones de la capa de fibras nerviosas en la rata P23H-1 a los 12 meses de edad.

Reconstrucción fotográfica obtenida con el microscopio de fluorescencia de un montaje global de una retina de una rata P23H-1 procesada a los 12 meses de edad, tras la inmunodetección de pNFH. Se observa como las compresiones de los axones son muy frecuentes y tienen lugar por toda la retina, aunque aún se muestran con mayor frecuencia y severidad en la hemirretina inferior. Barra= 1 mm.

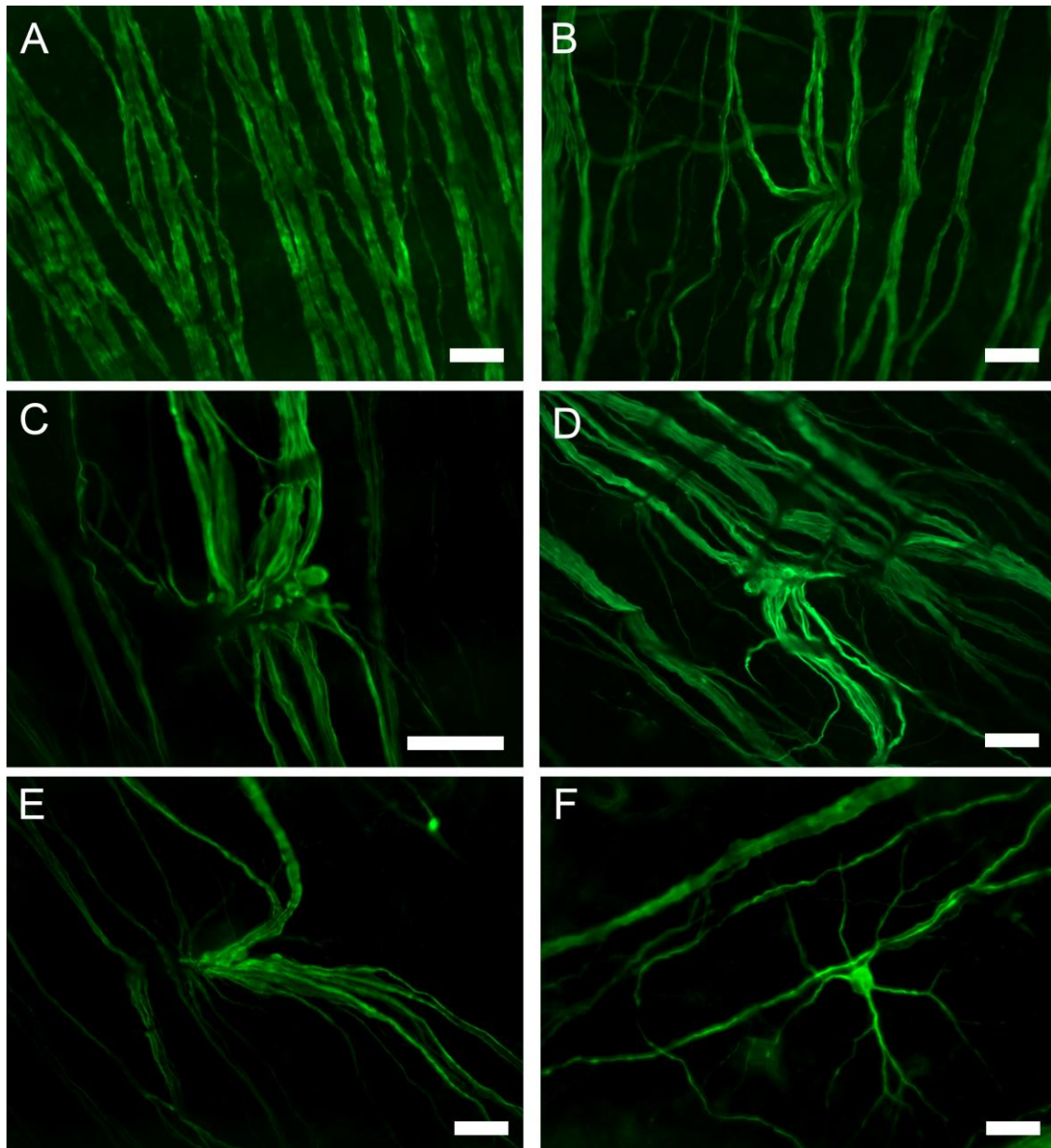


Figura 4.29. Alteraciones axonales en la retina de la rata P23H.

Microfotografías tomadas al microscopio de fluorescencia a diferentes aumentos (A, B, D, E, F: 20x; C: 40x) de una rata SD control (A) y de ratas P23H-1 examinadas a los 6 (B), 9 (C, D) y 12 meses (E, F) de edad en las que se ha inmunodetectado el pNFH. Se observan las compresiones axonales (B-F), bulbos axonales (C-E) y somas de células ganglionares de la retina pNFH positivos (F). Barra= 50 μ m.

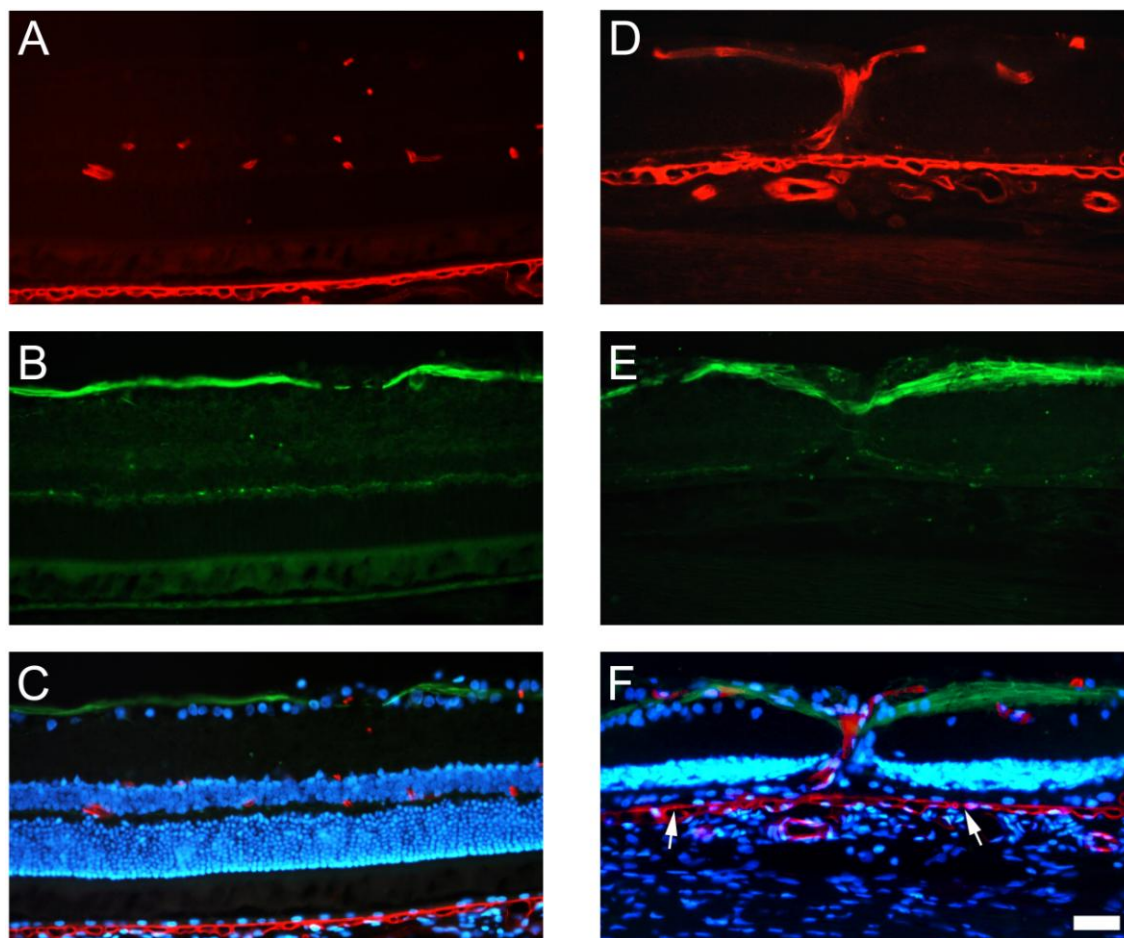


Figura 4.30. Los axones de las células ganglionares de la retina son arrastrados por vasos retinianos desplazados.

Microfotografías de secciones transversales de la retina representativas en las que se han inmunodetectado los vasos sanguíneos con un anticuerpo anti-RECA (fila superior, rojo) y los axones de las células ganglionares con un anticuerpo anti-NFH (fila intermedia, verde) y teñido todos los núcleos con DAPI (fila inferior, azul). La columna de la izquierda (A-C) muestra tres imágenes tomadas con diferentes filtros de fluorescencia de la misma sección de la retina una rata control SD de 2 meses de edad. La columna de la derecha (D-F) muestra tres imágenes tomadas con diferentes filtros de fluorescencia de la misma sección de la retina una rata P23H-1 de 12 meses de edad. Se observa en la retina control que no hay desplazamientos axonales (A-C). Sin embargo, en la retina de la rata P23H-1 se observan vasos que cruzan verticalmente la retina y conectan el plexo vascular retiniano interno con complejos vasculares subretinianos arrastrando los axones de las células ganglionares de la retina (E). También se observa cómo las células del EPR migran para cubrir estos vasos retinianos (F). Barra= 100 μ m.

4.2.3. ESTUDIO TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CGR EN LA RATA P23H-1.

4.2.3.1. Estudio de la población de CGR en animales control.

Se realizaron 2 grupos de animales control (SD) de diferentes edades, concretamente un grupo de 2 meses de edad y otro grupo de 1 año de edad, coincidiendo con la mayor edad de los animales transgénicos utilizados en este estudio. En ambos grupos de animales las CGR fueron trazadas con FG y posteriormente inmunodetectadas con un anticuerpo anti-Brn3a. Estos dos grupos se utilizaron para investigar si la edad afecta a la población de CGR en animales controles.

En estos grupos de ratas SD control el número medio de CGR marcadas con FG fue de 81.381 ± 3.722 (Media \pm DEM) en los animales de 2 meses de edad (Figura 4.16) y de 83.641 ± 2.751 en los animales procesados a los 12 meses de edad (Figura 4.31). Estos valores medios de población de CGR fueron similares a los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio, realizados en ratas SD (81.486 ± 4.340 ; n=37; Salinas-Navarro y cols., 2009a) e indicaban que el número medio de CGR que mantiene su transporte axonal activo en esta estirpe de rata no variaba durante sus primeros 12 meses de vida.

La inmunodetección de CGR con anticuerpos anti-Brn3a reveló un número medio de CGR de la retina de 85.997 ± 3.562 en los animales de 2 meses de edad (Figura 4.16) y de 85.861 ± 3.982 en los animales procesados a los 12 meses de edad (Figura 4.31). Estos valores fueron similares a los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio realizados en ratas SD (84.682 ± 7.601 ; n=14; Nadal-Nicolás y cols., 2009) y confirmaban que la población de estas CGR Brn3a positivas no sufría variaciones durante sus primeros 12 meses de vida.

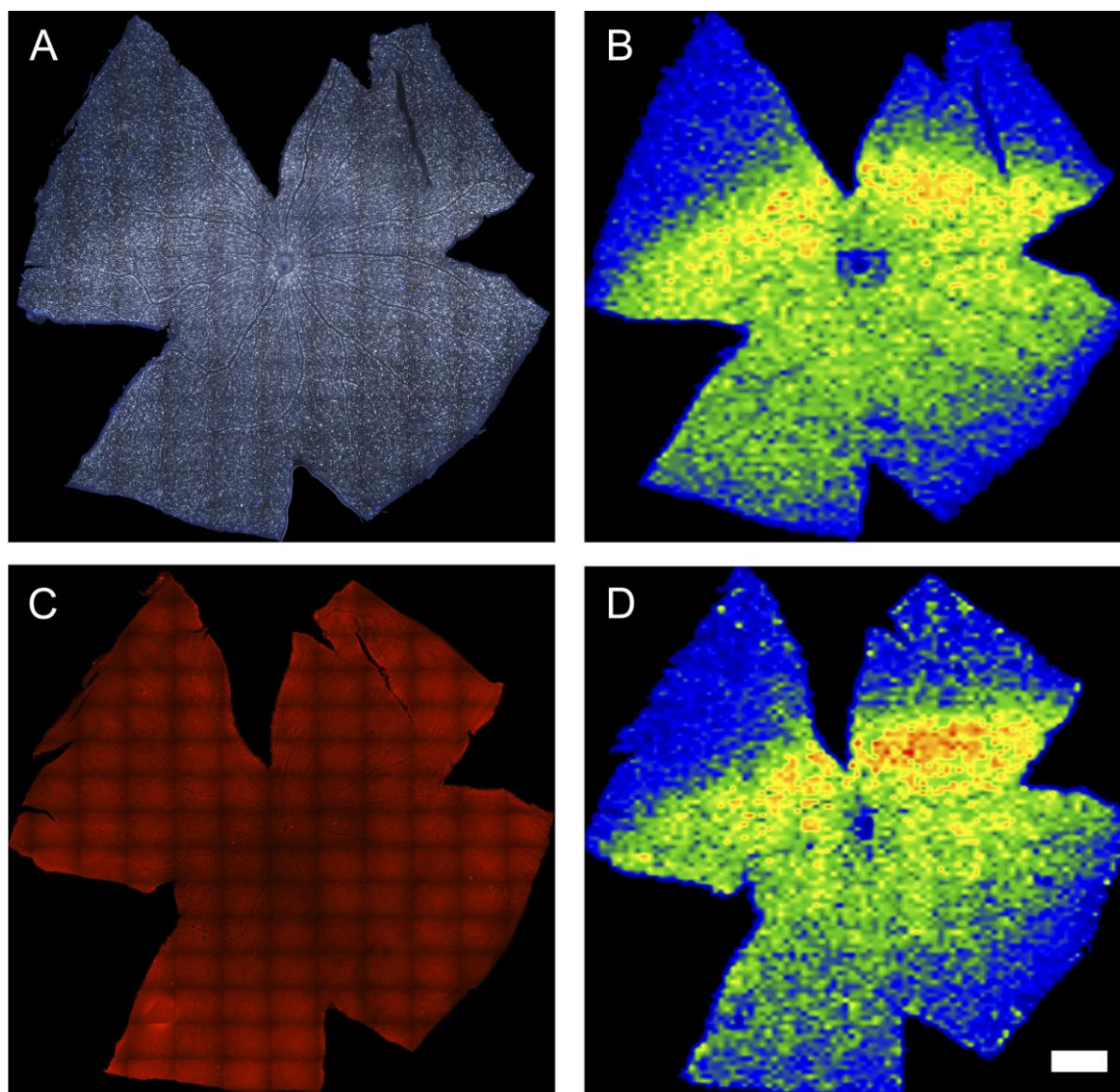


Figura 4.31. Población de células ganglionares de la retina en retinas control de animales de 12 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de un animal SD control de 12 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

4.2.3.2. Estudio temporal de la población de células ganglionares de la retina tras la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

Se contó la población total de CGR trazadas con FG en las retinas derechas e izquierdas de las ratas P23H-1 procesadas a los diferentes tiempos de supervivencia (Tabla 4.4, 4.5 Figura 4.32). Al realizar la comparación estadística (test Mann-Whitney), no se encontró una diferencia significativa entre los ojos derechos e izquierdos de estos animales, en ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, se observó que el número de CGR trazadas con FG disminuye con la edad en estos animales (Tabla 4.4, 4.5; Figura 4.32), ya que el número medio de CGR trazadas con FG fue de 75.786 ± 1.894 (n=10), 75.184 ± 1.913 (n=10), 76.667 ± 3.576 (n=12), 73.960 ± 4.687 (n=10) y 69.921 ± 3.150 (n=10) en los animales procesados 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el nacimiento, respectivamente (Tabla 4.4, 4.5; Figura 4.32). Cuando se realizó la comparación estadística entre los diferentes tiempos analizados, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el número de CGR contadas en los animales de 12 meses de edad con respecto al número de CGR contadas en los animales procesados a edades más tempranas (Figura 4.32, Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

Al comparar el número de CGR trazadas con FG en las retinas control de las ratas SD y el número de estas CGR contadas en las retinas de las ratas transgénicas P23H-1 (Tabla 4.4, 4.5, 4.6; Figura 4.32), se observó que la población media de CGR era significativamente inferior en la rata P23H-1 para todos los tiempos de estudio (Figura 4.32, Mann-Whitney $p < 0,001$).

Puesto que todas estas retinas habían sido también inmunodetectadas con Brn3a, se procedió a la cuantificación automática del número de CGR Brn3a positivas (Tabla 4.4, 4.5; Figura 4.32). El número medio de CGR Brn3a positivas fue de 81.599 ± 2.903 (n=10), 81.338 ± 2.845 (n=10), 81.372 ± 4.345 (n=12), 77.921 ± 3.476 (n=10) y 74.503 ± 2.795 (n=10) en los animales procesados 1, 3, 6, 9 y 12 meses tras el nacimiento, respectivamente (Tabla 4.4, 4.5; Figura 4.32). No hubo diferencias estadísticamente significativas con el número medio de CGR trazadas con FG a los mismos tiempos de estudio. Además, en consonancia con los resultados cuantitativos de las CGR trazadas con FG, al comparar el número de CGR Brn3a positivas a los diferentes tiempos de estudio, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los animales procesados al año de edad y los procesados edades más tempranas (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), no encontrándose diferencias entre los ojos derechos e izquierdos a ninguno de los tiempos del estudio.

Al comparar la población de CGR Brn3a positivas de las retinas control (ratas SD), con la de las ratas transgénicas P23H-1 se observó que, al igual que ocurría con la población de CGR trazadas con FG, el número medio de CGR Brn3a positivas fue significativamente inferior en la rata P23H-1 para todos los tiempos de estudio (Figura 4.32, Mann-Whitney $p < 0,001$). El número medio de CGR en las ratas P23H-1 más jóvenes fue de un 18% ó 16% menos que en los controles según utilizemos FG o Brn3a para cuantificarlas (Figura 4.32).

Basándonos en estos datos cuantitativos, se construyeron mapas de isodensidad, tanto para la población de CGR trazada con FG como para la inmunodetectada con Brn3a (Figura 4.22-37).

Estos mapas revelaron una distribución de CGR aparentemente normal en las retinas de las ratas P23H-1 procesadas a edades tempranas (Figura 4.33-4.35). Sin embargo, a partir de los 9 meses de edad los colores más cálidos (densidades mayores de CGR, rojos-naranjas) de estos mapas tendían a desaparecer (Figura 4.36). Al año de edad, la desaparición de los colores más cálidos se hace más evidente y se extiende por toda la superficie de la retina (Figura 4.37), indicando que la pérdida de CGR en estos animales ocurre por igual en toda la retina. Calculamos que llegan a perderse a los 12 meses TFE un 18% ó 19% de la población de CGR, según utilicemos FG o Brn3a (Figura 4.32).

Por tanto, con independencia del marcador utilizado para identificar las CGR, podemos decir que las ratas P23H-1 tienen un número menor de CGR que las ratas SD control. Esta diferencia es significativa al mes de vida de los animales transgénicos, cuando la rata aún no es totalmente adulta. Entre los 9 meses y el año de edad, cuando los fotorreceptores se han perdido (ver sección 4.2.1.2) la población de CGR en estos animales disminuye de forma significativa, afectando esta pérdida por igual a toda la superficie de la retina. Con estos resultados podemos concluir que la disminución encontrada en el número medio de CGR es debida a muerte de las mismas y no a un fallo en el transporte axonal retrógrado.

A	Animales control _{P60}		Animales control _{P365}		Animales experimentales (post-natal day)			
	FG		FG		FG		FG	
					P30*		P90*	
	Retina	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda
	79.090	82.653	85.708	87.838	77.828	79.287	76.390	74.908
	77.567	74.237	78.428	84.747	73.614	76.006	77.927	76.376
	76.965	79.478	85.452	83.083	74.602	78.414	72.787	75.860
	82.944	84.076	81.275	82.602	74.696	74.427	74.330	76.121
	86.150	86.657			74.446	74.539	71.010	76.136
Media±DE	80.534±3.492	81.420±4.274	82.715±3.037	84.567±2.049	75.037±1.447	76.534±1.990	74.488±2.468	75.880±5.12
Media±DE	80.981±3.928		83.641±2.751		75.786±1.894		75.184±1.913	

B	Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a		
					P30*		P90*		
	Retina	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
		78.732	87.628	96.730	82.295	82.186	85.186	77.613	76.277
	90.197	93.896	74.683	81.472	77.394	76.525	81.127	79.558	
	87.835	81.566	94.670	92.695	79.276	82.229	83.553	85.085	
	90.263	82.157	82.584	90.761	85.082	84.681	82.525	85.494	
	83.680	90.021			81.395	82.042	80.573	81.576	
Media±DE	86.141±4.410	87.053±4.691	87.166±9.008	86.805±4.978	81.066±2.614	82.132±3.075	81.078±2.024	81.598±3.458	
Media±DE	86.597±4.575		86.986±7.279		81.599±2.903		81.338±2.845		

Tabla 4.4. Número de células ganglionares de la retina en retinas de animales controles y experimentales trazadas retrógradamente con FG e inmunodetectadas con Brn3a.

Número total de células ganglionares de la retina FG⁺ (A) o Brn3a⁺ (B) en las retinas de los animales control (SD) 1 y 12 meses tras su nacimiento (columnas a la izquierda) y P23H-1 uno y 3 meses tras su nacimiento (columnas a la derecha). *Diferencia estadísticamente significativa al ser comparado con los valores obtenidos en las ratas SD control (Mann-Whitney test, p<0,001).

A	Animales experimentales (post-natal day)					
	FG		FG		FG	
	P180*		P270*		P365**	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
	77.908	79.646	75.170	78.068	70.645	62.579
	69.273	75.477	71.912	73.445	71.320	74.508
	74.304	70.358	76.788	72.543	67.472	69.049
	79.670	76.633	76.904	61.423	72.997	69.123
	78.903	80.796	74.904	78.452	72.100	69.417
	79.875	77.171				
Media±DE	76.655±3.788	76.680±3.351	75.135±1.805	72.786±6.158	70.906±1.888	68.935±3.788
Media±DE	76.667±3.576		73.960±4.687		69.921±3.150	

B	Brn3a		Brn3a		Brn3a	
	P180*		P270*		P365**	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
		79.909	84.272	81.380	80.844	76.659
	70.606	82.444	75.471	82.868	79.985	72.388
	79.213	75.330	76.813	80.059	77.434	73.617
	86.821	83.444	80.003	71.423	73.285	76.077
	82.323	84.934	74.076	76.279	73.546	71.488
	83.147	84.023				
Media±DE	80.336±5.000	82.407±3.256	77.549±2.743	78.294±4.045	76.181±2.513	72.824±1.916
Media±DE	81.372±4.345		77.921±3.476		74.503±2.795	

Tabla 4.5. Número de células ganglionares de la retina en retinas de animales controles y experimentales trazadas retrógradamente con FG e inmunodetectadas con Brn3a.

Número total de células ganglionares de la retina FG⁺ (A) o Brn3a⁺ (B) en las retinas de las ratas P23H-1, 6, 9 y 12 meses tras su nacimiento. *Diferencia estadísticamente significativa al ser comparado con las ratas SD control (Mann-Whitney test, p<0,001). ** Diferencia estadísticamente significativa al ser comparado con las ratas SD control y con las ratas P23H-1 en anteriores tiempos de estudio (Kruskal-Wallis, p<0,001).

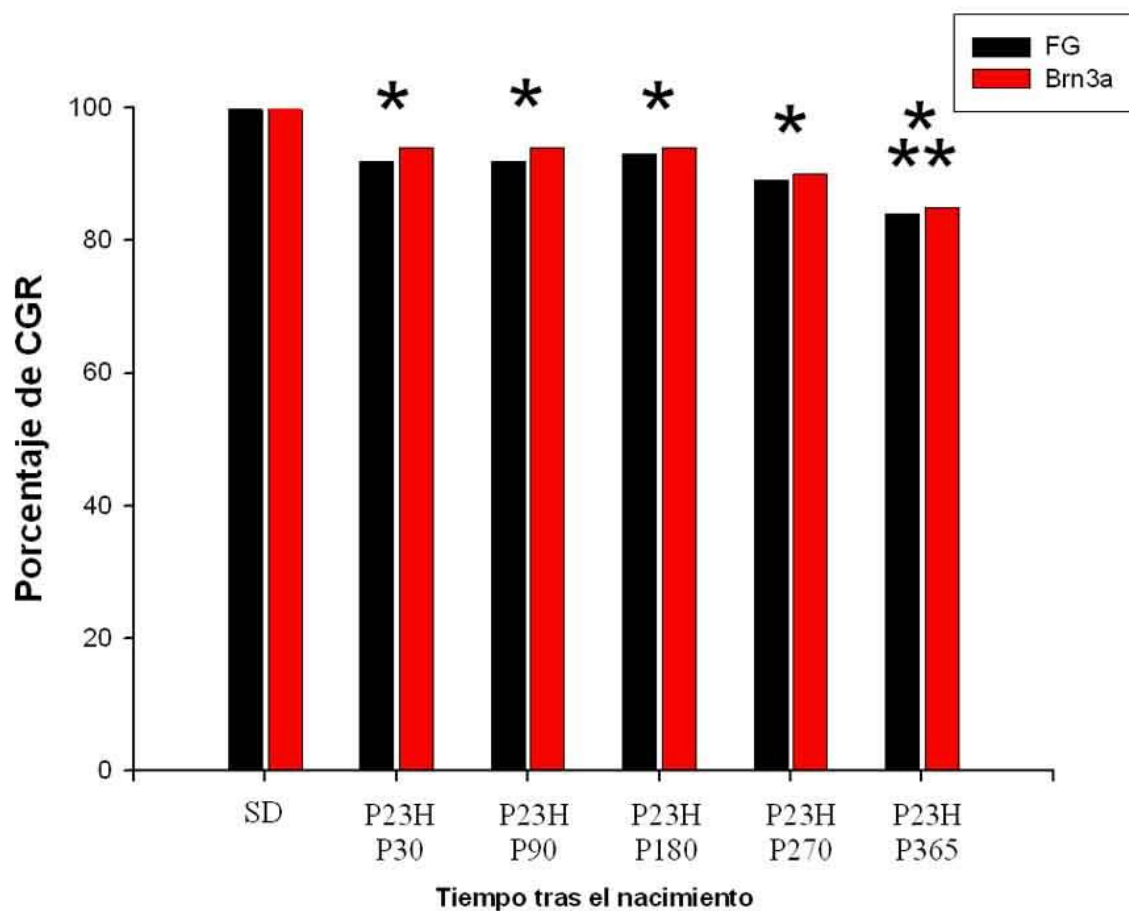


Figura 4.32. Porcentaje de células ganglionares de la retina trazadas con FG e inmunodetectadas con Brn3a en retinas de ratas SD controles y P23H a los diferentes tiempos de estudio.

Porcentaje de células ganglionares de la retina FG^+ o $Brn3a^+$ (barras negras y rojas, respectivamente) en ratas SD control y P23H-1 en los diferentes tiempos de estudio (entre 1 y 12 meses de vida). Se observa que 9 y 12 meses tras el nacimiento de las ratas P23H-1 la población de células ganglionares de la retina se ha reducido. *Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con los valores control (Mann-Whitney $p < 0,001$). **Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con las retinas experimentales de animales procesados a edades más tempranas (Kruskal-Wallis $p < 0,001$).

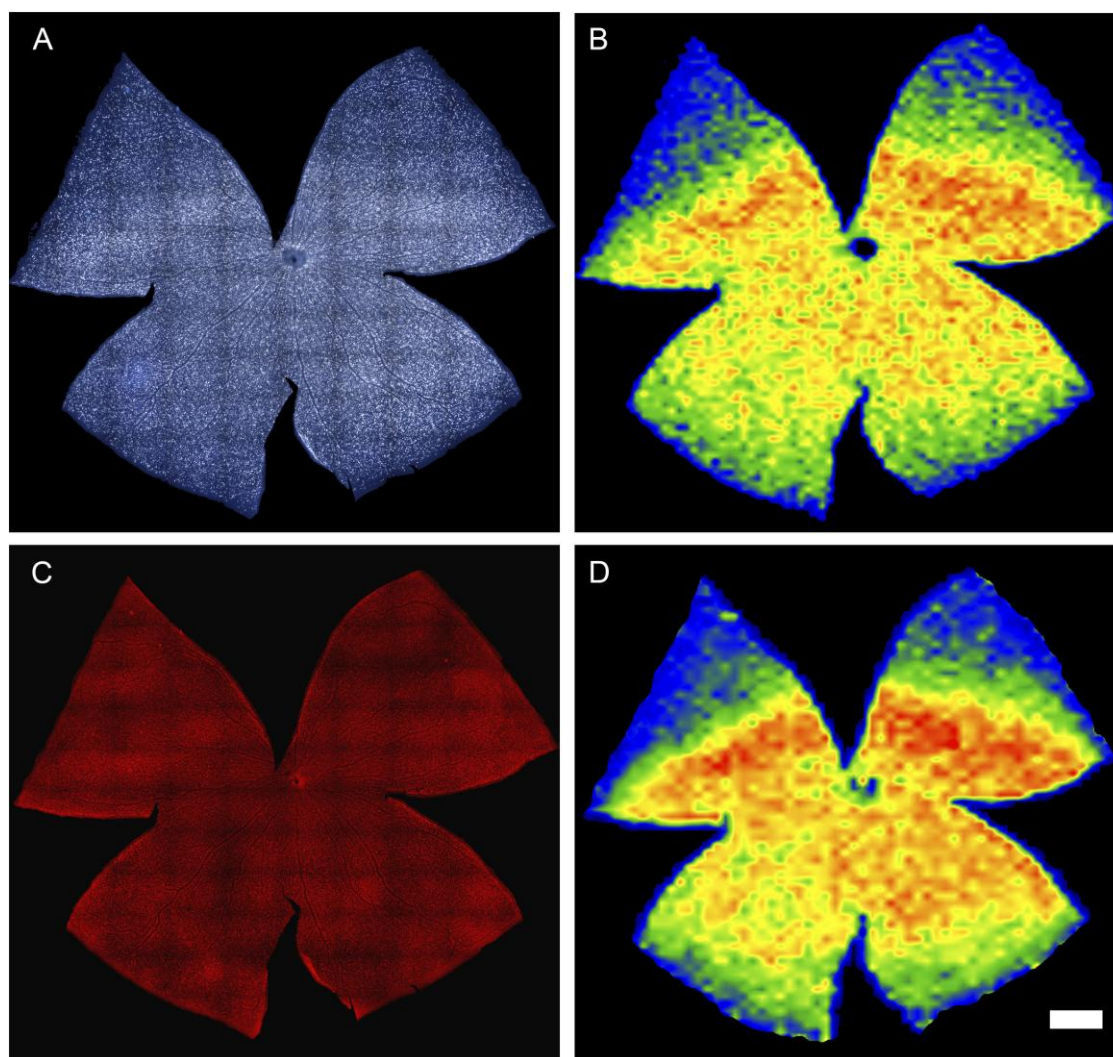


Figura 4.33. Población de células ganglionares de la retina en retinas de ratas P23H de 1 mes de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata P23H-1 de 1 mes de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

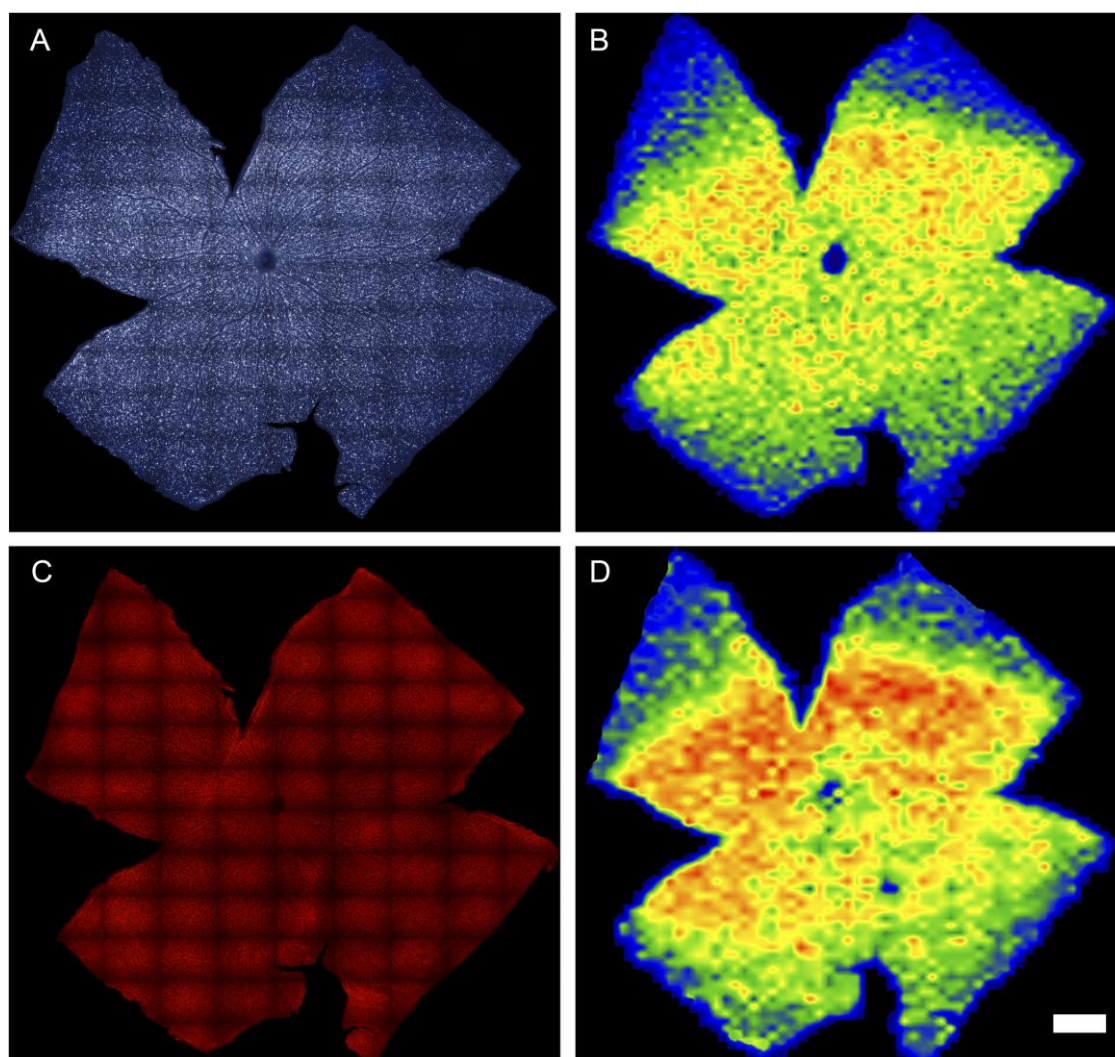


Figura 4.34. Población de células ganglionares de la retina en retinas de ratas P23H de 3 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata P23H-1 de 3 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

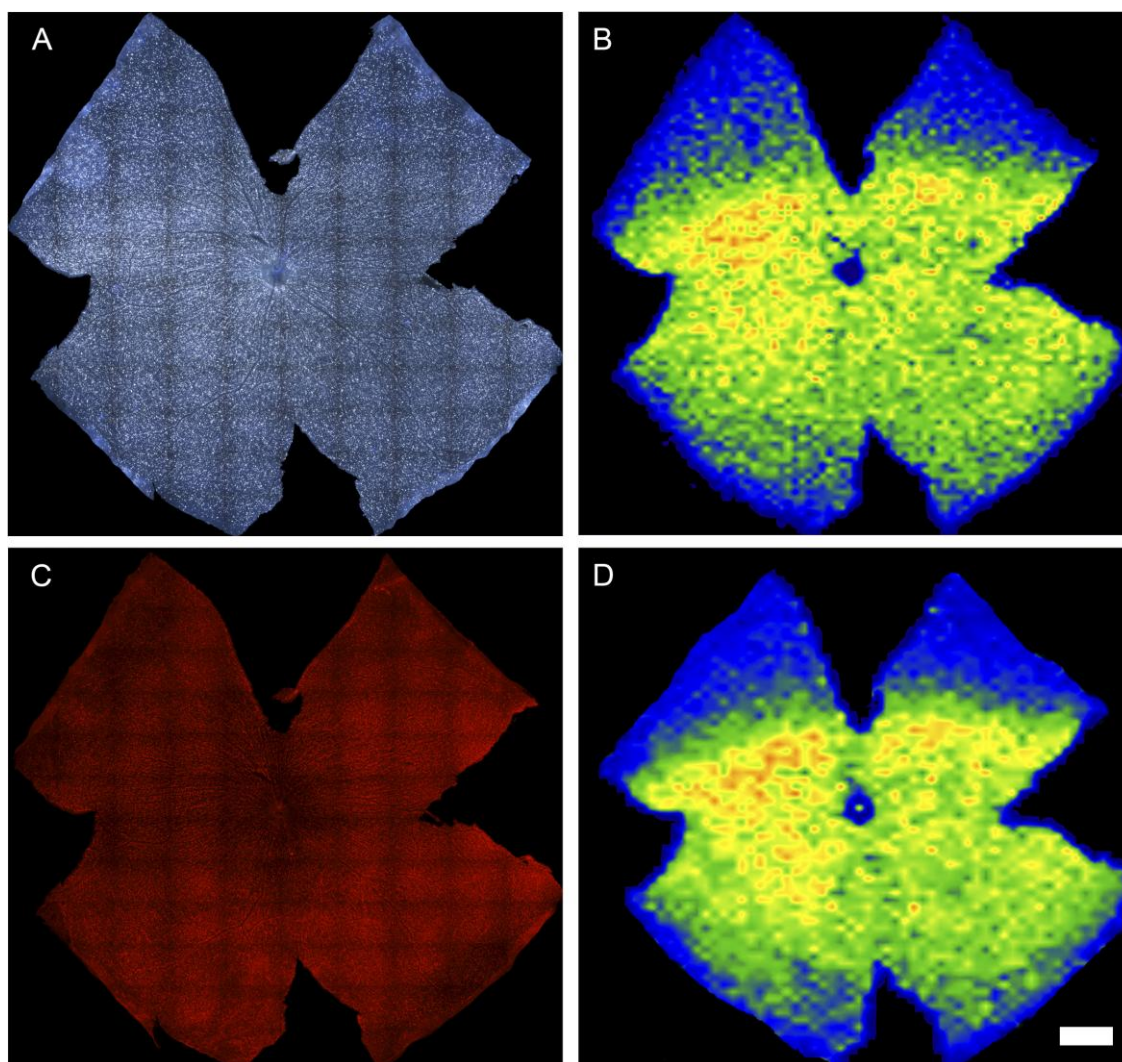


Figura 4.35. Población de células ganglionares de la retina en retinas de ratas P23H de 6 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata P23H-1 de 6 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

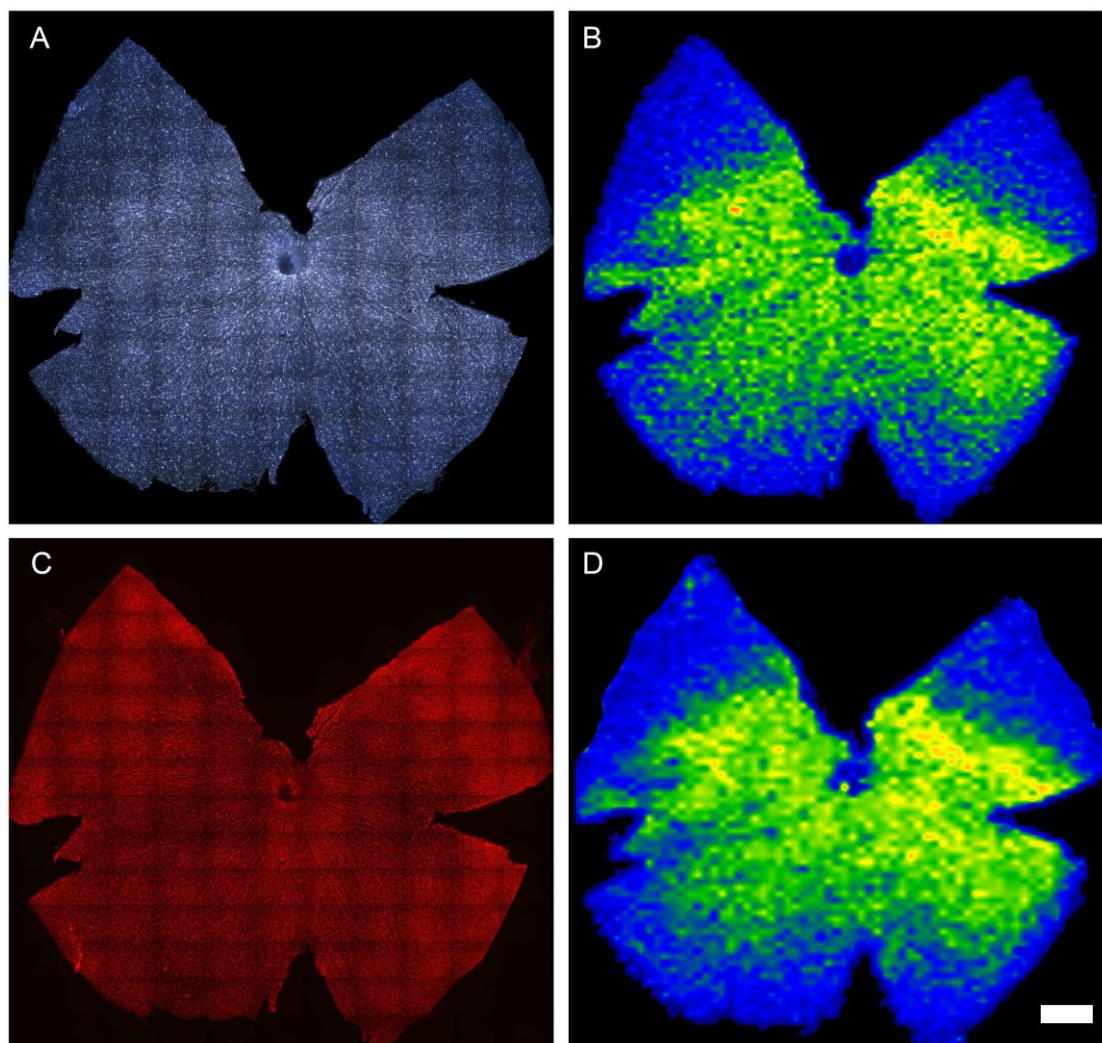


Figura 4.36. Población de células ganglionares de la retina en retinas de ratas P23H de 9 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata P23H-1 de 9 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

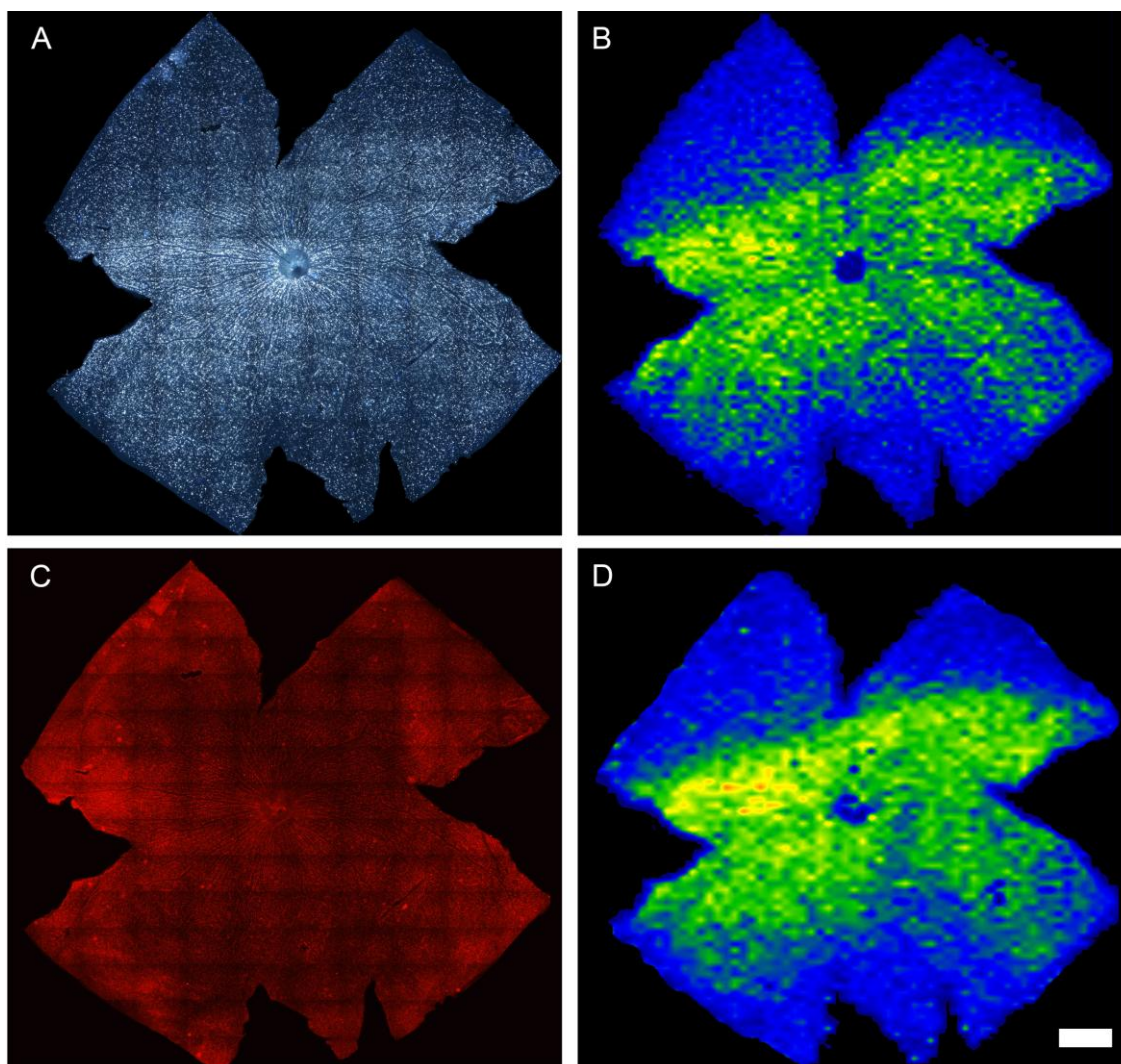


Figura 4.37. Población de células ganglionares de la retina en retinas de ratas P23H de 12 meses de edad.

Reconstrucciones fotográficas (A,C) realizadas con el microscopio de fluorescencia de una retina de una rata P23H-1 de 12 meses de edad. En la fila superior se observa un montaje fotográfico de la retina tomado con el filtro ultravioleta con el que podemos observar las células ganglionares de la retina trazadas con FG (A). En la fila inferior se observa un montaje fotográfico de la misma retina pero esta vez tomado con el filtro de rodamina para capturar la inmunodetección de células ganglionares de la retina con el anticuerpo contra Brn3a (C). En B y D se observa los mapas de isodensidad de células ganglionares correspondientes a las retinas A y C, respectivamente. Barra= 1 mm.

Comparación entre los dos modelos de degeneración de la retina estudiados	
Inducida por fototoxicidad	Hereditaria (P23H-1)
1. Inicio de la degeneración de los fotorreceptores retinianos.	
Rotura de la barrera hemato-retiniana en la zona dorsal de la retina en aproximadamente un 41% de las retinas analizadas.	La degeneración de los fotorreceptores comienza en la zona ventral de la retina.
La degeneración de los fotorreceptores comienza y es más severa en la zona dorsal de la retina.	
2. Pérdida difusa de fotorreceptores.	
Los fotorreceptores retinianos desaparecen de forma casi completa 3 meses tras la exposición a la luz.	Los fotorreceptores retinianos desaparecen de forma casi completa 3 meses tras el nacimiento de los animales, aunque en la zona central de la retina aún se observa una hilera de fotorreceptores.
4. Compresiones axonales.	
Se observan por primera vez 3 meses tras la exposición a la luz.	Se observan por primera vez 6 meses tras el nacimiento de los animales.
En su inicio se observan con mayor frecuencia en la zona dorsal de la retina, aunque con el paso del tiempo se extienden por toda la retina	En su inicio se observan con mayor frecuencia en la zona ventral de la retina, aunque con el tiempo se extienden por toda la retina.
5. Población de células ganglionares de la retina.	
Se observa muerte estadísticamente significativa de CGR 6 meses tras la exposición a la luz. Esta muerte tiene lugar de forma difusa.	La población media de CGRs en estos animales es inferior a la de las Sprague-Dawley, de las que proceden.
Aunque la muerte de las CGR ocurre de forma difusa, 12 meses tras la exposición a la luz se observaron, principalmente en la retina ventral, áreas de pérdida sectorial de CGR.	La muerte de CGR ocurre de forma difusa y tiene lugar entre los 6 y los 12 meses de vida, siendo estadísticamente significativa a los 12 meses de vida. En estos animales no se observaron sectores de pérdida de CGR.
6. Complejos vasculares subretinianos.	
Se observaron en las zonas donde la degeneración de fotorreceptores era prácticamente completa.	
En su inicio se observaron en la zona dorsal de la retina.	En su inicio se observaron en la zona ventral de la retina.

Tabla 4.6. Comparación de los eventos que tienen lugar en los dos tipos de degeneración estudiados.

En esta tabla se resumen los principales eventos que tienen lugar en la degeneración de la retina debida a las 2 etiologías estudiadas: inducida por fototoxicidad (columna de la izquierda) y debida a un defecto genético (columna de la derecha).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

Los resultados de los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral muestran que dos tipos de degeneraciones hereditarias de los fotorreceptores y que tienen etiología diferente; inducida por la luz y hereditaria, producen con el tiempo la afectación de todas las capas de la retina. Es de resaltar que ambos tipos de degeneración provocan alteraciones vasculares que posteriormente comprimen los axones de las CGR y producen la muerte de las mismas.

5.1. DEGENERACIÓN INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD.

Hemos estudiado el efecto de la exposición a la luz de las ratas albinas, demostrando que esta exposición causa en un primer momento una rápida degeneración de fotorreceptores retinianos cuya severidad depende de la fuente de luz utilizada, la región de la retina estudiada y la dilatación pupilar. Tras la muerte de los fotorreceptores tiene lugar una degeneración progresiva de las demás capas de la retina.

5.1.1. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA FOTOTOXICIDAD EN LA RATA ALBINA Y LA PIGMENTADA.

En esta Tesis Doctoral la degeneración de fotorreceptores se indujo en ratas albinas SD a las que se les dilató la pupila izquierda y que posteriormente fueron expuestas a una fuente de luz blanca fría fluorescente de 3.000 lux de intensidad durante 48 horas. En estudios previos realizados en ratas pigmentadas en nuestro laboratorio (Marco-Gomariz y cols., 2006a,b), se expuso a los animales a la misma intensidad de luz pero durante más tiempo (72 horas). Para realizar esta Tesis se redujo la duración de la fotoexposición, ya que en experimentos preliminares, se observó que en la rata albina la fotoexposición durante 72 horas tenía efectos devastadores en la retina (resultados no mostrados en esta Tesis). Al igual que nuestros experimentos mostraban que el daño fototóxico es mayor en ratas albinas que en ratas pigmentadas, otros autores también han mostrado que los animales albinos son más sensibles a la fotoexposición que los pigmentados (Noell y cols., 1966; LaVail y Gorrin, 1987a, b, c; Rapp y Williams, 1980; Wasovicz y cols., 2002). Además otros autores también han documentado que el efecto de la fototoxicidad en la retina de los mamíferos depende de la intensidad de la luz y la duración de la fotoexposición (Li y cols., 1996; Glickman, 2002; Vaughan y cols., 2002).

Nosotros comenzamos el periodo de fotoexposición entre las 10 y las 12 de la mañana, es decir, en periodo de adaptación fotópica. Se ha documentado que la severidad del daño producido por la luz en la retina de los mamíferos depende del ritmo circadiano y del periodo de adaptación a la luz y que la exposición a la luz durante periodos de adaptación a la oscuridad causa un daño más severo que la exposición durante periodos de adaptación a la luz (Organisciak y cols., 1998, 2000; Li y cols., 2001; Vaughan y cols., 2002).

La fototoxicidad retiniana depende también de otros factores como la longitud de onda de la luz utilizada (Remé y cols., 2000; Glickmann, 2002), la edad (Penn y cols., 1985; Organisciak y cols., 1998; Joly y cols., 2006), la temperatura corporal (Organisciak, y cols., 1995; Gorgels y cols., 1997) y la especie o raza de los animales (LaVail, y cols., 1987a,b,c; Remé, 2005). Nosotros hemos utilizado luz blanca fría fluorescente que contiene todas las longitudes de onda y ratas hembra adultas que fueron mantenidas a temperatura ambiente. La fotoexposición se realizó utilizando dos fuentes de luz distintas: unos tubos de luz situados en el techo o un “túnel de luz”, en el que las cajas de los animales quedaban rodeadas por tubos de luz circulares. Aunque la intensidad de la luz en el interior de las cajas fue la misma para ambas fuentes de luz (3.000 ± 100 lux), se observó que el daño por fototoxicidad en la retina fue mayor cuando los animales fueron expuestos al “túnel de luz”.

Nuestros resultados muestran que no es necesario dilatar la pupila para producir una degeneración fototóxica de la retina en ratas albinas, hecho que sí es necesario para producir fototoxicidad retiniana en ratas pigmentadas (Noell y cols., 1966; Rapp y Williams, 1980; LaVail y Gorrin, 1987; Marco-Gomariz y cols., 2006a,b). Aún así, nuestros resultados muestran que si se mantiene una dilatación pupilar en ratas albinas durante del periodo de fotoexposición la degeneración retiniana es mayor, aunque esta diferencia solo es observable durante el primer mes tras la fotoexposición.

5.1.2. EXTRAVASACIÓN DE LA RETINA INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD: EL “ÁREA ARCIFORME”.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio documentaron que la exposición a la luz causa en las ratas pigmentadas dos eventos patológicos claramente diferenciados y que pueden ser debidos a una diferente exposición a la luz de las diferentes regiones de la retina: la degeneración retiniana comienza en un área con morfología arciforme en la región superotemporal de la retina y posteriormente se produce una degeneración en las zonas ventral y central de la retina (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Este “área arciforme” fue observada porque en los montajes globales de la retina se producía en ella una extravasación de peroxidasa durante el primer mes tras la fotoexposición, pero posteriormente se observó en secciones transversales que este área es la que degenera de una forma más severa y rápida tras la fotoexposición (Marco-Gomariz y cols., 2006a), por lo que se pensó que probablemente correspondería al “área fotosensible” que había sido descrita

en la hemirretina superior por otros autores, tanto en ratas normales (Rapp y Williams, 1980; Williams y Howell, 1983; Borges y cols., 1990; Li y cols., 2001; Vaughan y cols., 2002; Tanito y cols., 2007; Marc y cols., 2008) como en ratas transgénicas utilizadas como modelo de retinosis pigmentaria (Vaughan y cols., 2003) después de la fotoexposición.

Todavía no se sabe muy bien la razón por la que este área es más sensible a la luz, pero se han postulado diferentes teorías al respecto (Howell y cols., 1982; Vaughan y cols., 2002, 2003), como que pueda ser debida a una degeneración de la coriocapilar (Marc y cols., 2008), a la composición molecular de los conos/bastones de esa zona de la retina (Cortina y cols., 2003) o a la expresión diferencial en esa zona de diferentes moléculas como la rodopsina (Rapp y Williams, 1977), los retinoides (Maeda y cols., 2009), las sustancias antioxidantes (Bush y cols., 1991; Ohira y cols., 2003; Anderson y Penn, 2004) o los diferentes factores tróficos (Faktorovich y cols., 1992; LaVail y cols., 1992; Ohira y cols., 2003). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sugirieron que esta región de la retina es la más fotosensible porque que es la que recibe más luz, ya que su tamaño disminuye cuando la córnea se tapa parcialmente con conjuntiva y además cambia de lugar cuando se rota el globo ocular previamente a la exposición a la luz de los animales (Marco-Gomariz y cols., 2006b). Además, recientemente se ha documentado en nuestro laboratorio que la retina de la rata presenta en la hemirretina superior una posible “estría visual” que tiene una alta densidad de CGR y conos-L/M y baja densidad en conos-S (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Ortín-Martínez y cols., 2010), el “área arciforme” coincide en parte con esta estría, lo que apoyaría que factores relacionados con la visión de la rata estén relacionados también con la aparición de esta área de degeneración.

En este trabajo hemos mostrado extravasación de peroxidasa en el “área arciforme” de la retina en prácticamente la mitad de las retinas procesadas el primer mes TFE. Esto no quiere decir que no hayamos encontrado un área de mayor sensibilidad a la luz en el resto de los animales fotoexpuestos, ya que en las secciones transversales siempre observamos una mayor afectación en este área de la retina en todos los animales, por lo que podemos deducir que la extravasación de peroxidasa en esta área sólo existe en algunos animales y que es menos frecuente que en ratas pigmentadas (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Otra diferencia que hemos encontrado entre las ratas albinas y las pigmentadas es que la extravasación de peroxidasa en la cepa albina ha sido observada solamente en la primera semana TFE, mientras que en las ratas pigmentadas se observó hasta un mes TFE (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Por todo ello es posible que la severidad y la duración de la extravasación de peroxidasa pueda depender, al menos en parte, de la melanina ocular, ya que es menos frecuente y duradera en las ratas albinas.

5.1.3. DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES POR FOTOTOXICIDAD.

Hemos documentado la degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad utilizando 2 técnicas histológicas: secciones teñidas con hematoxilina y eosina y mediante la detección de núcleos en apoptosis (técnica de TUNEL).

En las secciones teñidas con hematoxilina y eosina examinamos la supervivencia de los fotorreceptores y encontramos una importante pérdida de los mismos que comenzaba inmediatamente después de la fotoexposición. En los primeros tiempos de estudio, esta pérdida era más severa en la hemirretina superior y en los ojos dilatados de los animales expuestos al “túnel de luz”. Sin embargo, a partir de los 3 meses TFE, tanto la CNE como la CPE desaparecieron y la CNI sufrió un adelgazamiento en ambos ojos. Tres meses TFE, la degeneración de los fotorreceptores era similar en los ojos dilatados y no dilatados independientemente de la fuente de luz que había sido utilizada. Este ritmo de pérdida de fotorreceptores es similar al que se había observado previamente en la rata RCS-p+ (Villegas-Pérez y cols., 1998) que sufre una degeneración hereditaria de los fotorreceptores por un defecto genético (ver introducción; Bourne y cols., 1938; D’Cruz y cols., 2000).

Aunque la pérdida de fotorreceptores en las retinas de las ratas fotoexpuestas fue, al menos al principio, más severa en la retina dorsal que en el resto de la retina, la transición entre esta área de la retina y otras áreas con menor afectación no era muy marcada. Otros autores si habían descrito previamente en ratas SD albinas fotoexpuestas un área claramente diferenciada de transición entre ambas zonas (Marc y cols., 2008); esta discrepancia puede ser debida a diferencias en la metodología utilizada, ya que ellos pre-adaptaban a los animales a la oscuridad y utilizaban luz verde.

Cuando comparamos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con los documentados por experimentos previos realizados en nuestro laboratorio en los que se estudió la fotoexposición de ratas pigmentadas (Marco-Gomariz y cols., 2006a, b), podemos observar que la fotoexposición a una misma cantidad de luz (3.000 lux) y durante un periodo superior (72 horas), a los utilizados en esta Tesis Doctoral con ratas albinas, indujo pérdida de fotorreceptores en las ratas pigmentadas, pero solamente en los ojos dilatados (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Además, la pérdida de fotorreceptores en las ratas pigmentadas era algo inferior que la observada en las ratas albinas: la CNE se ve adelgazada hasta un grosor de entre 0 y 1 núcleo a los 4 meses TFE, excepto en el “área arciforme” donde, con el paso del tiempo, la mayoría de las capas retinianas desaparecían (Marco-Gomariz y cols., 2006a). En la rata albina, la degeneración de los fotorreceptores es más severa, a los 3 meses la CNE prácticamente ha desaparecido, con independencia de la dilatación pupilar. Sin embargo, la degeneración en el “área arciforme” no alcanza los niveles observados en las ratas pigmentadas, quedando parte de la retina (CNI, CPI, CCG) también en este área, mientras que en las ratas pigmentadas prácticamente desaparecía toda la retina en el “área arciforme”. Por tanto, aunque las ratas albinas son más sensibles a la luz que las ratas pigmentadas, ya que para obtener un nivel de degeneración retiniana similar es necesario un periodo de fotoexposición inferior, la degeneración que tiene lugar a largo plazo en la retina superior es menor en las ratas albinas. Además, la

degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad se extiende con el tiempo por toda la retina, llegando la CNE a desaparecer en toda la retina, excepto en la extrema periferia, tanto en las ratas albinas como en las pigmentadas.

La técnica de TUNEL nos permitió demostrar que la exposición a la luz induce muerte de fotorreceptores que está mediada por apoptosis, en concordancia con otros estudios anteriores (Wenzel y cols., 2005). Aunque mediante la tinción con hematoxilina y eosina se observó que la muerte de los fotorreceptores se producía durante al menos los 3 primeros meses TFE, solamente observamos núcleos TUNEL positivos en las retinas procesadas en la primera semana TFE. Aunque aparentemente este dato pueda parecer una discrepancia, podría deberse a que la apoptosis es un proceso que se completa en pocas horas, y sólo podemos por ello detectarla durante la primera semana TFE que es cuando mueren la mayor parte de los fotorreceptores: al haber entonces muchos fotorreceptores muriendo, podemos captar unos pocos en apoptosis. Por otro lado, puede ser que no todos los fotorreceptores que mueren por fototoxicidad mueran por apoptosis, tal y como ha sido sugerido recientemente (Yu y cols., 2007; Sancho-Pelluz y cols., 2008). Es más, la muerte de fotorreceptores inducida por fototoxicidad puede ser un escenario mucho más complejo que el expuesto hasta ahora, ya que se ha documentado que diferentes tipos de luz pueden inducir diferentes vías de apoptosis (Hao y cols., 2002) y que la degeneración de los fotorreceptores en las degeneraciones hereditarias no siempre es debida a muerte celular programada (Sancho-Pelluz y cols., 2008), aunque se admite que la apoptosis es la principal vía de muerte celular en las degeneraciones de los fotorreceptores (Wright y cols., 2010).

5.1.4. MUERTE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

Varios autores han propuesto que tras la pérdida de fotorreceptores inducida por fototoxicidad existe una importante degeneración y remodelación de toda la retina, incluyendo la retina interna (revisado por: Marc y cols., 2008), pero nosotros hemos sido los primeros en cuantificar la afectación de las CGR después de la muerte de fotorreceptores por fototoxicidad.

El anticuerpo monoclonal RT97 reconoce la isoforma fosforilada de la subunidad pesada de los neurofilamentos (pNFH). Trabajos previos han descrito que la expresión de pNFH en las retinas normales se limita a la porción más distal de los axones intrarretinianos (Drager y Hofbauer, 1984; Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1996, 1998; Nixon y cols., 1989). Sin embargo, se han observado alteraciones en la expresión normal del patrón de pNFH en las retinas en las que las CGR han sufrido una lesión axonal, como sección del nervio óptico (Parrilla-Reverter y cols., 2009b), aplastamiento (Dieterich y cols., 2002; Parrilla-Reverter y cols., 2009b), elevación de la presión intraocular (Soto y cols., 2008; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010) y degeneraciones de los fotorreceptores, tanto inducidas por fototoxicidad (Marco-Gomariz y cols., 2006a; García-Ayuso y cols., 2011) como hereditarias (García-Ayuso y cols., 2010), en estas retinas se observa una

expresión aberrante de pNFH en la porción proximal de los axones intrarretinianos, así como en un número variable de somas celulares y dendritas de las CGR (Drager y Hofbauer, 1984; Dieterich y cols., 2002; Soto y cols., 2008), siguiendo un patrón que ha sido descrito por nuestro grupo como una señal de degeneración neuronal (Parrilla-Reverter y cols., 2009b, Salinas-Navarro y cols., 2010).

Nuestros resultados muestran una expresión de pNFH normal en las retinas de los animales procesados en los primeros 3 meses TFE. A partir de ese tiempo TFE se observaron algunos somas y dendritas de CGR que expresaban pNFH y además, los axones de las CGR presentaban trayectorias distorsionadas causadas por compresión axonal. Estas compresiones axonales comenzaban a aparecer en estos animales fotoexpuestos en la retina dorsal, eran más severas y frecuentes conforme aumentaba el tiempo TFE y eran similares a las que nuestro grupo había descrito con anterioridad en ratas y ratones con degeneración hereditaria de los fotorreceptores (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003) y en las ratas pigmentadas tras fototoxicidad (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Sabemos que estas compresiones se deben a vasos que cruzan la capa de las fibras nerviosas de la retina y que son arrastrados hacia las capas más externas de la retina. Se cree que este desplazamiento vascular se debe a la tracción que las células del EPR, que migran a través de los vasos más externos después de la degeneración de los fotorreceptores, hacen sobre los vasos más internos (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2000, 2003). Seis meses o más TFE, en las zonas de compresiones se observan “bulbos axonales” y axones vagando por encima y debajo de esas zonas de compresión axonal, lo que sugiere que el transporte axonal se ha visto interrumpido e incluso que algunos axones han sido seccionados. Estas alteraciones axonales justifican la reducción en el número de CGR cuantificadas a largo plazo TFE (ver más adelante).

Alrededor de 6 meses TFE observamos la aparición de “complejos vasculares” bajo el EPR, que se sitúan entre éste y la membrana de Bruch. Estos “complejos vasculares” han sido descritos anteriormente por nuestro grupo en las ratas RCS-p+ y en las ratas pigmentadas tras fototoxicidad (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a) y se han llamado así porque contienen vasos que tienen trayectorias tortuosas en forma de ovillos. En nuestros animales los “complejos vasculares” eran menos frecuentes que en los dos modelos anteriores de nuestro grupo a los que acabamos de referirnos y, tal y como había sido descrito anteriormente, estos ovillos no estaban conectados con la vascularización coroidea, sino con los vasos verticales que cruzaban la retina desde el plexo vascular más interno causando la compresión de los axones de las CGR. Se desconoce porque se forman estos “complejos vasculares” pero se ha propuesto que son vasos del plexo vascular externo de la retina que al degenerar los fotorreceptores entran en contacto con el EPR que los envuelve y los pliega al migrar sobre ellos (Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a). Como la migración de las células del epitelio pigmentario continúa desde estos “complejos vasculares” hacia la retina más interna rodeando a los vasos, en su migración traccionan hacia fuera los vasos más internos de la retina, causando así la compresión de los axones de las CGR (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a).

La cuantificación de CGR llevada a cabo en esta Tesis Doctoral demuestra que el número de CGR presentes en las retinas de los animales experimentales disminuye de una forma estadísticamente significativa a partir de los 6 meses TFE en ambos ojos. Así pues, la degeneración de las CGR se observa tras la pérdida prácticamente completa de los fotorreceptores retinianos, tal y como se había documentado anteriormente en otros modelos animales de degeneración de fotorreceptores (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Marco-Gomariz y cols., 2006a). La pérdida de CGR observada fue siempre similar en ojos derechos e izquierdos (dilatados y no dilatados) en todos los periodos después de la fotoexposición, por lo que no se afectó por la dilatación pupilar. Es posible que esto se deba a que la pérdida de fotorreceptores en la rata albina alcanza niveles similares en los ojos dilatados y los no dilatados a partir de los 3 meses TFE y que estas alteraciones axonales no aparecen hasta 6 meses TFE.

Los mapas de isodensidad que realizamos con los contajes de células ganglionares ilustran gráficamente la pérdida de éstas células con el tiempo después de la fotoexposición y muestran que la muerte de CGR no es homogénea por toda la retina, ya que revelan la aparición de sectores sin CGR en algunos de los animales procesados 12 meses TFE. Estos sectores de pérdida de CGR habían sido descritos previamente en las ratas RCS-p+ (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998) y en las ratas pigmentadas tras la exposición a la luz (Marco-Gomariz y cols., 2006a) y se había postulado que son debidos a la muerte de las CGR ocasionada por el estrangulamiento axonal llevado a cabo por los vasos de retina interna (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Marco-Gomariz y cols., 2006a).

Dado que el FG es un trazador neuronal retrógrado, podría ser que con este trazador estuviéramos identificando las CGR que conservaran su transporte axonal retrógrado y no toda la población de CGR, y que estuviéramos observando sectores carentes de CGR porque estas células hubieran perdido su capacidad de transporte axonal retrógrado pero no hubieran muerto. Para estudiar este hecho, en algunos animales se marcaron las CGR doblemente, con FG y con inmunodetección de un marcador intrínseco, el factor de transcripción Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009). Los resultados de estos experimentos mostraron, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, una disminución similar en el número de CGR trazadas con FG e inmunodetectadas con Brn3a, por lo que podemos confirmar que la disminución en el número de CGR observada tras la pérdida de los fotorreceptores retinianos inducida por fototoxicidad se debe a muerte de estas células.

La pérdida de CGR como evento secundario a la muerte de los fotorreceptores retinianos es un fenómeno común, que ha sido descrito en ratas RCS distróficas (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2003), en ratones rd (Wang y cols., 2000) y en ratas albinas (García-Ayuso y cols., 2011) y pigmentadas (Marco-Gomariz y cols., 2006a) tras la exposición a la luz. Como hemos señalado antes, la pérdida de CGR se debe a que los vasos sanguíneos que cruzan la capa de fibras ópticas, arrastran los axones de las CGR, comprimiéndolos y dañándolos (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; García-Ayuso y cols., 2009). Hasta ahora se había propuesto que existía una remodelación retiniana, que afectaba a retina interna,

tras la pérdida de fotorreceptores (Marc y cols., 2008), pero nosotros hemos sido los primeros en cuantificar, en detalle, la afectación de las CGR.

Resumiendo, los experimentos que hemos llevado a cabo en ratas albinas expuestas a luz intensa han documentado que la luz causa muerte por apoptosis de los fotorreceptores, con un pico máximo inmediatamente TFE y que se localiza en la región dorsal de la retina, aunque posteriormente se extiende a toda la retina. Como evento secundario a la degeneración de los fotorreceptores retinianos y debido a compresión axonal por vasos retinianos desplazados, las CGR se ven afectadas y mueren a largo plazo.

5.2. DEGENERACIÓN HEREDITARIA DE LOS FOTORRECEPTORES.

Hemos utilizado ratas hembra albinas P23H homocigóticas de la línea 1 para estudiar si la pérdida progresiva de fotorreceptores que tiene lugar en estos animales afecta también, con el tiempo, a la retina interna. Los resultados de esta Tesis Doctoral revelan que estas ratas tienen un número medio de CGR inferior al de las ratas SD y que la degeneración retiniana afecta, a largo plazo, a todas las capas de la retina, causando alteraciones vasculares y axonales que tienen como consecuencia la muerte de las CGR.

5.2.1. POBLACIÓN DE CGR EN LA RATA P23H-1.

Nuestros resultados documentan que el número medio de CGR en las retinas de las ratas P23H-1 es inferior al encontrado en las retinas de su cepa homóloga, la SD. Estudios previos de nuestro laboratorio habían documentado utilizando FG como marcador que las ratas pigmentadas PVG tienen un número medio de CGR significativamente mayor que las ratas albinas SD (Salinas-Navarro y cols., 2009a) y este hecho ha sido posteriormente confirmado utilizando Brn3a como marcador (Nadal-Nicolás y cols., observaciones sin publicar).

Varios autores han estimado el número de CGR en las retinas de ratas de diferentes cepas, pero solamente Danias y cols. (2002, 2006) han podido contar, como se hace en nuestro laboratorio, la retina completa de forma automática. Estos autores encontraron un número mayor de CGR en las ratas albinas Wistar (97.609 ± 3.930 ; Danias y cols., 2002) y un número inferior en ratas Brown-Norway adultas (73.490 ± 9.395 ; Danias y cols., 2006). Las diferencias en el número de CGR entre los diferentes estudios pueden ser debidas a la estirpe estudiada, el género o la edad de los animales.

En este estudio documentamos que las ratas P23H-1 tienen menor número de CGR que las ratas SD, no esperábamos encontrar este dato ya que la rata P23H-1 procede de la SD, y nosotros

siempre utilizamos hembras de edades similares. No sabemos a qué se debe el menor número de CGR que muestra la rata P23H-1 pero pensamos que quizás sea debido a que la mutación de la rodopsina que estas ratas presentan podría quizás afectar al desarrollo de la retina interna. Por otra parte, Pennesi y cols. (2008) describieron en las líneas de las ratas P23H heterocigóticas y de ratas S334ter (una cepa con otra mutación de la rodopsina, para revisión ver introducción) que sufren una degeneración rápida de los fotorreceptores, similar a la observada en la línea P23H-1 utilizada en esta tesis, que el plexo capilar profundo, que abastece la retina interna, no se desarrolla correctamente, por lo que se podría especular sobre la posibilidad de que en las ratas P23H-1 el desarrollo vascular de la retina interna sea anormal y que por ello disminuya el número de CGR.

5.2.2. DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES Y ALTERACIONES VASCULARES.

En la DMAE y la retinosis pigmentaria, la pérdida de fotorreceptores conduce a la ceguera de manera irreversible, principalmente por la pérdida de conos, que en la retinosis pigmentaria es secundaria a la apoptosis de los bastones (Shelley y cols., 2009). Algunos autores han descrito que la degeneración de los conos depende espacial y temporalmente de la degeneración de los bastones (Cideciyan y cols., 1998; Hicks y Sahel, 1999). Otros autores han descrito la dependencia de los conos y los bastones en las ratas P23H, proponiendo que el nivel de afectación de los conos está directamente relacionado con la cantidad de bastones que han degenerado (Chrysostomou y cols., 2009b). Se ha propuesto que la apoptosis de los conos está provocada por la difusión de diferentes sustancias (Chrysostomou y cols., 2009b), como factores pro-apoptóticos procedentes de bastones asociados en degeneración. Como alternativa, se ha propuesto que los bastones en degeneración no pueden sustentar a sus conos asociados mediante la difusión de nutrientes, causando, por consiguiente, su muerte (Ribelayga y cols., 2008).

Existen 3 líneas diferentes de ratas P23H, que pueden ser además homocigóticas o heterocigóticas. La principal diferencia estriba en que las homocigóticas sufren una degeneración de los fotorreceptores más rápida y severa que las heterocigóticas, de forma que al mes de vida las ratas homocigóticas han perdido aproximadamente el 60% de sus fotorreceptores, mientras que a esa edad las heterocigóticas han perdido en torno al 40% de los mismos, siendo esta pérdida más pronunciada, al menos al principio, en la retina ventral (Machida y cols., 2000; Pennesi y cols., 2008). Nuestros resultados demuestran que en las ratas P23H homocigóticas 6 meses tras el nacimiento solamente quedan unos pocos fotorreceptores en la CNE y que es en este momento cuando comienzan a aparecer los “complejos vasculares” bajo el EPR, en concordancia con el estudio realizado por Pennesi y colaboradores (2008). Por lo que se puede concluir que estos “complejos vasculares” solamente aparecen en la rata P23H-1 tras la pérdida de la práctica totalidad de los fotorreceptores retinianos, como ha sido documentado con anterioridad en otros modelos experimentales como la rata RCS (Villegas-Pérez y cols., 1998) y en la rata pigmentada (Marco-

Gomariz y cols., 2006a) y la rata albina tras la degeneración de los fotorreceptores por fototoxicidad (ver apartado 5.1.4 más arriba; García-Ayuso y cols., 2011).

Tanto los “complejos vasculares” (para discusión ver apartado 5.1.4) como las compresiones axonales en la CFN aparecen en la rata P23H-1 seis meses tras el nacimiento. Las compresiones axonales observadas corresponden a zonas de cruce entre los vasos retinianos y los axones de las CGR, y en estos animales comienzan a aparecer en la zona ventral de la retina, tal y como había sido observado en las ratas RCS-p+ (Villegas-Pérez y cols., 1998). Sin embargo, en las degeneraciones de los fotorreceptores inducidas por fototoxicidad estos puntos de compresión axonal comienzan a aparecer en la zona dorsal de la retina (Marco-Gomariz y cols., 2006a). Ya que la pérdida de fotorreceptores es más severa en la retina ventral en las ratas P23H y las RCS-p+ (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2003) y en la zona dorsal en las ratas con degeneración inducida por fototoxicidad (Marco-Gomariz y cols., 2006a), la formación de los “complejos vasculares” y la aparición de áreas de compresión axonal tiene lugar primero en las zonas de la retina con una degeneración más severa de los fotorreceptores, lo que nos permite diferenciar entre las degeneraciones hereditarias y las inducidas por fototoxicidad.

5.2.3. MUERTE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

El primer síntoma de degeneración de las CGR en ratas P23H-1 se observó 6 meses tras el nacimiento, momento en que los axones de las CGR muestran un incremento a la inmunoreactividad del pNFH que se extiende a algunos cuerpos celulares. Posteriormente, 12 meses tras el nacimiento, se observaron signos de interrupción axonal (“bulbos axonales” y regeneración axonal abortiva), en las zonas de estrangulamiento axonal. Se ha observado una expresión anómala del patrón de pNFH tras diferentes lesiones retinianas (para revisión ver apartado 5.1.4.).

Los resultados de este estudio, además de documentar que el número de CGR es menor en las ratas P23H-1 que en las SD, también documentan que el número medio de CGR disminuye en la rata P23H-1 a partir de los 6 meses de edad y que, aunque la población de CGR es menor a los 9 meses de vida, no muestra una disminución estadísticamente significativa hasta los 12 meses de edad. La pérdida de CGR tiene lugar cuando solamente quedan unos pocos fotorreceptores en la retina, y esta condición concuerda con estudios anteriores que habían documentado afectación de la retina interna (Jones y Marc, 2005; Pennesi y cols., 2008) y pérdida de CGR (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Marco-Gomariz y cols., 2006a) tras la pérdida de la práctica totalidad de fotorreceptores retinianos, ya sea hereditaria (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Jones y cols., 2003; García-Ayuso y cols., 2010) o inducida (Marco-Gomariz y cols., 2006a; García-Ayuso y cols., 2009).

Al igual que en el modelo de fototoxicidad (ver apartado 5.1.4.), dado que el FG se transporta retrógradamente desde el colículo superior, también cuantificamos el número de CGR

inmunodetectadas con Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009) en las mismas retinas, de esta manera podíamos descartar que el descenso en el número de CGR trazadas con FG fuese debido a un problema de transporte axonal tal y como había sido propuesto por otros autores en ratas RCS (Sposato y cols., 2008). Nuestros resultados documentan que la disminución del número de CGR trazadas con FG no es debida a un problema de transporte axonal, ya que describimos un descenso similar, con la edad, en el número de las CGR trazadas con FG e inmunodetectadas con Brn3a, por lo que la reducción en la población de CGR se debe a la muerte de estas células. Otros autores habían propuesto que la rata RCS-p+, con degeneración hereditaria de los fotorreceptores, mostraba un transporte retrógrado normal desde el colículo superior hasta los 6 meses de edad, último tiempo que estudiaron (Pavlidis y cols., 2000) y que no mostraba una disminución significativa en el transporte retrógrado o anterógrado hasta el último tiempo de estudio, aproximadamente 17 meses de edad (Eisenfeld y cols., 1984), lo que concuerda con los resultados que mostramos en la rata P23H-1, en la que no encontramos una alteración del transporte axonal retrógrado en ninguno de los tiempos estudiados.

La pérdida de CGR como evento secundario a la muerte de los fotorreceptores retinianos es un fenómeno común, que ha sido descrito en distintos modelos animales de degeneración de fotorreceptores, pero que hasta la realización de esta Tesis Doctoral no había sido cuantificada en detalle (para revisión ver apartado 5.1.4.).

Resumiendo, nuestros resultados demuestran que las ratas P23H-1 tienen un número inferior de CGR que las ratas SD en todos los tiempos de supervivencia estudiados y muestran una disminución de CGR entre los 6 y los 12 meses de vida del animal. Esta degeneración de CGR ocurre como evento secundario a la muerte de fotorreceptores retinianos, condición que viene seguida de una desorganización de retina interna que causa daños en los axones de las CGR. Como esto ocurre tras la muerte de fotorreceptores, estas anomalías comienzan a observarse en la retina ventral, son progresivas y aumentan con la edad.

5.3. COMPARACIÓN ENTRE LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR FOTOTOXICIDAD Y LA HEREDITARIA.

En las degeneraciones retinianas, la pérdida de fotorreceptores es sólo el inicio de una remodelación neuronal progresiva. Los modelos animales de degeneración retiniana, bien por mutaciones espontáneas (naturales) o por manipulaciones genéticas, han demostrado ser una herramienta importante para la investigación en visión y muchos de ellos han sido estudiados haciendo hincapié principalmente en la degeneración de los fotorreceptores (Chang y cols., 2002; Baehr y Frederick, 2009; Rivas y Vecino, 2009). Marc y colaboradores (2003) demostraron que tras esta degeneración tenía lugar una remodelación retiniana que ocurría en diferentes fases que eran comunes a los distintos modelos animales. Sin embargo la variabilidad entre los distintos modelos

animales en el inicio de la degeneración de fotorreceptores, la variación en el grado de supervivencia de los conos o el solapamiento existente en muchos casos entre el desarrollo de la retina y la expresión de un defecto genético, han sido algunos de los factores que han impedido una mejor comprensión de la cronología y el patrón espacial de la remodelación retiniana tras la pérdida de los fotorreceptores. El modelo de fototoxicidad en rata albina ha sido un modelo muy estudiado hasta ahora, y tiene la principal ventaja de que podemos asegurarnos que la afectación de los fotorreceptores tiene lugar cuando la retina es madura.

A pesar de la popularidad que han alcanzado los modelos de degeneración retiniana inducida por fototoxicidad, utilizados principalmente para estudiar neuroprotección, son muchos los que cuestionan su relevancia en el estudio de las enfermedades retinianas humanas. Sin embargo los modelos de degeneración retiniana por fototoxicidad abarcan los rasgos más característicos de la DMAE humana y suponen un modelo reproducible de ruptura del complejo coriocapilar-EPR-Membrana de Bruch (Marc y cols., 2008).

Tanto las degeneraciones hereditarias como las inducidas por fototoxicidad muestran una regionalidad en la degeneración de los fotorreceptores retinianos (Organisciak y Vaughan, 2010; Marc y cols., 2003). Nuestros resultados confirman este hecho, ya que tal y como habían propuesto otros autores, hemos observado que existe una degeneración de fotorreceptores más rápida y severa en la retina dorsal tras la fototoxicidad y que esta degeneración es más severa en la retina ventral en la rata P23H. Esta regionalidad se mantiene cuando estudiamos la afectación de retina interna, ya que la aparición de vasos verticales que cruzan la retina arrastrando y comprimiendo los axones de las CGR también aparece antes y con mayor frecuencia en la retina dorsal en el modelo de fototoxicidad y en la ventral en las ratas P23H. Así, la afectación de retina interna sigue el patrón espacial de la degeneración de retina externa.

La cuantificación de CGR revela que en el modelo de fototoxicidad existe una disminución estadísticamente significativa en la población media de éstas 6 meses TFE, mientras que en la rata P23H ocurre al año de edad. Este hecho puede ser debido a que la pérdida de fotorreceptores en nuestro modelo de fototoxicidad ocurre con mayor rapidez que en las ratas P23H, por lo que parece lógico que la afectación de retina interna ocurra antes en estos animales.

Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que la muerte de fotorreceptores retinianos afecta a largo plazo a todas las capas de la retina produciendo alteraciones vasculares y axonales que acaban por provocar la muerte de las CGR, con independencia de la etiología de la degeneración. Finalmente, ya que estos eventos degenerativos han sido descritos previamente en animales pigmentados con degeneración hereditaria de los fotorreceptores o inducida por fototoxicidad (Villegas-Pérez y cols., 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006a; para revisión ver apartado 5.1.4.), podemos decir que se deben a una respuesta retiniana secundaria a la degeneración de los fotorreceptores y que no depende, al menos en parte, de la pigmentación ocular. Por otro lado, la localización espacial de estos eventos patológicos es diferente según la degeneración sea hereditaria o inducida por fototoxicidad, por lo que deben ser estudiados en detalle

para poder comprenderlos mejor y planificar diferentes estrategias de neuroprotección o tratamientos para estas enfermedades.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral:

1. Del modelo experimental de fototoxicidad retiniana en el que se realiza la exposición de ratas hembra albinas Sprague-Dawley adultas a 3.000 luxes de luz blanca fría fluorescente durante 48 horas, concluimos que:

- 1.1. La exposición a la luz induce muerte de fotorreceptores, principalmente por la vía de la apoptosis.
- 1.2. La muerte de fotorreceptores depende de la localización de los tubos de luz y de la dilatación pupilar, pero solamente en los primeros tiempos de estudio.
- 1.3. La exposición a la luz induce, en algunos animales, en los primeros 7 días TFE una ruptura de la barrera hemato-retiniana en un "área arciforme" situada en la retina superior.
- 1.4. La exposición a la luz induce una mayor muerte de fotorreceptores en la región dorsal media de la retina en los primeros tiempos de estudio pero posteriormente se extiende por toda la retina.
- 1.5. La exposición a la luz induce una muerte casi completa de todos los fotorreceptores 3 meses después, comenzando posteriormente la degeneración del resto de las capas de la retina.
- 1.6. La exposición a la luz induce 6 meses más tarde la aparición de "complejos vasculares" subretinianos y compresión de los axones de las células ganglionares por los vasos más internos de la retina que están conectados a los citados complejos vasculares. Estas alteraciones comienzan a observarse en la retina dorsal, pero después se extienden por toda la retina.
- 1.7. La exposición a la luz induce 6 meses más tarde la muerte progresiva de células ganglionares de la retina.

2. Del modelo experimental de degeneración hereditaria de la retina de la rata P23H-1 homocigótica, concluimos que:

- 2.1. Esta especie tiene una población media de células ganglionares de la retina inferior a la de sus ratas homólogas: las Sprague-Dawley.
- 2.2. La muerte de fotorreceptores comienza antes del mes de edad y, en su inicio, es más severa en la retina ventral.
- 2.3. La muerte de fotorreceptores es casi completa a los tres meses de edad, tiempo en el que comienza la degeneración en el resto de las capas de la retina.

- 2.4. A los seis meses de edad se observa la aparición de “complejos vasculares” subretinianos y compresión de los axones de las células ganglionares de la retina. Estas alteraciones comienzan a observarse en la zona ventral de la retina pero después se extienden por toda la retina.
 - 2.5. La afectación de retina interna provoca una disminución en el número de células ganglionares de la retina entre los 6 y los 12 meses de vida, que es significativa a los 12 meses.
3. De la comparación entre los dos modelos experimentales de degeneración de fotorreceptores, concluimos que:
- 3.1. La localización inicial de la degeneración de los fotorreceptores depende de la etiología de la degeneración: en la degeneración inducida por fototoxicidad comienza en la retina dorsal y en la degeneración hereditaria comienza en la retina ventral.
 - 3.2. La localización inicial de las alteraciones vasculares y axonales, depende también de la etiología de la degeneración ya que comienza en la retina dorsal en la degeneración inducida por fototoxicidad y en la retina ventral en la degeneración hereditaria de los fotorreceptores.
 - 3.3. Los eventos que tienen lugar en ambos modelos experimentales son similares, lo que indica que son secundarios a la degeneración de fotorreceptores.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS.

Based on the results obtained in this thesis:

1. From the experimental model of light-induced retinal degeneration in which albino Sprague-Dawley rats were exposed to 3,000 luxes of white fluorescent light during 48 hours, we conclude that:
 - 1.1. Phototoxicity causes photoreceptor death, mainly by apoptosis.
 - 1.2. Photoreceptor loss depends on the light source used and on pupil dilation, but only at early time after light exposure.
 - 1.3. Light exposure causes a breakdown of the blood-retinal barrier in an “arciform area” situated in the superior retina in the first seven days after light exposure.
 - 1.4. Light exposure causes photoreceptor loss which is more severe at early times in the superior mid-dorsal retina. Later, photoreceptor loss spreads all throughout the retina.
 - 1.5. Three months after light exposure the loss of photoreceptors is almost complete, and starts the degeneration of the other retinal layers.
 - 1.6. Six months after light exposure “vascular complexes” appear subretinally and axonal compression is observed at first in the dorsal retina but later throughout the retina. Axonal compression is due to vessels that ran vertically from the inner retinal vascular plexus and are connected with the “vascular complexes”
 - 1.7. Six months or more after light exposure, there is a progressive loss of retinal ganglion cells.

2. From the experimental model of inherited retinal degeneration, the P23H-1 homozygous rat, we conclude that:
 - 2.1. The number of retinal ganglion cells in this strain is lower than in the homologous Sprague-Dawley strain .
 - 2.2. Photoreceptor loss begins before the first month of life and, initially, is more severe in the ventral retina.
 - 2.3. Photoreceptor loss is almost complete at three months of age, and by this time starts the degeneration of the other retinal layers.
 - 2.4. At six months of age “vascular complexes” appear subretinally and axonal compression is observed at first in the ventral retina but later throughout the retina. Axonal compression is due to vessels that ran vertically from the inner retinal vascular plexus and are connected with the “vascular complexes”.
 - 2.5. Between six and twelve months of age there is a progressive loss of retinal ganglion cells and this loss is significant at twelve months of age.

3. From the comparison between the two experimental models of retinal degeneration, we conclude that:

- 3.1. The pattern of photoreceptor loss differs depending on the etiology of the degeneration: it begins in the dorsal retina in the model of light induced retinal degeneration and in the ventral retina in the inherited model.
- 3.2. The location of the vascular and axonal abnormalities differs depending on the etiology of the degeneration: it begins in the dorsal retina in the model of light induced retinal degeneration and in the ventral retina in the inherited model.
- 3.3. The degenerative events observed after photoreceptor degeneration in both models are similar, indicating that they are a consequence of photoreceptor degeneration.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFIA.

- Alarcón-Martínez L, De la Villa P, Salinas-Navarro M, García-Ayuso D, Cánovas I, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2007. Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Functional effects in the albino mice retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: E-Abstract 4354.
- Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Schwartz SB, Roman AJ, Windsor EA, Steinberg JD, Branham K, Othman M, Swaroop A, Jacobson SG. 2007. Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 4759-4765.
- Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Windsor EA, Herrera W, White DA, Kaushal, S, Naidu A, Roman AJ, Schwartz SB, Stone EM, Jacobson SG. 2008. Retinal laminar architecture in human retinitis pigmentosa caused by Rhodopsin gene mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 1580-1590.
- Anderson RE, Penn JS. 2004. Environmental light and heredity are associated with adaptive changes in retinal DHA levels that affect retinal function. *Lipids.* 39: 1121–1124.
- Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J. 1982. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature.* 298: 84-86.
- Baehr W, Frederick JM. 2009. Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision Res.* 49: 2636-2652.
- Battelle BA, LaVail MM. 1978. Rhodopsin content and rod outer segment length in albino rats: modification by dark adaptation. *Exp Eye Res.* 26: 487-497.
- Bell RD, Zlokovic BV. 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica.* 118: 103-113.
- Bok D and Hall MO. 1971. The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J. Cell Biol.* 49: 664–682.
- Borges JM, Edward DP, Tso MO. 1990. A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats. *Curr Eye Res.* 9: 799-803.
- Bourne MC, Campbell DA, Tansley K. 1938. Hereditary degeneration of the rat retina. *Br. J. Ophthalmol.* 22: 613–623.
- Buch H, Vinding T, La Cour M, Appleyard M, Jense GB, Nielsen NV. 2004. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology* 111: 53-61.
- Bush RA, Remé CE, Malnoë A. 1991. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp Eye Res.* 53: 741-752.
- Bush RA, Hawks KV, Sieving PA. 1995. Preservation of inner retinal responses in the aged Royal College of Surgeons rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 2054–2062.
- Campos-Benitez M, Kaufmann AM. 2008. Neurovascular compression findings in hemifacial spasm. *Journal of Neurosurgery.* 109: 416-420.
- Chader JG. 2002. Animals models in research on retinal degenerations: past progress and future hopes. *Vision Res.* 42: 393-399.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. 2002. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vis Res.* 42: 517-525.
- Chen Y, Bedell M, Zhang K. 2010. Age-related macular degeneration: genetic and environmental factors of disease. *Mol Interv.* 10: 271-281.
- Chrysostomou V, Valter K, Stone J. 2009a. Cone-rod dependence in the rat retina: variation with the rate of rod damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3017-3023.

- Chrysostomou V, Stone J, Valter K. 2009b. Life history of cones in the rhodopsinmutant P23H-3 rat: evidence of long-term survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 2407-2416.
- Cideciyan AV, Hood DC, Huang Y, Banin E, Li ZY, Stone EM, Milam AH, Jacobson SG. 1998. Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9: 7103-7108.
- Cideciyan AV, Jacobson SG, Aleman TS, Gu D, Pearce-Kelling SE, Sumaroka A, Acland GM, Aguirre GD. 2005. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 5233-5238.
- Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Friedman DS, Kemepn J, Taylor HR, Mitchel P. 2004. Eye Diseases Prevalence Research group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 122: 447-485.
- Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG. 2003. Light-induced photoreceptor damage triggers DNA repair: differential fate of rods and cones. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 533: 229-240.
- Cuenca N, Pinilla I, Sauvé Y, Lu B, Wang S, Lund RD. 2004. Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience.* 127: 301-317.
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim K, LaVail MM, Vollrath D. 2000. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Gen.* 9: 645-651.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T. 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 587-594.
- Danias J, Shen F, Kavalarakis M, Chen B, Goldblum D, Lee K, Zamora MF, Su Y, Brodie SE, Podos SM, Mittag T. 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res.* 82: 219-228.
- Dieterich DC, Trivedi N, Engelmann R, Gundelfinder ED, Gordon-Weeks PR, Kreutz MR. 2002. Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *European Journal of Neuroscience.* 15: 1433-1443.
- Dodd J, Solter D, Jessel MT. 1984. Monoclonal antibodies against carbohydrate differentiation antigens identify subsets of primary sensory neurons. *Nature* 311: 469-472.
- Dowling JE. 1987. The retina. An approachable part of the brain. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge (Massachusetts) and London (England).
- Dowling JE, Sidman RL. 1962. Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol.* 14: 73-107.
- Drager UC, Hofbauer A. 1984. Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature.* 309: 624-626.
- Drager UC, Olsen JF. 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20: 285-293.
- Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, Nisbett G. 1985. The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behavioural Evolution* 26: 10-48.
- Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL. 1990. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature.* 343: 364-366.
- Eisenfeld AJ, LaVail MM, LaVail JH. 1984. Assessment of possible transneuronal changes in the retina of rats with inherited retinal dystrophy: cell size, number, synapses, and axonal transport by retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 223: 22-34.
- Eng SR, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE. 2004. Coordinated regulation of gene expression by *Brn3a* in developing sensory ganglia. *Development.* 131: 3859-3870.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. 1992. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci.* 12: 3554-3567.

- Fariss RN, Li ZY, Milam AH. 2000. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol.* 129: 215–223.
- Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Hamon S, Ott J, Weleber RG, Klein ML, Seddon JM. 2007. The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration. *Hum Hered* 63: 212-218.
- Francis PJ, Appukuttan B, Simmons E, Landauer N, Stoddard J, Hamon S, Ott J, Ferguson B, Klein M, Stout JT, Neuringer M. 2008. Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease. *Hum Mol Genet.* 17: 2673-2680.
- Fritsche LG, Loenhardt T, Janssen A, Fisher SA, Rivera A, Keilhauer CN, Weber BH. 2008. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet.* 40: 892-896.
- Gallego A. 1971. Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Res. Suppl.* 3: 33-50.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Cánovas-Martínez I, Agudo-Barriuso M, Lund RD, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2009. Long-Term Effects of Light Exposure on the Albino Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, Eabstract 3612.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2010. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91: 800-810.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2011. Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *En revisión.*
- Glickman RD. 2002. Phototoxicity to the retina: mechanism of damage. *Int J Toxicol.* 21: 473-479
- Gorgels TG, Van Beek L, Van Norren D. 1997. Effect of body temperature on retinal damage by 488 nm light in rat. *Microscopy Research and Technique.* 36: 89-95.
- Green ES, Menz MD, LaVail MM, Flannery JG. 2000. Characterization of rhodopsin mis-sorting and constitutive activation in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1546-1553.
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH. 2003. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 4337-4346.
- Hafezi F, Marti A, Munz K, Remé CE. 1997. Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 64: 963-970.
- Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova NV, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Remé CE, Lem J. 2002. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nature Genetics.* 32: 254-260.
- Hicks D, Sahel J, 1999. The implications of rod-dependent cone survival for basic and clinical research. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 3071-3074.
- Howell WL, Rapp LM, Williams TP. 1982. Distribution of melanosomes across the retinal pigment epithelium of a hooded rat: implications for light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 22: 139-144.
- Hubel DH. 2000. Ojo, cerebro y visión. Universidad de Murcia.
- Janes RG, Bounds GW. 1955. The blood vessels of the rat's eye. *Amer J Anat.* 96: 357-373.
- Joly S, Pernet V, Dorfman AL, Chemtob S, Lachapelle P. 2006. Light-induced retinopathy: comparing adult and juvenile rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47: 3202-3212.
- Jones BW, Watt CB, Frederick JM, Baehr W, Chen CK, Levine EM, Milam AH, Lavail MM, Marc RE. 2003. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *J Comp Neurol.* 464: 1-16.
- Jones BW, Marc RE. 2005. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 81: 123–137.

- Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KEH, Brooks M, Khanna R, He S, Lyons R, Abecasis GR, Swaroop A. 2007. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 16227-16232.
- Keeler C.E. 1924. The inheritance of a retinal abnormality in white mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10: 329–333.
- Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA. 2005. The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46: 3188-3196.
- Kim JH, Joo KS, Moon NJ. 2010. Characteristics of 681 low vision patients in Korea. *Korean Med Sci*. 25: 1217-1221.
- Kolomiets B, Dubus E, Simonutti M, Rosolen S, Sahel JA, Picaud S. 2010. Late histological and functional changes in the P23H rat retina after photoreceptor loss. *Neurobiol Dis*. 38: 47-58.
- Lafuente López-Herrera, MP, Mayor-Torroglosa, S, Miralles de Imperial, J, Villegas-Pérez, MP, & Vidal-Sanz, M. 2002. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology* 178: 243–258.
- LaVail MM, Battelle BA. 1975. Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat. *Exp Eye Res*. 21: 167-192.
- LaVail MM. 1981. Analysis of neurological mutants with inherited retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 21: 638–657.
- LaVail MM, Gorrin GM. 1987. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. *Exp Eye Res*. 44: 877-889.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA. 1987a. Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Curr Eye Res*. 6: 825–834.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Yasumura D. 1987b. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Progress in Clinical Biological Research*. 247: 439–454.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Thomas LA, Ginsberg HM. 1987c. Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 28: 1043–1048.
- LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. 1992. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 89: 11249–11253.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW. 2000. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 11488-11493.
- Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clérin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dollé P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA. 2004. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet*. 36: 755–759.
- Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM. 1998. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med*. 4: 967-971.
- Li S, Chang CJ, Abler AS, Fu J, Tso MO, Lam TT. 1996. A comparison of continuous versus intermittent light exposure on apoptosis. *Curr Eye Res*. 15: 914-922.
- Li F, Cao W, Anderson RE. 2001. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp Eye Res*. 73: 569-577.
- Li F, Cao W, Anderson RE. 2003. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44: 4968-4975.
- Linden R, Perry VH. 1983. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res*. 272: 145-149.
- Lund RD. 1965. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*. 149: 1506-1507.

- Machida S, Kondo M, Jamison JA, Khan NW, Kononen LT, Sugawara T, Bush RA, Sieving PA. 2000. P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 3200-3209.
- Maeda A, Maeda T, Golczak M, Chou S, Desai A, Hoppel CL, Matsuyama S, Palczewski K. 2009. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *Journal of Biological Chemistry.* 284: 15173-15183.
- Marc RE, Bryan WJ, Carl BW, Strettoi E. 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 22: 607-655.
- Marc RE, Jones BW. 2003. Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations. *Mol Neurobiol.* 28: 139-147.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT. 2008. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis.* 14: 782-806.
- Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP. 2006a. Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol.* 498: 163-179.
- Marco-Gomariz MA, Aguilera-Meseguer ME, Cánovas-Martínez I, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP. 2006b. The Sensitive Region Of The Rat Retina Is Due To Differential Light Exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47, ARVO E-abstract 4567.
- Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. 2004. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 23: 523-531.
- Martin MP. 1986. The projection of different retinal ganglion cells classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp Brain Res.* 62: 77-88.
- Milam AH, Li ZY, Fariss RN. 1998. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog. Retin. Eye Res.* 17: 175-205.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC. 1999. Modeling glaucomatous optic nerve damage. *Int Ophthalmol. Clin.* 39: 29-41.
- Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. 2009. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* 28: 289-302.
- Nadal-Nicolás FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3860-3868.
- Nixon RA, Lewis SE, Dahl D, Marotta CA, Drager UC. 1989. Early posttranslational modifications of the three neurofilament subunits in mouse retinal ganglion cells: neuronal sites and time course in relation to subunit polymerization and axonal transport. *Brain Research. Mol Brain Res.* 5: 93-108.
- Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. 1966. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol.* 5: 450-473.
- Noell WK. 1980. There are different kinds of retinal light damage in the rat: Williams TP, Baker BN. *The Effect of Constant Light on Visual Processes.* New York: Plenum Press. 3–28. New York (NY, USA).
- Ohira A, Tanito M, Kaidzu S, Kondo T. 2003. Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 1230–1236.
- Organisciak DT, Darrow RM, Noell WK, Blanks JC. 1995. Hyperthermia accelerates retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 997–1008.
- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G, Wiggert B. 1998. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 1107–1111.
- Organisciak DT, Darrow RA, Barsalou L, Darrow RM, Lininger LA. 1999. Light-induced damage in the retina: differential effects of dimethylthiourea on photoreceptor survival, apoptosis and DNA oxidation. *Photochem Photobiol.* 70: 261-268.

- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. 2000. Circadian dependent retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 3964-3701.
- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. 2003. Susceptibility to retinal light damage in transgenic rats with rhodopsin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 486-492.
- Organisciak DT, Vaughan DK. 2010. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog Retinal Eye Res.* 29: 113-134.
- Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2010. Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 3171-3183.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009a. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res.* 89: 32-41.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009b. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: A comparative study. *Vis Res.* 49: 2808-2825.
- Pavlidis M, Fischer D, Thanos S. 2000. Photoreceptor degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal regeneration of ganglion cells. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 41: 2318-2328.
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: 289-500.
- Peng YW, Senda T, Hao Y, Matsuno K, Wong F. 2003. Ectopic synaptogenesis during retinal degeneration in the royal college of surgeons rat. *Neuroscience.* 119: 813-820.
- Penn JS, Baker BN, Howard AG, Williams TP. 1985. Retinal light-damage in albino rats: lysosomal enzymes, rhodopsin, and age. *Exp Eye Res.* 41: 275-284.
- Penn JS, Anderson RE. 1987. Effect of light history on rod outer segment membrane composition in the rat. *Exp. Eye Res.* 44: 767-778.
- Pennesi ME, Nishikawa S, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM. 2008. The relationship of photoreceptor degeneration to retinal vascular development and loss in mutant rhodopsin transgenic and RCS rats. *Exp. Eye Res.* 87: 561-570.
- Perry VH. 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience.* 6: 931-944.
- Peters S, Lamah T, Kokkinou D, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U. 2006. Melanin protects choroidal blood vessels against light toxicity. *Z Naturforsch* 61: 427-433.
- Pinilla I, Lund RD, Sauvé Y. 2005. Enhanced cone dysfunction in rats homozygous for the P23H rhodopsin mutation. *Neurosci. Lett.* 382: 16-21.
- Prasad S, Galetta S. 2009. Trigeminal neuralgia: historical notes and current concepts. *Neurologist.* 15: 87-94.
- Putting BJ, Van Best JA, Vrensen GFJM, Oosterhuis JA. 1994. Blue-light-induced dysfunction of the blood-retinal barrier at the pigment epithelium in albino versus pigmented rabbits. *Exp Eye Res.* 58: 31-40.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J. 1996. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* 36: 2029-2036.
- Ramón y Cajal S. 1892. La rétine des vertèbres. *La cellule, T. IX, Fasc. 1:* 121-225.
- Rapp LM, Naash MI, Wiegand RD, Joel CD, Nielsen JC, cols. 1985. Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: *La*

- Vail MM (Ed.), *Retinal Degeneration: Experimental and Clinical Studies*. Alan R Liss, New York, pp. 421-437.
- Rapp LM, Williams TP. 1977. Rhodopsin content and electroretinographic sensitivity in light-damaged rat retina. *Nature*. 267: 835–836.
- Rapp LM, Williams TP. 1980. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res*. 20:1127-1131.
- Raviola G, Freddo TF. 1980. A simple staining method for blood vessels in flat preparations of ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 19: 1518-1521.
- Reese BE, Cowey A. 1986. Large retinal ganglion cells in the rat: Their distribution and laterality of projection. *Exp Brain Res*. 61: 375-385.
- Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A. 1998. Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res*. 17: 443-464.
- Remé CE, Grima C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP. 2000. Apoptosis in the retina: The silent death of vision. *News Physiol. Sci*. 15: 120-124.
- Remé CE. 2005. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision. The Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46: 2672-2682.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. 2008. The circadian clock in the retina controls rodcone coupling. *Neuron*. 59: 790-801.
- Ripps H. 2002. Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res*. 74: 327–336.
- Rivas MA, Vecino E. 2009. Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa. *Histol Histopathol*. 24: 1295-1322.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009a. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res*. 49: 115-126.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009b. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized análisis of the entire population and its spatial distribution. *Vis Res*. 49: 637-647.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M. 2009c. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino swiss mice. *Mol Vis*. 15: 2578-2598.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res*. 90: 168-183.
- Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.exer.2011.02.001.
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekström P, Paquet-Durand F. 2008. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol*. 38: 253-269.
- Schmued LC y Fallon JH. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res*. 377: 147-154.
- Schmued LC, Kyriakidis K, Fallon JH, Ribak CE. 1989. Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. *J Neurocytol*. 3: 333-43.

- Sefton AJ, Dreher B. 1985. Visual system. En: *The art nervous system vol 2* (G. Paxinos, ed.) Academic Press, New York. Pp 169-222.
- Sellés-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gómez JM, Vidal-Sanz M. 1996. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: 2002-2014.
- Shelley EJ, Madigan MC, Natoli R, Penfold PL, Provis JM. 2009. Cone degeneration in aging and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 127:483-492.
- Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2007. Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol.* 501: 866-878.
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N. 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci.* 28: 548-561.
- Sposato V, Iovieno A, Sornelli F, Aloe L. 2008. Axonal transport deficit in the optic nerve of rats with inherited retinitis pigmentosa and experimentally induced glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246: 1553-1558.
- Stein BE. 1984. Development of the superior colliculus. *Ann Rev Neurosci.* 7: 95-125.
- Steinberg RH, Flannery JG, Naash M, Matthes MT, Yasumura D, Lau-Villacorta C, Chen J, LaVail MM. 1996. Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: S698.
- Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peér J. 1999. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 18: 689-735.
- Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T y Kitazawa Y. 1999. Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the Rat Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 3084-3090.
- Swaroop A, Branham KEH, Chen W, Abecasis G. 2007. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet.* 16: 174-182.
- Szel a, Diamantstein T, Rohlich P. 1988. Identification of the blue-sensitive cones in the mammalian retina by anti-visual pigment antibody. *J Comp Neurol.* 273: 593-602.
- Szel A, Rohlich P. 1992. Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res.* 55: 47-52.
- Tanito M, Kaidzu S, Anderson RE. 2007. Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 1864-1872.
- Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Knudtson MD. 2004. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 122: 750-757.
- Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ, Ramírez AI, García-Sánchez J. 1996. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vis Res.* 36: 2015-2028.
- Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT. 2002. Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol.* 75: 547-55.
- Vaughan DK, Coulibaly SF, Darrow RM, Organisciak DT. 2003. A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 848-855.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ. 1987. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* 7: 2894-2909.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dyedil. *Exp Neurol* 102: 92-101.

- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M. y Aguayo, A.J. 1993. Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*. 3: 29-33.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Sellé s-Navarro I, Rodríguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Pérez MP. 2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res*. 2: 215–227.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas- Pérez MP. 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol*. 42: S262- S267.
- Vidal-Sanz M, De la Villa P, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Villegas-Pérez MP. 2007. Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* 21: S42–S45.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. Influences of peripheral nerve grafos on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*. 8: 265-280.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol*. 24: 23-36.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. 1996. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport*. 7: 1995-1999.
- Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, LaVail MM, Lund RD. 1998. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 392: 58-77.
- Villegas-Pérez MP, Aguilera ME, Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Bernal JM, Cánovas I, Soro MI, Lund RD, Vidal-Sanz M. 2006. Retinal ganglion cells in adult albino and pigmented rats: spatial distribution and quantitative analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47: E-Abstract 3318.
- Walia S, Fishman GA. 2008. Retinal nerve fiber layer analysis in RP patients using Fourier-domain OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49: 3525-3528.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. 2000. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41: 537–545.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado-Montalban N, Lund RD. 2003. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res*. 27: 183–196.
- Wang S, Lu B, Lund RD. 2005. Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cellbased therapy. *J Comp Neurol*. 491: 400–417.
- Wasowicz M, Morice C, Ferrari P, Callebert J, Versaux-Botteri C. 2002. Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 813-820.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. 2005. Molecular mechanisms of ligh-induced photorreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 24: 275-306.
- Wessendorf MW. 1991. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res*. 553: 135-48.
- Williams TP, Howell WL. 1983. Action spectrum of retinal light-damage in albino rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 24: 285-287.
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. 2010. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*. 11: 273-284.
- Yang Z, Tong Z, Chen Y, Zeng J, Lu F, Sun X, Zhao C, Wang K, Davey L, Chen H, London N, Muramatsu D, Salasar F, Carmona R, Kasuga D, Wang X, Bedell M, Dixie M, Zhao P, Yang R, Gibbs D, Liu X, Li Y, Li C, Li Y, Campochiaro B, Constantine R, Zack DJ, Campochiaro P, Fu Y, Li DY, Katsanis N, Zhang K. 2010. Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration. *PLoS Genet*. 6:e1000836.

Yu TY, Acosta ML, Ready S, Cheong YL, Kalloniatis M. 2007. Light exposure causes functional changes in the retina: increased photoreceptor cation channel permeability, photoreceptor apoptosis, and altered retinal metabolic function. *J Neurochem.* 103: 714-724.

9. ANEXO I

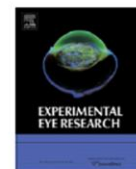
9. ANEXO I.

Experimental Eye Research 91 (2010) 800–810



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer

Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina

Diego García-Ayuso^a, Manuel Salinas-Navarro^a, Marta Agudo^b, Nicolás Cuenca^c, Isabel Pinilla^d, Manuel Vidal-Sanz^a, María P. Villegas-Pérez^{a,*}

^aLaboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

^bUnidad de Investigación, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Servicio Murciano de Salud, Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, 30120 El Palmar, Murcia, Spain

^cDepartamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, 03080 Alicante, Spain

^dServicio de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Avenida de San Juan Bosco 15, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2010

Accepted in revised form 9 October 2010

Available online 16 October 2010

Keywords:

inherited retinal degeneration
retinal dystrophy
rhodopsin mutation
retinal ganglion cell
photoreceptor
retinal nerve fiber layer
axonal compression
retinal vessels

ABSTRACT

The P23H-1 rat strain carries a rhodopsin mutation frequently found in retinitis pigmentosa patients. We investigated the progressive degeneration of the inner retina in this strain, focussing on retinal ganglion cells (RGCs) fate. Our data show that photoreceptor death commences in the ventral retina, spreading to the whole retina as the rat ages. Quantification of the total number of RGCs identified by Fluorogold tracing and Brn3a expression, disclosed that the population of RGCs in young P23H rats is significantly smaller than in its homologous SD strain. In the mutant strain, there is also RGC loss with age: RGCs show their first symptoms of degeneration at P180, as revealed by an abnormal expression of cytoskeletal proteins which, at P365, translates into a significant loss of RGCs, that may ultimately be caused by displaced inner retinal vessels that drag and strangulate their axons. RGC axonal compression begins also in the ventral retina and spreads from there causing RGC loss through the whole retinal surface. These decaying processes are common to several models of photoreceptor loss, but show some differences between inherited and light-induced photoreceptor degeneration and should therefore be studied to a better understanding of photoreceptor degeneration and when developing therapies for these diseases.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inherited photoreceptor degenerations are a group of genetic diseases, or retinal dystrophies, with multiple genotypic variations. All these diseases have in common mutations on genes coding for proteins implicated in phototransduction, visual pigment cycle, vesicular transport, structural proteins and transcription factors, although some of those mutations have yet to be identified (Hartong et al., 2006; Swaroop et al., 2007; Den Hollander et al., 2008; Fritsche et al., 2008; Baehr and Frederick, 2009).

One of the commonest forms of inherited retinal degeneration in humans is retinitis pigmentosa. This disease comprises a heterogeneous group of retinal degenerations that lead first to night blindness and afterwards to progressive loss of peripheral

and central vision. Retinitis pigmentosa represents a major cause of irreversible blindness and is characterized by a progressive apoptotic death (Yu et al., 2004; Wenzel et al., 2005; Pennesi et al., 2008) of photoreceptors, first rods and secondarily cones (Mohand-Said et al., 2000; Shen et al., 2005; Komeima et al., 2006).

In humans and animals, inherited photoreceptor degeneration causes, with time, alterations in all retinal layers (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Milam et al., 1998; Fariss et al., 2000; Wang et al., 2000, 2003, 2005; Jones et al., 2003; Cuenca et al., 2004; Jones and Marc, 2005; Aleman et al., 2007, 2008; Walia et al., 2007; Walia and Fishman, 2008). Patients with retinitis pigmentosa usually show optic disc pallor and, while some investigators have documented retinal ganglion cell (RGC) loss and thinning of the retinal nerve fiber layer in patients with retinitis pigmentosa (Stone et al., 1992; Santos et al., 1997; Walia et al., 2007; Lim et al., 2008; Walia and Fishman, 2008), other have failed to do so (Hood et al., 2009; Oishi et al., 2009). However, because many proposed treatments for retinitis pigmentosa such as photoreceptor/retinal pigmented epithelium transplantation or visual prosthesis rely on the integrity of the inner retina, it is important if the disease causes damage to the

* Corresponding author. Tel: +34 868887573; fax: +34 868883962.

E-mail addresses: diegogarcia@um.es (D. García-Ayuso), manuel.salinas@um.es (M. Salinas-Navarro), martabar@um.es (M. Agudo), cuenca@ua.es (N. Cuenca), ipinilla@unizar.es (I. Pinilla), ofmmv01@um.es (M. Vidal-Sanz), mpville@um.es (M.P. Villegas-Pérez).

inner retinal layers and, more importantly, to the retinal ganglion cells (RGCs), as these are the efferent retinal neurons.

Previous studies from our laboratory have documented, for the first time, that photoreceptor degeneration in dystrophic Royal College of Surgeons (RCS⁺) rats (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Wang et al., 2003), in rd mice (Wang et al., 2000), and after light exposure in non-dystrophic RCS, pigmented Lister-Hooded (Marco-Gomariz et al., 2006a) and albino Sprague–Dawley rats (García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication) leads to cell migration and vascular changes that, with time, cause RGC axonal compression and subsequent death. Because the pathophysiology of RGC death in these animals was similar, we concluded that RGC death was secondary to the vascular/axonal changes that follow photoreceptor degeneration and not a consequence of the dystrophy (Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, 2010, submitted for publication). RCS rats have a defect of the receptor tyrosine kinase gene, *Mertk* (D'Cruz et al., 2000) and rd mice have a mutation of the gene encoding the beta subunit of the cGMP-PDE (Pittler and Baehr, 1991) and both these mutations have been shown to cause retinitis pigmentosa in humans (Gal et al., 2000; Baehr and Frederick, 2009).

In this article, we have investigated RGC loss in another animal model of retinitis pigmentosa, the P23H rat in order to document whether in this mutant animal, there is also RGC loss and whether it is due to the dystrophy or secondary to vascular/axonal changes as in the animal models that we have investigated before. To document whether there is inner retinal damage in inherited retinal dystrophies, its timing and extent, is important because it implies that therapeutic interventions must then be done early in the course of the disease and before this damage is too extensive.

The P23H rat suffers one of the commonest mutations associated with retinitis pigmentosa: proline23 substitution by histidine in the rhodopsin molecule (Dryja et al., 1990; Steinberg et al., 1996) and was developed to study photoreceptor rescue (Lewin et al., 1998; LaVail et al., 2000). P23H rats undergo a progressive loss of photoreceptors which is faster in the homozygotic than in the heterozygotic strain, in such a way that, at post-natal day (P) 270, only sporadic photoreceptors remain in the retina (Cuenca et al., 2004). Photoreceptor loss correlates with an abnormal electroretinographic (ERG) function as early as 4 weeks of age (Machida et al., 2000; Pinilla et al., 2005; Chrysostomou et al., 2009a). Moreover, beyond the progress of photoreceptor death, changes affecting the outer retina have been described such as neovascularization of the Retinal Pigmented Epithelium (RPE) (Pennesi et al., 2008) and synaptic and morphological neuronal changes (Jones et al., 2003; Cuenca et al., 2004). Two earlier studies have documented that these rats suffer RGC electrical changes and death (Jones et al., 2003; Kolomiets et al., 2010) but have not quantified the amount of cell loss. In this study, we use two different methods to label RGCs and automated counting techniques of whole-mounted retinas developed in our laboratory to determine the RGC numbers in these animals and quantify RGC loss.

2. Materials and methods

P23H-1 homozygous albino female rats at P30, P90, P180, P270 and P365 were used as experimental animals in this study. As age matching control animals we have also analyzed albino female Sprague–Dawley (SD) rats at P60 and P365 that is at a young and at the oldest time points examined in the present study. Transgenic homozygous P23H-1 animals were obtained from Dr. M. LaVail (UCSF School of Medicine; www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml), and bred in a colony at the University of Murcia; SD animals were obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). Rats were housed in temperature and

light controlled rooms with a 12 h light/dark cycle (light from 8 AM to 8 PM) and had food and water *ad libitum*. Light intensity within the cages ranged from 5 to 30 lux (scotopic to mesopic conditions). Animal manipulations were carried out following the Spanish and European Union regulations for the use of animals in research (Council Directive 86/609/EEC) and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort.

Surgical manipulations were carried out under general anaesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Ketolar[®], Parke–Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún[®], Bayer, S.A., Barcelona, Spain). For recovery from anaesthesia, rats were placed in their cages and an ointment containing tobramycin (Tobrex[®] pomada oftálmica, Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. Animals were sacrificed by an intraperitoneal injection of an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal Vetoquinol[®], Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

2.1. Retinal ganglion cells retrograde labeling from the superior colliculi

Fluorogold (FG) was applied to both superior colliculi (SCi), which are the main retino-recipient target regions in the brain, one week before animal processing to retrogradely label the RGCs, following previously described methods (Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Pérez et al., 1998; Marco-Gomariz et al., 2006a; Salinas-Navarro et al., 2009a,b) that are standard in our laboratory. In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gelatine sponge (Espogostan[®] Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 3% FG and 10% DMSO, was applied over the entire surface of both SCi. Previous studies in control rats in our laboratory have shown that FG application to both SCi results in the labeling of 98.4% of the RGC population in SD rats (Salinas-Navarro et al., 2009a).

2.2. Tissue processing

Rats were perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). Some eyes were used for cross sections and others for retinal whole mounts, as follows:

2.3. Whole-mount preparations

Twenty-one P23H animals that had received FG application in the SCi were processed between P30 ($n = 5$), P90 ($n = 5$), P180 ($n = 6$), P270 ($n = 5$), and P365 ($n = 5$). As controls, nine FG-traced SD rats were processed at P60 ($n = 5$) and at P365 ($n = 4$). After perfusion, the eyes were enucleated and the retinas were dissected as whole-mounts by making four radial cuts in the superior, inferior, nasal, and temporal retinal quadrants. Retinal orientation was maintained by making the deepest radial cut in the superior retina. The retinas were post-fixed, washed, and immunoreacted (see below).

2.4. Cross-sections

After eye enucleation, the superior pole of the eye was marked with china ink. Then, the cornea and lens were removed and the resulting eyecups were post-fixed in the fixative for 1 h.

Microtome sectioning: The eyes of 4 normal SD rats (P60) and of five P23H animals, processed at P30 ($n = 1$), P90 ($n = 1$), P180 ($n = 1$), P270 ($n = 1$) and P365 ($n = 1$), were used. After post-fixation, the eyecups were embedded in paraffin, as previously described (Marco-Gomariz et al., 2006a), for microtome sectioning.

Three microns thick sagittal sections were then stained with Hansen's hematoxylin and eosin and mounted with DPX (BDH, VWR International Ltd. Poole, England). Finally, these sections were observed and photographed under a light microscope.

Criostat sectioning: The eyes of 2 normal SD rats (P90) and of two P23H rats, P270 and P365 were used. The oriented eyecups were cryoprotected in 15% sucrose (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) before embedding them, with the superior pole in a known position, in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) for cryostat sectioning. Sagittal sections (15 μ m thick) were subjected to double immunohistochemistry (see below).

2.5. Immunohistochemistry

Fluorogold traced flat mounted retinas were washed, permeated and Brn3a (goat anti-Brn3a, C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) immunodetected to identify RGCs, as previously reported (Nadal-Nicolás et al., 2009). Brn3a has recently been demonstrated to be a reliable, efficient *ex vivo* marker to identify and quantify RGCs in control and injured retinas (Nadal-Nicolás et al., 2009), thus Brn3a labeling was used in FG-labelled retinas as a second reliable independent marker to identify living RGCs and to double-label RGCs in these retinas.

pNFHs (phosphorylated high molecular weight subunits of the neurofilament triplet) were then immunodetected by incubation with the RT97 antibody (mouse anti-pNFH, Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa, USA) to label the RGC axons in the retina, following standard procedures in our laboratory (Villegas-Pérez et al., 1988, 1996, 1998; Wang et al., 2000; Marco-Gomariz et al., 2006a,b; Parrilla-Reverter et al., 2009a,b; Salinas-Navarro et al., 2009a,b, Salinas-Navarro et al., 2010). In brief: retinas were permeated by freezing them 15 min at -70 °C in 2% Triton-phosphate buffer saline (PBST), after a quick rinse in PBST, they were incubated for 1 h at room temperature (RT) in blocking buffer (2.5% normal donkey serum in PBST) followed by overnight incubation at 4 °C with the primaries antibodies diluted 1:1000 in the same blocking buffer. The following day, the retinas were washed in PBS (3 \times 10 min at RT) and incubated (1 h at RT) with the appropriate secondary antibodies: donkey anti-mouse-Alexa 488 and donkey anti-goat-Alexa 594 (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) diluted each 1:500 in PBST. Finally, the retinas were washed in PBS and mounted on subbed slides vitreal side up, and covered with anti-fading mounting media (Vectashield Mounting Medium, Vector, Atom, Alicante, Spain). Finally, the entire retinas were photographed (see below).

Cryostat cross sections: After washing (3 \times 10 min in PBS) to eliminate the embedding medium, cross sections were incubated for 2 h at RT with a mixture of rabbit anti-NFH (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) and mouse anti-rat endothelial cell antigen (anti-RECA, Serotec, Bionova Scientific, Madrid, Spain) diluted 1:50 and 1:1000 respectively in PBS-Triton 0.1%. Secondary detection was carried out with donkey anti-mouse Alexa 594 and donkey anti-rabbit-Alexa 468 (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) diluted each 1:500 in the same buffer. Sections were then mounted with anti-fading medium containing DAPI to counterstain all retinal nuclei (VectaShield Mounting medium with DAPI, Vector, Atom, Alicante, Spain). These sections were observed and photographed under a fluorescence microscope.

2.6. Retinal Image analysis

Both retinal whole mounts and cryostat cross sections were examined and photographed under a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) following

standard procedures in our laboratory (Vidal-Sanz et al., 2001; Lafuente López-Herrera et al., 2002; Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009a,b). The microscope is equipped with the appropriate filters, a digital high resolution camera (ProgResTM C10, Jenoptik, Jena, Germany) and a computer-driven motorized stage (Pro-ScanTM H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) controlled by IPP (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) with a microscope controller module (Scope-Pro® 5.0 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For cross sections individual images were taken. To make reconstructions of retinal whole-mounts, retinal multi-frame acquisitions were acquired in a raster scan pattern using a $\times 10$ objective (Plan-Neofluar, 10 \times /0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually prior to the capture of the digitized images. Because the frame size is 0.627 mm²/image, we usually need to acquire 154 images to scan the entire retina.

The images taken for each flat mounted retina were saved as a set of 24-bit color image pictures and later, these images were combined into a single high resolution composite image of the whole retina using IPP. Reconstructed images were further processed using Adobe Photoshop® CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) when needed.

2.7. Retinal Ganglion Cell counting

For *Fluorogold and Brn3a traced retinas*, the individual fluorescent images taken in each retina were processed by a specific cell counting subroutine developed by our group (FG: Salinas-Navarro et al., 2009a,b; Brn3a: Nadal-Nicolás et al., 2009). Briefly, we used the IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image in order to clarify cell limits and separate individual cells for automatic cell counting. This procedure has been previously reported in detail (FG: Salinas-Navarro et al., 2009a,b; Brn3a: Nadal-Nicolás et al., 2009).

2.8. Isodensity maps

To demonstrate the spatial distribution of both FG-labelled or Brn3a positive RGCs, we constructed an isodensity map for each retina, using the specific subroutine developed in our laboratory (Salinas-Navarro et al., 2009a,b; Nadal-Nicolás et al., 2009). Briefly, using IPP macro language every frame was divided into 64 sampling areas, in which RGC counts were obtained and cell densities calculated. These densities were represented as filled contour plots using graphing software (Sigmaplot®; Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b).

2.9. Statistics

Statistical analysis was done using SigmaStat® 3.1 for Windows® (SigmaStat® for WindowsTM Version 3.11; Systat Software, Inc, Richmond, CA, USA).

Since the data were not normally distributed, the Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups and the Mann–Whitney test was used when comparing two groups only.

Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Photoreceptor loss and vascular abnormalities in the P23H-1 homozygous strain

Control SD animals at P60 or P365 showed an outer nuclear layer (ONL) 12 to 14 nuclei thick and an inner nuclear layer (INL) 3 to 4

nuclei thick (Figs. 1A and 2C). Homozygous P23H rats show a rapid and progressive loss of photoreceptors with age and at P30 the ONL has diminished to 2 to 3 nuclei in the ventral, 3 to 4 nuclei in the dorsal and 4 to 6 nuclei in central retina (Fig. 1B,C). By P90, the INL is thinner than at earlier time points (Fig. 1D,E) and the ONL has almost disappeared from the ventral and dorsal retina, where only scattered photoreceptor nuclei are observed, remaining a single layer of photoreceptor nuclei in the central retina. Photoreceptor loss

continues and, from P180 and onwards, only isolated photoreceptor nuclei were detected in all retinal areas. Retinal degeneration progresses also in the INL, which further thins at P270 and P365. At P180 tortuous vascular complexes, never observed in control rats (Fig. 1F–I), begin to appear between the RPE and Bruch's membrane, and some blood vessels are observed running vertically in the retina connecting these vascular complexes with the inner retinal vascular plexus (Figs. 1F–I and 2). These vertical vessels are inner retinal

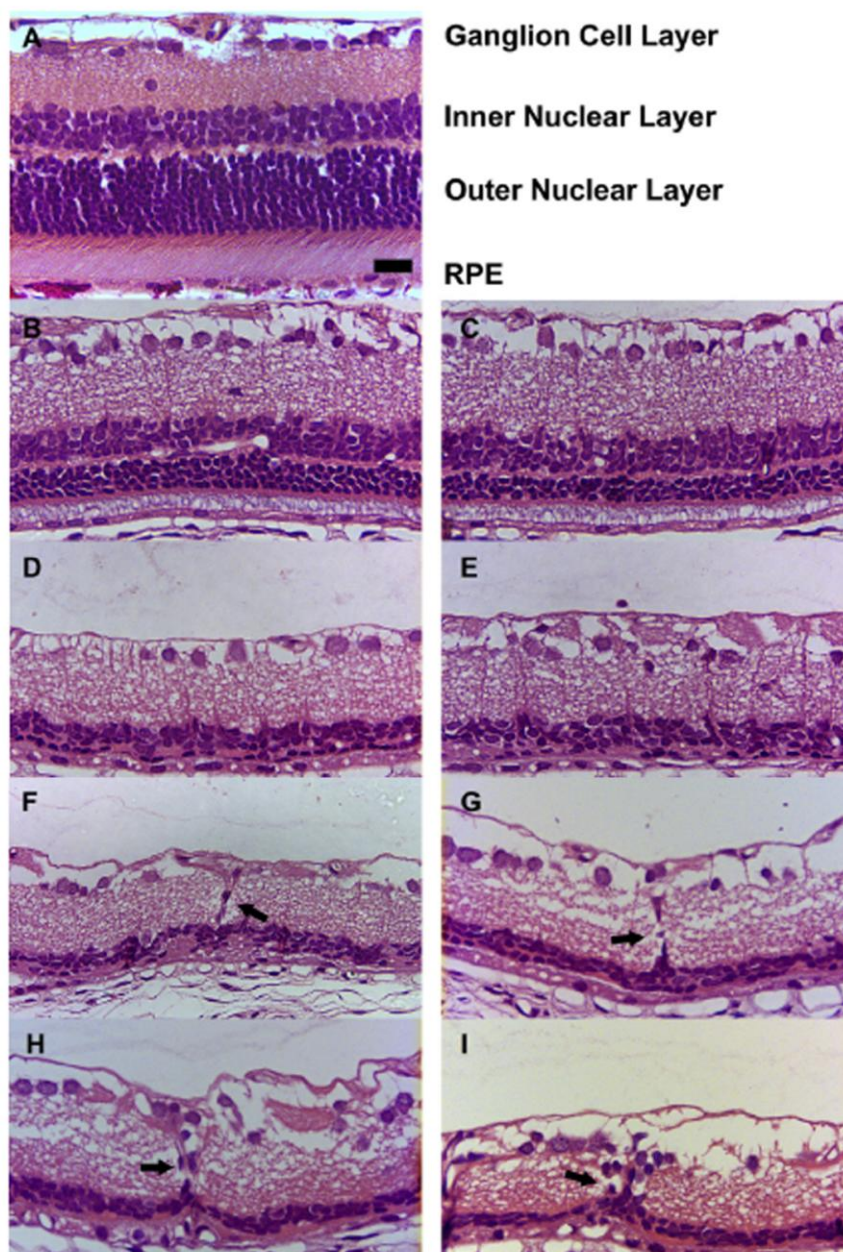


Fig. 1. Temporal course of retinal degeneration in P23H-1 rats. Haematoxylin/eosin stained retinal cross sections taken from the dorsal (left column) and ventral (right column) retina of one P0 Sprague–Dawley rat (A) and 5 P23H rats at different post-natal times: P30 (B,C), P90 (D,E), P180 (F), P270 (G) and P365 (H,I). At P270 and P365, we can observe vessels running vertically between the inner and outer retina (arrows) and, at P365, subretinal vessels. Bar = 100 μ m.

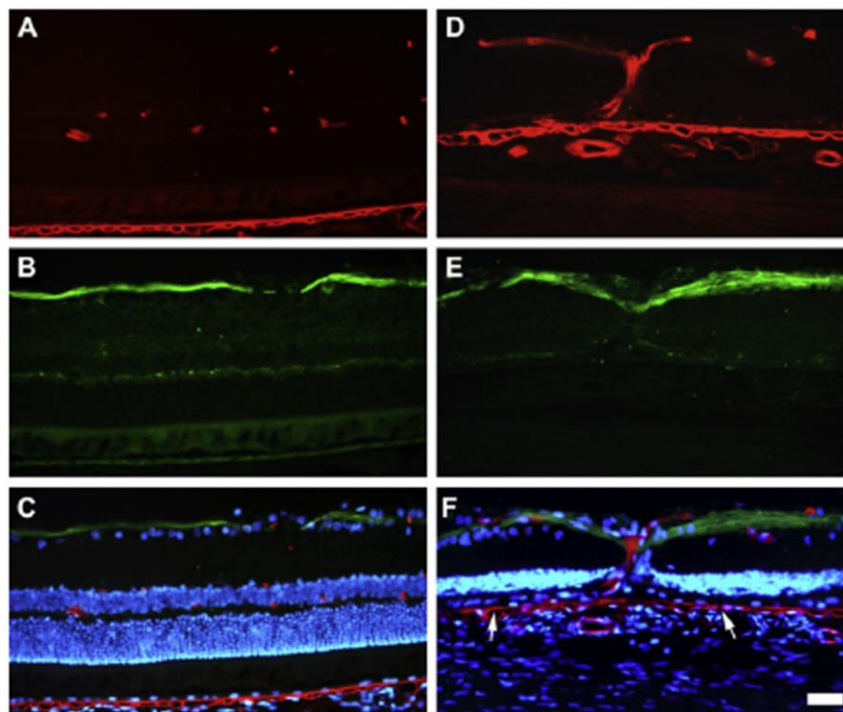


Fig. 2. Retinal ganglion cell axons are dragged by displaced blood vessels. Retinal cross sections immunostained with anti-RECA (upper row) and anti-pNFH (middle row) antibodies and counterstained with DAPI (lower row) of one P60 Sprague–Dawley rat (A–C) and one representative P23H-1 rat processed at P365 (D–F). Blood vessels (D) running vertically in the retina connect subretinal vascular complexes that appear between the RPE and Bruch's membrane (E, arrows) with the inner retinal vascular plexus and drag RGC axons (E). RPE cells migrating on the surface of vertical blood vessels (F). These phenomena were never observed in normal SD retinas (A–C).

vessels that are being pulled towards the subretinal vessels and in doing so, drag RGC axons distorting their trajectories (Fig. 2). The number and frequency of these vascular abnormalities worsens with age in P23H rats and have been observed before in RCS^{Sp} rats, rd mice and after retinal phototoxicity (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Wang et al., 2000; Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication).

3.2. Time course analysis of RGC axons in P23H-1 retinal whole-mounts

In control SD retinas pNFH⁺ axons showed a linear and divergent trajectory from the optic disc to the medial region of the retina (Fig. 3A). This expression pattern was maintained in the retinas from P23H animals younger than P180 (Fig. 3C). However, in P180 retinas or older, pNFH⁺ axons presented distorted non-linear trajectories caused by regions of axonal strangulations (Fig. 3B,D–G). These strangulations are the result of axonal compression by the retinal vessels (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Wang et al., 2000, 2003; Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2010). At P180 these strangulations can be observed at the axonal-vascular crossing points in the ventral retina. From P270 onwards, RGC axonal compression has spread throughout the whole retina (Fig. 3B). As survival time increases, these compressions became more frequent and severe and, by P365, axonal bulbs and wandering axons could be seen above and below the compression points, suggesting that vascular compression had interrupted axonal transport and caused axonal transection (Fig. 3E–G). Some RGC bodies and their proximal dendrites became also pNFH⁺ (Fig. 3H)

mainly in the ventral retina (Fig. 3B), in a pattern that we have described as a hallmark of neuronal degeneration (Parrilla-Reverter et al., 2009b).

3.3. RGC numbers in P23H-1 retinal whole-mounts

The whole population of fluorogold-traced RGCs was automatically counted in the right and left retinas of P23H-1 rats processed at different survival intervals (Table 1, Figs. 4,5). There was not a significant difference (Mann–Whitney test) between the number of RGCs counted in the left and right retinas processed at any given time point. However, the number of FG-traced RGCs decreased with age and, at P30, P90, P180, P270 or P365 the population (Mean \pm SD) of RGCs was, respectively: 75,786 \pm 1894 75,184 \pm 1913, 76,667 \pm 3576, 73,960 \pm 4687, and 69,921 \pm 3150 cells (Table 1, Fig. 4). Comparison of the number of RGCs quantified at different survival times showed that there were significant differences between the retinas processed at P365 and at earlier ages (Table 1, Kruskal–Wallis, $p < 0.001$).

In control SD rats the mean \pm SD numbers of FG-traced RGCs at P60 and P365 were 81,381 \pm 3722 and 83,641 \pm 2751, respectively (Figs. 4 and 5). These numbers are comparable to those found in control SD rats in previous studies of this laboratory (81,486 \pm 4340; $n = 37$; Salinas-Navarro et al., 2009a) and indicate that in normal SD rats, the numbers of RGCs do not decrease from P60 to P365. Comparison of the mean numbers of FG-labelled RGCs among both rat strains revealed that in the P23H strain, at all of the post-natal times analyzed, there were significantly lower numbers of RGCs than in SD rats (Mann–Whitney test, $p < 0.001$, Table 1).

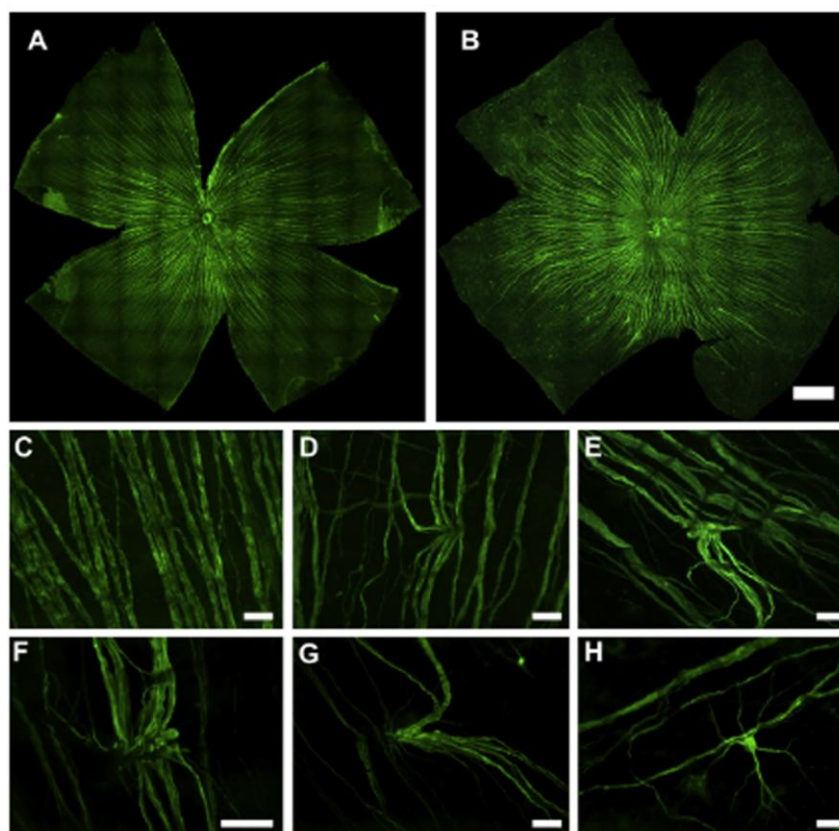


Fig. 3. Axonal abnormalities and vascular strangulations in the P23H1-retina. Images from the retinas of a P60 Sprague–Dawley rat (A), and P23H-1 rats at post-natal times 30 (C), 180 (D), 270 (E, F) and 365 (B, G, H). RGC axons are detected by their pNFH expression. In control SD rats (A) and at early post-natal times in the P23H-1 strain (C), RGC axons run linearly converging towards the optic disc. However, at later post-natal times, RGC axons show distorted trajectories (B, D–G), caused by the retinal vessels. At P30, the vascular-axonal crossing points can be seen as “linear shadows” on the axonal bundles (C), while they cause axonal displacements (D–G), axonal transport interruption (E–G) and pNFH + RGC cell bodies (H) in older animals. Bar = 50 μ m.

The whole population of Brn3a positive RGCs was automatically quantified in the same retinas abovementioned (Table 1, Figs. 4, 5). The mean number \pm SD of Brn3a + RGCs in P23H-1 rats were $81,599 \pm 2903$, $81,338 \pm 2845$, $81,372 \pm 4345$, $77,921 \pm 3476$ and $74,503 \pm 2795$ at P30, P90, P180, P270 and P365, respectively, and these numbers were not significantly different from the number of FG+ RGCs at the same survival times. In agreement with the number of FG-traced RGCs, comparison of the number of Brn3a + RGCs quantified at different periods of survival, revealed that there were significant differences between P365 and the others post-natal times (Kruskal–Wallis, $p < 0.001$), but not among right or left retinas at any given time point.

In SD rats, at P60 or P365, the mean numbers of RGCs expressing Brn3a were $85,997 \pm 3562$ and $85,861 \pm 3982$, respectively (Figs. 4 and 5), and comparable to those found in SD rats in previous studies of this laboratory ($84,682 \pm 7601$; $n = 14$; Nadal-Nicolás et al., 2009). In agreement with the number of FG+ RGCs, there was a significantly lower number of Brn3a + RGCs in the P23H strain than in the control animals (both P60 and P365) at all the post-natal times analyzed (Mann–Whitney test, $p < 0.001$).

Isodensity maps of both FG-traced and Brn3a immunodetected retinas (Figs. 5 and 6) disclosed an apparently normal spatial distribution of RGCs in P23H-1 retinas at early time points

(Fig. 5F,H). However, by P180 or more we can observe a diminution in RGC densities (Fig. 6) and at P365 a clear diminution in RGC densities all throughout the retina (Fig. 6, D, H), indicating that RGC loss in the P23H-1 strain is widespread in the retina.

Thus, independently of the marker used to identify RGCs, P23H-1 rats have a lower number of RGCs than control SD rats, and this difference is significant as early as P30, when the rat is not yet fully adult. From P180 to P365, the population of RGCs diminishes significantly and this loss occurs on the whole retinal surface.

4. Discussion

We have used the P23H line 1 homozygous albino rat to study whether the progressive photoreceptor loss that occurs in this strain affects the inner retina. Our study reveals that these rats have a lower number of retinal ganglion cells and that retinal degeneration affects, with time, all retinal layers, causing vascular and axonal alterations and RGC death.

4.1. Retinal ganglion cell numbers in P23H-1 rats

Using two different methods for RGC identification (Brn3a and FG) and automated counting techniques of whole-mounted retinas

Table 1
Total numbers of RGCs per retina in Sprague–Dawley and P23H-1 rats at different post-natal days.

Strain	SD		SD		P23H-1									
	FG		IG		FG		FG		IG		FG		FG	
Postnatal Day	P60		P365		P30		P90		P180		P270		P365	
Retina	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
	79,090	82,653	85,708	87,838	77,828	79,287	76,390	74,908	77,908	79,646	75,170	78,068	70,645	62,579
	77,567	74,237	78,428	84,747	73,614	76,006	77,927	76,376	69,273	75,477	71,912	73,445	71,320	74,508
	78,965	81,478	85,452	83,083	74,602	78,414	72,787	75,860	74,304	70,358	76,788	72,543	67,472	69,049
	82,944	84,076	81,275	82,602	74,696	74,427	74,330	76,121	79,670	76,633	76,904	61,423	72,997	69,123
Mean ± SD	80,943 ± 3157	81,820 ± 4166	82,715 ± 3037	84,567 ± 2049	75,037 ± 1447	76,534 ± 1990	74,488 ± 2468	75,880 ± 5,12	76,655 ± 3788	76,680 ± 3351	75,135 ± 9,1805	72,786 ± 6158	70,906 ± 1888	68,935 ± 3788
Mean ± SD	81,381 ± 3722	81,381 ± 3722	83,641 ± 2751	83,641 ± 2751	75,786 ± 1894	75,786 ± 1894	75,184 ± 1913	75,184 ± 1913	76,667 ± 3576	76,667 ± 3576	73,960 ± 4687	73,960 ± 4687	69,921 ± 3150	69,921 ± 3150
Marker	Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a		Brn3a	
Postnatal Day	P60		P365		P30		P90		P180		P270		P365	
Retina	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
	80,732	87,628	83,730	82,295	82,186	85,186	77,613	76,277	79,909	84,272	81,380	80,844	76,659	70,551
	90,197	91,896	84,683	81,472	77,394	76,525	81,127	79,558	70,606	82,444	75,471	82,668	79,985	72,388
	84,835	83,566	90,670	92,695	79,276	82,229	83,553	85,085	79,213	75,330	76,813	80,059	77,434	73,617
	85,263	82,157	82,584	88,761	85,082	84,681	82,525	85,494	86,821	83,444	80,003	71,423	73,285	76,077
Mean ± SD	84,941 ± 3067	87,053 ± 3707	85,416 ± 3122	86,305 ± 4644	81,066 ± 2614	82,132 ± 3075	81,078 ± 2024	81,598 ± 3458	80,336 ± 5000	82,407 ± 3256	77,549 ± 2743	78,294 ± 4045	76,181 ± 2513	72,824 ± 1916
Mean ± SD	85,997 ± 3744	85,997 ± 3744	85,861 ± 3982	85,861 ± 3982	81,599 ± 2903	81,599 ± 2903	81,338 ± 2845	81,338 ± 2845	81,372 ± 4345	81,372 ± 4345	77,921 ± 3476	77,921 ± 3476	74,503 ± 2795	74,503 ± 2795

developed in our laboratory, we document in this study that the numbers of RGCs in P23H-1 rats are lower than in their homologous SD rats. In a previous study, using FG labeling, we documented that PVG pigmented rats have significantly higher numbers of RGCs than SD rats (Salinas-Navarro et al., 2009a) and we have later confirmed this using Brn3a (Nadal-Nicolás et al., unpublished observations). Other authors have estimated the numbers of RGCs in different rat strains, but only Danias et al. (2002, 2006) were able

to count, as we do, the whole retina and found higher numbers in Wistar albino rats ($97,609 \pm 3930$; Danias et al., 2002) and lower numbers in old male Brown-Norway rats ($73,490 \pm 9395$; Danias et al., 2006). The differences in RGC numbers between the different studies could be due to strain, gender or age. However, because P23H-1 rats belong to the SD strain, and we always used female rats, we did not expect to find differences in the numbers of RGCs between P23H-1 rats and SD rats. Thus the question arises whether this rhodopsin mutation affects the development of the inner retina. Because Pennesi et al. (2008) have described that in heterozygous P23H and S334ter rats (a strain that carries another rhodopsin mutation) the deep capillary plexus, which supplies the inner retina, does not develop properly, it is tempting to speculate that the lower numbers of RGCs that we found in P23H-1 rats (from 30 days of age, that was the younger age studied) are due to limited blood supply to the RGC layer during retinal development.

4.2. Photoreceptor degeneration and vascular abnormalities

In age-related macular degeneration and retinitis pigmentosa, photoreceptor loss results in irreversible blindness mainly by loss of cones, which is secondary to rod apoptosis (Shelley et al., 2009). Cone degeneration has been described to depend on the spatial and temporal rod degeneration (Cideciyan et al., 1998; Hicks and Sahel, 1999). Cone-rod dependence has been described by other authors in the P23H rat retina, where the rate of cones degenerating is directly related to the rate of rod damage (Chrysostomou et al., 2009b). It has been proposed that cone apoptosis is triggered by the diffusion of different substances (Chrysostomou et al., 2009b), such as pro-apoptotic factors, from dying coupled rods. Alternatively, it has been suggested that dying rods are not able to sustain their coupled cones by diffusion of nutrients, hence causing their death (Ribelayga et al., 2008).

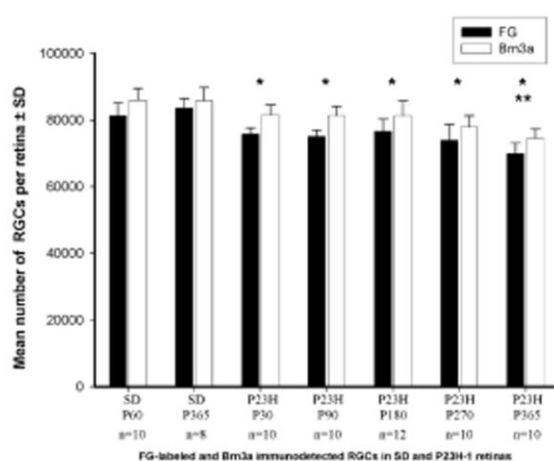


Fig. 4. P23H-1 mutation induces delayed RGC death. Mean numbers (\pm SD) of Fluorogold-labeled (black bars) and Brn3a immunodetected (white bars) Retinal Ganglion Cells in Sprague–Dawley (SD) and P23H-1 rats at different post-natal (P) times. * Significantly smaller than control SD rats (Mann–Whitney test, $p < 0.001$). ** Significantly smaller than SD rats and P23H-1 rats at earlier post-natal times (Kruskal–Wallis, $p < 0.001$).

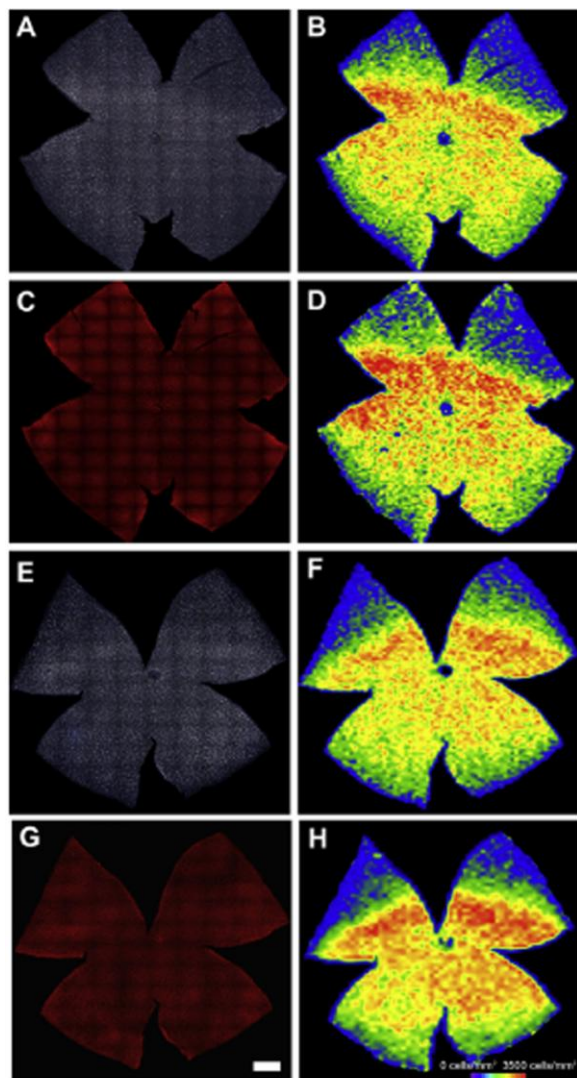


Fig. 5. Distribution of FG-labelled and Brn3a + RGCs in SD and at P30 in P23H-1 retinas. Photomontages (left column) and corresponding isodensity maps (right column) of the retinas of a Sprague-Dawley rat (A–D) and a P30 P23H-1 rat (E–H). First and third rows show Fluorogold-labelling and second and fourth rows Brn3a detection in the same retinas. These maps are filled contour plots generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a colour code (bottom right) according to its RGC density value within a colour-scale range that goes from 0 (purple) to 3500 or higher (red) RGCs/mm² (inferior right corner).

P23H rats may be reproduced as homo or heterozygotic. Homozygotic animals present a faster photoreceptor degeneration rate than heterozygotic rats, in such a way that, at P30, homozygotes have lost approximately 60% of photoreceptors, while this loss is over 40% in the heterozygotes ones (Machida et al., 2000; Pennesi et al., 2008). In the homozygous strain we have observed that, at P180, only few photoreceptors remain and it is at this time point when subretinal vascular complexes start to appear, in accordance with the study of Pennesi et al. (2008). Thus, these complexes only appear after an almost complete loss of photoreceptors.

The subretinal vascular complexes have been attributed to neovascularization of the RPE, and some authors have proposed a choroidal origin of the vessels. However, previous works in our laboratory have documented that Bruch's membrane is intact (Villegas-Pérez et al., 1998) and proposed that instead of new vessels, i.e. neovascularization, these are retinal vessels of the outer retinal plexus that change their phenotype due to the influence of the RPE that envelops them (Wang et al., 2003; Marco-Gomariz et al., 2006a). Because these vessels are retinal vessels, they are connected to the inner retinal circulation and, when the RPE cells envelop them and begin to migrate through their surface towards the inner retinal layers, drag the inner retinal vessels and, in doing so, these inner vessels compress the RGCs axons (Wang et al., 2003; Marco-Gomariz et al., 2006a).

The subretinal vascular complexes, as well as the axonal compressions in the retinal nerve fiber layer appear at P180 in the P23H-1 strain. The axonal compressions correspond to the axonal-vascular crossing points and appear first in the ventral retina, as it has been observed in the RCSp + rat (Villegas-Pérez et al., 1998). However, in light-induced photoreceptor degeneration RGC axonal compression starts in the dorsal retina, both in pigmented (Marco-Gomariz et al., 2006a) and albino rats (García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication). Because photoreceptor loss is more pronounced in the ventral retina in P23H-1 and RCSp+ (Villegas-Pérez et al., 1998; Wang et al., 2003) rats and in the dorsal retina in light-exposed rats (Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication), the formation of the subretinal vascular complexes and RGC axonal compression appear in the regions that suffer a more severe photoreceptor degeneration and allow us to differentiate between inherited and light-induced photoreceptor degenerations.

4.3. RGC degeneration

The first symptom of RGC degeneration was observed at P180 when their axons showed an increased pNFH immunoreactivity which spread to some cell bodies. Later, at P365, pNFH immunoreactivity allowed us to document signs of axonal interruption (axonal bulbs and wandering axons) at the level of the axonal strangulations. Alterations in the normal pattern of pNFH expression are observed after different retinal injuries, such as optic nerve transection (Parrilla-Reverter et al., 2009b), crush (Dieterich et al., 2002; Parrilla-Reverter et al., 2009b), elevation of the intraocular pressure (Soto et al., 2008; Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010) and light-induced photoreceptor degeneration (Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication), and are considered the hallmark of RGC deterioration.

The numbers of RGCs decreased from P180 in the P23H-1 strain and, even though RGC numbers were smaller at P270, RGC loss was statistically significant only at P365. This loss happens when very few photoreceptors remain in the retina, and is in agreement with other reports that have described affection of the inner retina (Jones and Marc, 2005; Pennesi et al., 2008) and RGC loss (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Marco-Gomariz et al., 2006a) after an almost complete loss of photoreceptors, either inherited (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Jones et al., 2003) or experimentally induced (Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication).

Because FG is transported retrogradely from the superior colliculi, we also quantified Brn3a + RGCs (Nadal-Nicolás et al., 2009) in the same retinas, to discard that the decrease of FG-labelled RGCs was due to an axonal transport deficit problem as some authors have proposed (Sposato et al., 2008). Our data indicated that this is not so, as in this study we have described a parallel decrease in the number of both FG-labelled and Brn3a + RGCs with age, and the

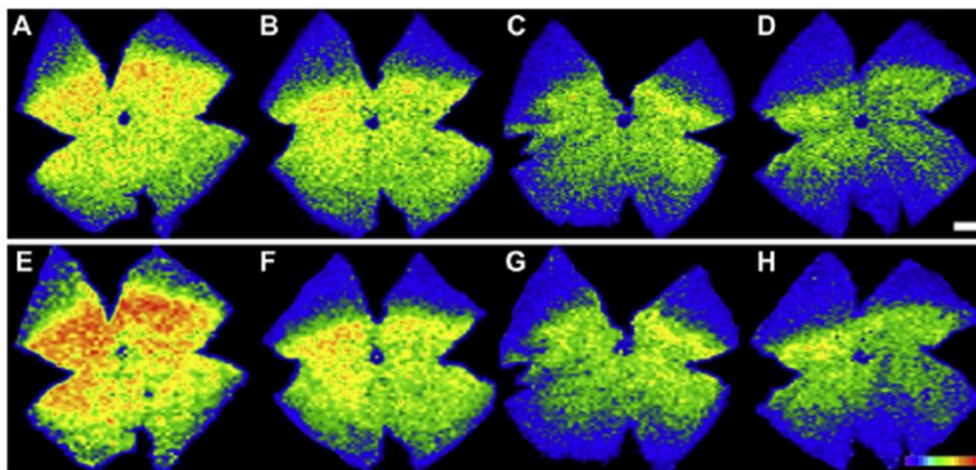


Fig. 6. Distribution of IG-labelled and Brn3a+ RGCs from P90 to P365 in P23H-1 retinas. Isodensity maps obtained from IG-labelled (upper row) retinas at P90 (A), P180 (B), P270 (C) and P365 (D), and the same Brn3a immunoreacted retinas (lower row; E-H). RGC densities are indicated in a colour-scale range that goes from 0 (purple) to 3500 or higher (red) RGCs/mm² (inferior right corner). There is a diminution of the RGC densities in the retinas of the older animals.

reduced RGC numbers must be due to cell death. This result is consistent with previous studies in RCSp + rats which show normal retrograde transport from the superior coliculi until P180 (Pavlidis et al., 2000), and not significantly decreased rate of retrograde or anterograde axonal transport until P515 (Eisenfeld et al., 1984).

Delayed RGC loss is a common phenomenon underlying photoreceptor degenerations, and it has been reported in dystrophic RCS rats (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Wang et al., 2003), rd mice (Wang et al., 2000) and in albino García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication) and pigmented rats (Marco-Gomariz et al., 2006a) after light exposure. As aforementioned, RGC loss is caused by vessels crossing the optic fiber layer before running to the outer layers to supply the deep vascular plexus, thus dragging the RGC axons and finally compressing and severing them (Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Wang et al., 2000, 2003; Marco-Gomariz et al., 2006a; García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication).

In summary, this study demonstrates that homozygous P23H-1 rats have a lower number of RGCs than their homologous SD rats at all the post-natal times analyzed (P30 to P365) and show RGC loss from P180 to P365. This delayed RGC loss is secondary to the inner retinal disorganization that follows photoreceptor degeneration and that causes RGC axonal damage: once photoreceptor degeneration is almost complete, the RPE cells migrate, envelop the outer retinal vessels and pull the inner retinal vessels which, in turn, strangulate, drag and finally sever RGC axons. As it occurs with photoreceptor loss, these abnormalities start in the ventral retina, are progressive and increase with age. These events have been described before in other types of photoreceptor degenerations, such as the inherited retinal degeneration of the dystrophic RCSp+ rats and rd mice (Villegas-Pérez et al., 1998; Wang et al., 2000, 2003), and the phototoxic-induced photoreceptor degeneration in albino (García-Ayuso et al., 2009, submitted for publication) and pigmented rats (Marco-Gomariz et al., 2006a) and thus may be secondary to photoreceptor degeneration. On the other hand, the localization of these events is different in inherited and light-induced retinal degenerations and should be studied in detail to a better understanding of the secondary events taking place after photoreceptor loss in retinal degenerations and when planning treatments for these diseases.

Acknowledgments

Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI060780, PS09/01854, PI10/01496, PI10/00187 Fundación Séneca 05703/PI/07 and 04446/GERM/07, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RD07/0062/001, ISCIII-FEDER: CP003/00119, PI070225. We thank Leticia Nieto-López and José Manuel Bernal-Garro for their excellent technical help.

References

- Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Roman, A.J., Windsor, E.A., Steinberg, J.D., Branham, K., Ohman, M., Swaroop, A., Jacobson, S.G., 2007. Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPE65 mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4759–4765.
- Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Herrera, W., White, D.A., Kaushal, S., Naidu, A., Roman, A.J., Schwartz, S.B., Stone, E.M., Jacobson, S.G., 2008. Retinal laminar architecture in human retinitis pigmentosa caused by Rhodopsin gene mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1580–1590.
- Baehr, W., Frederick, J.M., 2009. Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision. Res.* 49, 2636–2652.
- Chrysothomou, V., Stone, J., Valtter, K., 2009a. Life history of cones in the rhodopsin mutant P23H-3 rat: evidence of long-term survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2407–2416.
- Chrysothomou, V., Valtter, K., Stone, J., 2009b. Cone-rod dependence in the rat retina: variation with the rate of rod damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3017–3023.
- Cideciyan, A.V., Hood, D.C., Huang, Y., Banin, E., Li, Z.Y., Stone, E.M., Milam, A.H., Jacobson, S.G., 1998. Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7103–7108.
- Cuenca, N., Pirella, L., Saucedo, Y., Lu, B., Wang, S., Lund, R.D., 2004. Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience* 127, 301–317.
- Daniás, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S.M., Mittag, T., 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 587–594.
- Daniás, J., Shen, F., Kavalirakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., Zamora, M.F., Su, Y., Brodie, S.E., Podos, S.M., Mittag, T., 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp. Eye Res.* 82, 219–228.
- D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M., Vollrath, D., 2000. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MERTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* 9, 645–651.
- Den Hollander, A.I., Roepman, R., Koeneke, R.K., Cremers, F.P., 2008. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog. Retin. Eye Res.* 27, 391–419.
- Dieterich, D.C., Trivedi, N., Engelmann, R., Gundelfinger, E.D., Gordon-Weeks, P.R., Kreuz, M.R., 2002. Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression,

- phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1433–1443.
- Dryja, T.P., McGee, T.L., Reichel, E., Hahn, L.B., Cowley, G.S., Yandell, D.W., Sandberg, M.A., Berson, E.L., 1990. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 25 (343), 364–366.
- Eisenfeld, A.J., LaVail, M.M., LaVail, J.H., 1984. Assessment of possible transneuronal changes in the retina of rats with inherited retinal dystrophy: cell size, number, synapses, and axonal transport by retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 223, 22–34.
- Fariss, R.N., Li, Z.Y., Milam, A.H., 2000. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* 129, 215–223.
- Fritsche, L.G., Loenhardt, T., Janssen, A., Fisher, S.A., Rivera, A., Keilhauer, C.N., Weber, B.H., 2008. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat. Genet.* 40, 892–896.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weitz, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., Vollrath, D., 2000. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 26, 270–271.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Cánovas-Martínez, I., Agudo-Barriso, M., Lund, R.D., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., 2009. Long-term effects of light exposure on the albino rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3612. E-Abstract.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo, M., Nieto-López, L., Cuenca, N., Pinilla, I., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., 2010. Retinal ganglion cell axonal constriction and death in the P23H-1 rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3664. E-Abstract.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Agudo, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., 2010. Retinal ganglion cell axonal compression and death by retinal vessels in light-induced retinal degeneration, submitted for publication.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809.
- Hicks, D., Sahel, J., 1999. The implications of rod-dependent cone survival for basic and clinical research. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 3071–3074.
- Hood, D.C., Lin, C.E., Lazow, M.A., Locke, K.G., Zhang, X., Birch, D.G., 2008. Thickness of receptor and post-receptor retinal layers in patients with retinitis pigmentosa measured with frequency-domain optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2328–2336.
- Jones, B.W., Marc, R.E., 2005. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 81, 123–137.
- Jones, B.W., Watt, C.R., Frederick, J.M., Baehr, W., Chen, C.K., Levine, E.M., Milam, A.H., LaVail, M.M., Marc, R.E., 2003. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *J. Comp. Neurol.* 464, 1–16.
- Kolomiets, B., Dubus, E., Simonutti, M., Rosolen, S., Sahel, J.A., Picard, S., 2010. Late histological and functional changes in the P23H rat retina after photoreceptor loss. *Neurobiol. Dis.* 38, 47–58.
- Komeima, K., Rogers, B.S., Lu, L., Campochiaro, P.A., 2006. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 11300–11305.
- Lafuente López-Herrera, M.P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2002. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 178, 243–258.
- LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Drenser, K.A., Hannery, J.G., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., 2000. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 11488–11493.
- Lewin, A.S., Drenser, K.A., Hauswirth, W.W., Nishikawa, S., Yasumura, D., Flannery, J.G., LaVail, M.M., 1998. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Med.* 4, 967–971.
- Lim, J.L., Tan, O., Fawzi, A.A., Hopkins, J.J., Gil-Harner, J.H., Huang, D., 2008. A pilot study of Fourier-domain optical coherence tomography of retinal dystrophy patients. *Am. J. Ophthalmol.* 146, 417–426.
- Machida, S., Kondo, M., Jamison, J.A., Khan, N.W., Kononen, L.T., Sugawara, T., Bush, R.A., Sieving, P.A., 2000. P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3200–3209.
- Marco-Gomariz, M.A., Hurtado-Montalbán, N., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., 2006a. Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J. Comp. Neurol.* 498, 163–179.
- Marco-Gomariz, M.A., Aguilera-Meseguer, M.E., Cánovas-Martínez, I., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., 2006b. The sensitive region of the rat retina is due to differential light exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4567. ARVO E-abstract.
- Milam, A.H., Li, Z.Y., Fariss, R.N., 1998. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog. Retin. Eye Res.* 17, 175–205.
- Mohand-Said, S., Hicks, D., Drayfus, H., Sahel, J.A., 2000. Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch. Ophthalmol.* 118, 807–811.
- Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3860–3868.
- Oishi, A., Otani, A., Sasahara, M., Kurimoto, M., Nakamura, H., Kojima, H., Yoshimura, N., 2009. Retinal nerve fiber layer thickness in patients with retinitis pigmentosa. *Eye (Lond)* 23, 561–566.
- Parrilla-Reverte, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009a. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp. Eye Res.* 89, 32–41.
- Parrilla-Reverte, G., Agudo, M., Nadal-Nicolás, F., Alarcón-Martínez, L., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Bernal-Garro, J.M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. Time-course of the retinal nerve fiber layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vis. Res.* 49, 2808–2825.
- Pavlidis, M., Fischer, D., Thanos, S., 2000. Photoreceptor degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal regeneration of ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2318–2328.
- Pennesi, M.E., Nishikawa, S., Matthes, M.T., Yasumura, D., LaVail, M.M., 2008. The relationship of photoreceptor degeneration to retinal vascular development and loss in mutant rhodopsin transgenic and RCS rats. *Exp. Eye Res.* 87, 561–570.
- Pinilla, I., Lund, R.D., Sauvage, Y., 2005. Enhanced cone dysfunction in rats homozygous for the P23H rhodopsin mutation. *Neurosci. Lett.* 382 (1–8), 16–21.
- Pittler, S.J., Baehr, W., 1991. Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 8322–8326.
- Ribelayga, C., Cao, Y., Mangel, S.C., 2008. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 59, 790–801.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T.M., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009a. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vis. Res.* 49, 115–126.
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F.J., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor, S., Colmes, T., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vis. Res.* 49, 637–647.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009c. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol. Vis.* 15, 2578–2588.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jiménez-López, M., Mayor-Torroglosa, S., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp. Eye Res.* 90, 168–183.
- Santos, A., Humayun, M.S., de Juan Jr., E., Greenburg, R.J., Marsh, M.J., Klock, L.B., Milam, A.H., 1997. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa: a morphometric analysis. *Arch. Ophthalmol.* 115, 511–515.
- Shelley, E.J., Madigan, M.C., Nishi, R., Penfold, P.L., Provis, J.M., 2009. Cone degeneration in aging and age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 127, 483–492.
- Shen, J., Yang, X., Dong, A., Petters, R.M., Peng, Y.W., Wong, F., Campochiaro, P.A., 2005. Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *J. Cell Physiol.* 203, 457–464.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B.P., Son, J.L., Roberson, E.D., Steele, M.R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Horner, P.J., Marsh-Armstrong, N., 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci.* 28, 548–561.
- Sposato, V., Lovieno, A., Sornelli, F., Aloe, L., 2008. Axonal transport deficit in the optic nerve of rats with inherited retinitis pigmentosa and experimentally induced glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246, 1553–1558.
- Steinberg, R.H., Flannery, J.G., Naash, M., Matthes, M.T., Yasumura, D., LaVail, M.M., Chen, J., LaVail, M.M., 1996. Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, S698.
- Stone, J.L., Barlow, W.E., Humayun, M.S., de Juan Jr., E., Milam, A.H., 1992. Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 110, 1634–1639.
- Swaroop, A., Branham, K.E.H., Chen, W., Abezasis, G., 2007. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum. Mol. Genet.* 16, 174–182.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1988. Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.* 102, 92–101.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M.P., Mayor, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv. Ophthalmol.* 45, 261–267.
- Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1988. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8, 265–280.
- Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 1996. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7, 1995–1999.
- Villegas-Pérez, M.P., Lawrence, J.M., Vidal-Sanz, M., LaVail, M.M., Lund, R.D., 1998. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J. Comp. Neurol.* 392, 58–77.
- Walia, S., Bhrman, G.A., 2008. Retinal nerve fiber layer analysis in RP patients using Fourier-domain OCT. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3525–3528.
- Walia, S., Fishman, G.A., Edward, D.P., Lindeman, M., 2007. Retinal nerve fiber layer defects in RP patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4748–4752.
- Wang, S., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 2000. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 537–545.

- Wang, S., Villegas-Pérez, M.P., Holmes, T., Lawrence, J.M., Vidal-Sanz, M., Hurtado-Montalban, N., Lund, R.D., 2003. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr. Eye Res.* 27, 183–196.
- Wang, S., Lu, B., Lund, R.D., 2005. Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cell-based therapy. *J. Comp. Neurol.* 491, 400–412.
- Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., Remé, C.E., 2005. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 275–306.
- Yu, D.Y., Cringle, S., Valter, K., Walsh, N., Lee, D., Stone, J., 2004. Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2013–2019.

10. ANEXO II

10. ANEXO II.**TITLE PAGE****Title: RETINAL GANGLION CELL AXONAL COMPRESSION BY RETINAL VESSELS IN LIGHT-INDUCED RETINAL DEGENERATION****Author names and affiliations:**

García-Ayuso Diego¹, Salinas-Navarro Manuel¹, Agudo-Barriuso Marta², Alarcón-Martínez Luis¹, Vidal-Sanz Manuel¹, Villegas-Pérez María P¹

¹Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain.

²Unidad de Investigación. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Servicio Murciano de Salud, Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia. 30120 El Palmar, Murcia, Spain.

Abbreviated title: RGC loss after light-induced photoreceptor death**Keywords:** phototoxicity, retinal ganglion cells, photoreceptors, axonal compression, retinal vessels.**Corresponding author:**

María P. Villegas-Pérez, Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain.

Phone: +34 868887573

Fax: +34 868883962

e-mail: mpville@um.es

Acknowledgments for Support: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI060780, Fundación Séneca 05703/PI/07 and 04446/GERM/07, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RD07/0062/001, ISCIII-FEDER: PI10/01496, PI10/00187.

ABSTRACT

Purpose: To analyze the damage produced by light in mydriatic and miotic albino retinas under two different sources of light.

Methods: Albino Sprague Dawley (SD) female rats were exposed to 3,000 luxes during 48h under two different light sources: linear or circular bulbs. Before exposure, their left pupil was dilated. Before and at different times after light exposure (ALE) electroretinographic (ERG) signals were recorded. One week before processing, retinal ganglion cells (RGCs) were traced by applying fluorogold (FG) onto the superior colliculi. Just before processing some animals were intravenously injected with horse-radish peroxidase to analyze retinal vascular leakage. At different times ALE animals were sacrificed and their retinas dissected as whole mounts or cross sections. Cross sections were used to study the retinal degeneration and to detect apoptotic nuclei by the TUNEL technique. Whole mounts were used to analyze vascular leakage, to investigate the nerve fibre layer, identified by immunodetection of neurofilaments, and to quantify the whole population of RGCs identified by FG tracing and Brn3a immunodetection. With the quantitative data, detailed isodensity maps were generated to study the spatial loss of RGCs.

Results: Phototoxicity causes an immediate and permanent abolishment of the electroretinographic response. Early ALE, photoreceptor degenerate by apoptosis and this death is more severe in mydriatic conditions and under circular bulbs. Photoreceptor loss starts in an arciform dorso-medial retinal area, but at 3 months ALE has spread to the whole retina and there are not differences due to either pupil dilation or light source. Three months ALE, RGC axons show distorted trajectories and abnormal expression of neurofilaments. Six months or more ALE, there is significant death of RGCs caused by axonal strangulation by displaced inner retinal vessels. Topography of the surviving RGCs shows that their loss is not uniform throughout the retina.

Conclusions: Light damage to photoreceptors depends on pupil dilation and light source, but affects with time all retinal layers. These deteriorative events are also observed in light-induced and inherited retinal degenerations in pigmented animals, but occur differently. Thus, the role of ocular pigmentation and aetiology of photoreceptor degeneration on retinal remodelling deserves further investigation.

INTRODUCTION

Light induced retinal damage i.e. phototoxicity, is a well established model of retinal degeneration. This model is often used to study the reasons leading to photoreceptor death, to assess the course of the subsequent degenerative events occurring in the retina and to test neuroprotective therapies for oxidative stress. Importantly, this model covers, as well, the essential characteristics of human age related macular degeneration [1].

Photoreceptor death, triggered by inherited dystrophies [2,3,4,5] or light exposure [1,6,7] affects, with time, to all retinal layers. At late stages, in the innermost layer, the retinal vessels overlying the nerve fibre layer drag, compress and sever the Retinal Ganglion Cell (RGC) axons, finally causing the death of these neurons [3,4,6,5]. Thus, RGC death in this model is not secondary to photoreceptor degeneration, but to retinal remodelling after light exposure [1]. Retinal Ganglion cell death is also a common feature in retinitis pigmentosa [8,9,10,11] but it is not yet known if it is due to a similar mechanism.

In pigmented non-dystrophic RCS and Lister-Hooded rats after light exposure it was documented, for the first time, the existence of an “arciform area” of vascular leakage in the superotemporal retina which was the first and more severely affected retinal area [6,7]. This area corresponds to the region of increased susceptibility to light damage described by other authors in normal rats [1,12,13,14,15,16] and in transgenic rat models of retinitis pigmentosa [17].

Why is there an “arciform area” in the superotemporal region of the rat retina that is more sensitive to light is, at the moment, a question for debate. Our group has described also that in the rat retina the highest RGC densities are found in the superior retina along the naso-temporal axis and we have proposed that this area may represent the visual streak of this species [18,19,20]. Since the “arciform area” and the visual streak in the rat show a similar topography, this “arciform area” could be the result of preferential fixation.

The description of the light sensitive “arciform area” and RGC axonal compression and death in light-induced and inherited retinal degeneration were carried out in pigmented animals. Hence, the question rose whether these events were dependent upon ocular pigmentation. Therefore, in this study we have investigated the damage produced by light in mydriatic and miotic albino retinas under two different sources of

light. Specifically we have studied: i) the temporal course and retinal location of photoreceptor degeneration; ii) the retinal functionality after light exposure; iii) the occurrence of vascular leakage; iv) the late appearance of displaced retinal vessels; and v) the degeneration of the inner retina, quantifying and mapping topographically the loss of retinal ganglion cells.

MATERIALS AND METHODS

Animal handling

Albino Sprague Dawley (SD) female rats weighing 150 to 180 g (2 months \pm 1 week of age) were obtained from the breeding colony of the University of Murcia. Rats were housed in temperature and light controlled rooms with a 12 h light/dark cycle (light from 8 AM to 8 PM) and had food and water *ad libitum*. Light intensity within the cages ranged from 5 to 30 lux (scotopic to mesopic conditions). Animal manipulations were carried out following the Spanish and European Union regulations for the use of animals in research and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Moreover, adequate measures were taken to minimize pain or discomfort.

Surgical manipulations were carried out under general anaesthesia induced with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Ketolar®, Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún®, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). For recovery from anaesthesia, rats were placed in their cages and an ointment containing tobramycin (Tobrex®, Ophthalmic unguent Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. Animals were sacrificed by an intraperitoneal injection of an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Light exposure

Before light exposure, the left pupil was dilated with a drop of 1% atropine (Colircusí atropina al 1%®, El Masnou, Barcelona, Spain) in order to assess the effect of dilation on retinal phototoxicity. Each animal was placed individually in a 23 x 23 cm standard transparent animal cage with an upper removable metallic grid and the food and the water were placed in Petri dishes within the cage. Litter covered the bottom of the cage which was overlaid by a metal grid to prevent the animals from burying their heads in the litter to hide from light.

In a previous study in pigmented rats, to induce photoreceptor degeneration, we dilated the left pupils and exposed the animals to 3,000 lux continuously for 72 hours [6,7]. In this study, we tried the same paradigm in albino rats but the results were devastating. Thus, we used a reduced exposure period to 48 hours.

Continuous light exposure during 48 hours was carried out under two types of cool fluorescent white light lamps: i) two linear bulbs, situated approximately 20cm above the cages, and ii) three circular bulbs surrounding the cages. For both types of bulbs, light intensity, when measured in the centre of the cages, was approximately 3,000 lux while in other areas within the cage was $3,000 \pm 100$ lux. Because the moment of the day at which exposure is initiated influences the amount of retinal phototoxicity, light exposure always started between 10 and 12 AM. Left eye mydriasis was checked every 24 hours, and when the animals did not show a full left eye dilation, they received another drop of atropine.

Electroretinography

Electroretinographic (ERG) recordings were obtained from a group of 12 animals prior to light exposure (baseline) and 1 and 7 days After Light Exposure (ALE) and from a group of 3 experimental animals 6 months ALE and one control animal of a similar age. ERG recordings were carried out as previously described [21,22]. Briefly, the retina was stimulated with light intensities ranging between 10^{-5} and 10^{-4} $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the scotopic threshold response (STR), between 10^{-4} and 10^{-2} $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the rod response and between 10^{-2} and 10^2 $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the mixed (rod and cone) response. Analysis of the recordings was performed using the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) normalization criterions. The STR was analyzed for each stimulus: positive STR (pSTR) was measured from baseline to the "hill" of the positive deflection, ca. 110 ms from the flash onset, and negative STR (nSTR) was measured from baseline to the first "valley" after the pSTR, ca. 220 ms from the flash onset.

HRP injection

To label the retinal blood vessels, a solution (143 mg/ml in sterile saline) of type I horseradish peroxidase (HRP, 44kDa, Sigma P 8125, 12,000 units) was injected in the femoral vein fifteen minutes before processing as previously described [3,6,7]. Forty animals received HRP injections and were processed at 0 hours (n=18), 1 week (n=9), 1 month (n=7) and 3 months (n=6) ALE.

Retinal Ganglion Cell retrograde labelling from the superior colliculi

To retrogradely trace RGCs Fluoro-Gold (FG) was applied onto both superior colliculi (SCi), the main retino-recipient area in rodents, one week before animal processing following previously described methods that are standard in our laboratory [3,5,6,7,18,22,23,24]. In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gelatine sponge (Espongostan® Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 3% FG and 10% DMSO, was applied over the entire surface of both SCi. Previous studies in control rats in our laboratory have shown that FG application to the SCi results in the labelling of 98.4% of the RGC population in SD rats [18]. Fluorogold was applied to 44 animals: 5 control aged-matched animals (post-natal day 625: P625; approximately 21 month old) and 48 experimental animals that were processed at 0 hours (n=8), or 1 (n=6), 3 (n=7), 6 (n=7) 9 (n=10) and 12 months (n=10) ALE, respectively.

Tissue processing

Both eyes of each animal were processed. Some eyes were used for cross sections and others for retinal whole mounts.

Whole-mount preparations

HRP-injected animals were sacrificed at 0 hours (n=18), 1 week (n=9), 1 month (n=7) and 3 months (n=6) ALE. Both eyes were enucleated and immersed for 1 hour in a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphatebuffered saline (PBS). Later, the retinas were dissected as whole mounts by making four radial cuts in the superior, inferior, nasal, and temporal retinal quadrants. Retinal orientation was maintained by making the deepest radial cut in the superior retina. The retinas were post-fixed for 1 hour in the same fixative, washed, reacted for HRP demonstration using a modified Hanker–Yates technique [3,6,7,26], mounted on subbed slides vitreal side up and covered with anti-fading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% pphenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.0; [27]).

Fluorogold traced animals were perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH

7.4). The eyes were enucleated and the retinas were dissected as whole-mounts as described in the previous paragraph.

Immunohistofluorescence: To study retinal ganglion cell axons all FG-traced whole-mounted retinas were incubated with the monoclonal antibody RT-97 (Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa, USA) as previously described [2,3,28,29,30]. This antibody detects the phosphorylated high molecular weight (200 and 145 kDa) subunits of the neurofilament triplet (pNFH; [31,32,33]). For quantification analyses, in some FG-traced retinas (see results) RGCs were identified as well by incubation with goat anti-Brn3a (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Germany) as previously reported [5,19,20]. Briefly, retinas were permeated in PBS 0.5% Triton X-100 by freezing them during 15 minutes at -70°C, rinsed in new PBS 0.5% Triton and incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted (1:1000 for RT-97 and 1:100 for Brn3a) in blocking buffer (PBS, 2% Triton, 2% normal donkey serum-NDS, Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK). Then, retinas were washed three times in PBS and incubated 2 hours at RT with the secondary antibody (donkey Alexa-488 anti-mouse IgG(H+L) or donkey Alexa-594 anti-goat IgG (H+L), Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) diluted 1:500 in blocking buffer. Finally, retinas were thoroughly washed in PBS and mounted vitreal side up on subbed slides and covered with anti-fading solution.

Oriented cross-sections

Microtome sectioning: For this study we used animals processed immediately (n=4), or 7 days (n=4), 1 (n=4), 3 (n=4), 6 (n=4), 9 (n=4) or 12 months (n=2) ALE. As control, 2 month-old control SD rats were used (n=4).

After perfusion (see above) the eyes were enucleated and the superior pole of the eye marked with china ink. After removing the cornea and lens, the eyecups were postfixed in the same fixative for 1 hour and embedded in paraffin. Three micron thick sagittal sections were obtained in a microtome and stained with Hansen's haematoxylin and eosin or processed for terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) to detect apoptotic nuclei. The haematoxylin/eosin stained sections were mounted with DPX (BDH, VWR International Ltd. Poole, England) for observation in the light microscope. The TUNEL assay was carried out according to the manufacturer's protocol (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Quiagen, Merck Bio, Nottingham, UK) with slight modifications as follows: biotin-labelled DNA was detected by 2h

incubation at room temperature with avidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluted 1:500 in PBS containing 0.1% Triton. After washing, slides were mounted with anti-fading medium containing DAPI (VectaShield Mounting medium with DAPI, Vector, Atom, Alicante, Spain) to counter-stain all retinal nuclei.

Cryostat sectioning: For this study we used 2 control and 4 experimental retinas processed 12 months ALE. Eye cups were dissected and oriented as above. Then, they were cryoprotected by O/N immersion in 15% sucrose (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) before embedding them, with the superior pole in a known position, in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) for cryostat sectioning. Sections (15 μ m thick) were blocked in 5% normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch Inc., Suffolk, UK) in PBS 0.1% Triton-100. RGC axons and vessels were doubly detected by a 3 hours incubation at RT with a mixture of the primary antibodies rabbit anti-NFH (H-100, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) and mouse anti-RECA (mouse anti-RECA-1, AbD Serotec, Dusseldorf, Germany) diluted in blocking buffer (1:50 for anti-NFH and 1:1,000 for anti-RECA-1).

Secondary detection was carried out by incubating the sections, during 1h at room temperature, with Alexa Fluor-488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) and Alexa Fluor-594 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) each diluted 1:500 in PBS 0.1% Triton-100. Finally, sections were thoroughly washed and mounted with anti-fading mounting médium containing DAPI to counterstain the nuclei (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector. Atom, Alicante, Spain). Finally, sections were observed and photographed under a light (haematoxylin/eosin staining) or fluorescence (TUNEL signal or RECA+NFH immunodetection) microscope.

Retinal Image Analysis

Retinal whole mounts were examined and photographed under a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with different filters. The microscope was also equipped with a digital high-resolution camera (ProgRes™ C10, Jenoptik, Jena, Germany), a computer-driven motorized stage (ProScan™ H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) controlled by IPP (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) with a microscope controller module (Scope-Pro® 5.0 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), following standard procedures in our laboratory [18,19,24,34,35]. To make reconstructions of the retinal whole-mounts, retinal multiframe acquisitions were acquired

in a raster scan pattern using a x10 objective (Plan-Neofluar, 10x/0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually prior to the capture of the digitized images. Because the frame size is 0.627mm²/image, we usually need to acquire 154 images to scan the entire retina.

The images taken for each retina were saved as a set of 24-bit color image pictures and later, these images were combined into a single highresolution composite image of the whole retina using IPP. Reconstructed images were further processed using Adobe Photoshop® CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) when needed.

Retinal Ganglion Cell counting

The individual FG or Brn3a fluorescent images taken in each retina were processed by a specific cell counting subroutine developed by our group. Briefly, we used the IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image in order to clarify cell limits and separate individual cells for automatic cell counting. This procedure has been previously reported in detail [18,19,24].

Isodensity maps

To demonstrate the spatial distribution of FG and Brn3a positive RGCs, isodensity maps were generated using the specific subroutine developed in our laboratory [5,18,19,24]. Briefly, using IPP macro language every frame was divided into 64 (FG) or 36 (Brn3a) sampling areas, in which RGC counts were obtained and cell densities calculated. These densities were represented as filled contour plots using the graphic software SigmaPlot® for Windows™ (Version 8.0; SPSS, Inc).

Statistics

Statistical analysis was done using SigmaStat® 3.1 for Windows® (SigmaStat® for Windows™ Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA).

Electroretinographic data: The paired t-test was used to compare electroretinogram wave amplitudes prior and after light damage in the same animals (0-1 month ALE). The groups analyzed 3 and 6 months ALE were compared to age-matched animals using the unpaired t test. The per cent wave amplitude response ALE was calculated using the values obtained prior to light exposure. The Mann-Whitney test was used to compare amplitude percentages between one day and 7 days ALE.

RGC population: The Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups and the Mann–Whitney test was used when comparing two groups only. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Light-exposure abolishes retinal activity

As baseline, the electroretinographic (ERG) signal was recorded simultaneously from both eyes prior to light exposure.

One day ALE (n=12), the scotopic response had almost disappeared from both eyes (Figure 1A) with a significant decrease (paired t-test; $p < 0.001$) of the pSTR and nSTR waves down to, approximately, 6% and 3% of the control values, which were arbitrarily considered 100% (Figure 1B). The scotopic and mixed responses in the light exposed animals also showed a significant decrease of the a- and b-waves (paired t-test; $p < 0.001$) as they were reduced, approximately, to 10% (Figure 1B) of the control values. One week ALE, the scotopic and mixed responses were similar and not significantly different (Mann-Whitney test, $p > 0.05$) to those found 1 day ALE (Figures 1 A,C). The a-wave showed a partial recovery for the dimmest stimulus but remained at the levels found 1 day ALE for the rest of the stimuli (compare Figure 1B and C). Six months ALE, the ERG response was normal in the control age-matching animal and completely abolished in the experimental animals (n=3, data not shown).

In conclusion, the ERG data indicate that there is an almost complete abolition of the retinal activity from the first day ALE that persists for the duration of the study (6 months).

Light-induced vascular leakage: the “arciform area”.

HRP labelling in whole mounted retinas was carried out to investigate vascular leakage in the photoexposed retinas. Diffuse HRP leakage was found at 0 (n=18 rats, i.e. 18 left and 18 right retinas) and 7 days (n=9 rats) ALE in the previously described “arciform area” of the superotemporal retina (Figure 2B, C), but not at longer times (1 (n=7 rats) and 3 (n=6 rats) months). The size of the “arciform area” showing HRP leakage varied between animals, but it was usually greater in the retinas processed at 0 hours than at 7 days ALE.

HRP leakage occurred in dilated and non-dilated eyes, but it was more frequent in the dilated left eyes (Figure 2 B,C). Out of the total of retinas analyzed at 0 days ALE, vascular leakage was observed in 13 left (72%) and 3 right (23%) retinas. This proportion diminished with time and at 7 days only 3 left and 3 right retinas (18%) showed vascular leakage in the “arciform area”. In conclusion, in the albino rat, HRP-leakage is found

more frequently in the left (dilated) eyes than in the right (non-dilated) eyes, and this leakage occurs very early after ALE.

Time course of light-induced photoreceptor degeneration: effect of the light source and pupil dilation

Control animals showed an outer nuclear layer (ONL) 12 to 14 nuclei thick and an inner nuclear layer (INL) 3 to 4 nuclei thick (Figure 3 U-V; table 1).

The experimental retinas showed a progressive photoreceptor loss that was evident as soon as 0 days ALE (Figure 3, table 1). Independently of pupil dilation or the light source, this loss was always more severe in the superior mid-dorsal retina, a location that corresponds to the “arciform area” of HRP leakage (Figure 3). Nonetheless, both the dorsal and ventral retinas were gravely affected and only the extreme periphery was intact and, because the retina is thinner there, a transition zone was never seen. Pupil dilation induced an earlier and quicker photoreceptor loss but, by 1 month ALE, retinal degeneration had reached similar levels in both eyes (Table 1). Circular bulbs (Figure 3, first and second columns) induced more severe loss than linear bulbs (Figure 3, third and fourth columns) but only up to the 3rd month ALE (Table 1 and Figure 3, compare A-B and E-F with C-D and G-H, respectively), and by this time or more ALE, the appearance of the retina was similar in both experimental groups (Figure 3 M-T; table 1). Six months or more ALE, the degree of retinal disorganisation had progressed further: the ONL had disappeared remaining only a very thin INL and the inner plexiform, ganglion cell and nerve fiber layers (Table 1, Figure 3, Q-T). After this time point, tortuous complexes of vessels appeared subretinally (between the retinal pigment epithelium –RPE- cells and Bruch’s membrane) in the experimental retinas (Figure 3 Q-T, arrowheads). These vessels were sometimes connected with vessels that ran vertically from the inner retinal vascular plexus and that were usually surrounded by non-pigmented RPE cells, which migrated along the surface of these vessels (Figure 3 Q-T, arrows). This is further analyzed below.

Light-induced photoreceptor death is apoptotic.

To assess whether photoreceptor loss ALE was due to apoptosis, the TUNEL assay was carried out in cross sections of control and experimental retinas at increasing survival intervals ALE. In control retinas, no TUNELpositive photoreceptor nuclei were

observed (Figure 4 A-B). TUNEL-positive nuclei were detected in the ONL of the animals processed at early times ALE, 0 and 7 days (Figure 4C-F), but not at 1 month (Figure 4 G-H), in spite of the fact that, according to the haematoxylin/eosin stained sections, photoreceptors continue to degenerate during, at least, 3 months ALE.

Light-induced RGC axonal abnormalities

In control retinas pNFH⁺ axons showed a linear trajectory from the optic disc to the medial region of the retina (Figure 5 A,E), as previously described [5,30]. This linear trajectory and expression pattern was maintained in the retinas processed early ALE. However, in the animals processed 3 months or more ALE, pNFH⁺ axons presented distorted non linear trajectories caused by regions of axonal strangulations (Figure 5 D,F,H-J). These compressions appeared first in the dorsal retina but extended throughout the retina and became more frequent and severe with time (Figure 5D). By 6 months ALE, axonal bulbs and wandering axons could be seen above and below the compression points (Figure 5 H-J). These axonal strangulations are caused by the external displacement of vessels that cross the retinal nerve fiber layer (Figure 6, see also figure 3 Q-T) and drag the RGC axons, causing their strangulation and eventual severing.

In addition to these axonal aberrations, 3 or more months ALE it was also observed that some RGC bodies and their proximal dendrites became pNFH⁺ (Figure 5 F-H), an abnormal expression pattern that we have described as a hallmark of neuronal degeneration [30].

Delayed light-induced RGC loss

The whole population of fluorogold-traced RGCs was counted in the right and left experimental retinas processed at increasing times ALE (Table 2, Figures 7,8). There was not a significant difference (Mann-Whitney test) between the number of RGCs counted in the left and right retinas within each time point, at any period analyzed. The number of FG-traced RGCs started to decrease at 1 and 3 months ALE, however it was not till 6 months that the RGC population had significantly diminished compared to control rats (P60 or P365, Mann-Whitney test, $p < 0.001$; Figures 7A, 8A,E-H, Table 2). From 6 till 12 months ALE, the percentage of RGC loss progresses further, though not significantly, and so in this period ALE it represents between 10 and 17% of the total RGC population (Figures 7A, 8 E-H; Table 2).

Because after light exposure, RGC axons are strangulated by retinal vessels, it was possible that the decrease of FG-traced RGCs reflected an impairment in the transport of FG to the soma rather than actual RGC death. To fully address this issue, RGCs in control retinas and at 9 and 12 months ALE were detected, as well, by their expression of Brn3a. In these retinas FG and Brn3a positive RGCs were quantified (Table 2, Figures 7B, 8). These data show that there is a decrease of Brn3a positive RGCs that parallels the diminution of FG-traced RGCs indicating that, at least at these times ALE, there is RGC death.

Topography of RGC loss

Based on the quantification data, isodensity maps showing the spatial distribution of FG or Brn3a positive RGCs in control and in experimental retinas were generated. During the first 6 months ALE, RGC distribution resembled that seen in control animals (Figure 8). In agreement with the quantification data, 6 months or more ALE there was a tendency for the highest RGC densities (represented by warm colours, red-oranges) to disappear, reflecting RGC loss. At 9 and 12 months ALE, yellow and oranges (high-medium densities) were being replaced by green-blues (lower densities) indicating a further RGC loss though, as abovementioned, this decrease was not statistically significant. Importantly, RGC loss was observed whether RGCs were identified by tracing or Brn3a expression, and the topographic maps of FG-traced or Brn3a positive cells were very similar indicating that both methods were similarly reliable.

RGC loss was not evenly spread throughout the retina, because some retinal regions are more affected than others (Figure 8 H-L) and some retinas showed a few wedge-shaped areas of cell loss (Figure 8 K-L) by 12 months ALE. In these areas, both FG-traced and Brn3a positive RGCs were absent, indicating that they were the result of sectorial RGC death.

DISCUSSION

In this work we have studied the effects of light exposure on the albino rat retina and demonstrated that causes, primarily, a rapid photoreceptor degeneration whose severity depends on the light source, the region of the retina and pupil dilation. After photoreceptor death there is a progressive retinal degeneration that affects all retinal layers, causing thinning of the outer plexiform layer and of the inner nuclear layer and displacement of the inner retinal vessels that cross the nerve fibre layer dragging the RGC axons. Consequently, RGC axons start to show an abnormal morphology and expression of pNFH. Finally, due to vessel traction of their axons, there is an impairment of the axonal transport, axonal interruption, and the RGC die. We thus document that in the albino rat, light exposure causes the same degenerative events that we have already observed in other inherited [2,3] or light induced [6] (Table 3) models of retinal degeneration. However, we also document that there are important differences between these models that illustrate that both, light pigmentation and the aetiology of photoreceptor degeneration, influence retinal remodelling after photoreceptor degeneration.

The degree of retinal damage by light exposure depends, among other factors, on eye pigmentation, [12,36,37,38] and light wavelength [39,40]. In opposition to pigmented rats [6,7,12,36], in albino rats pupil dilation is not necessary to induce retinal degeneration (Table 3), which supports the dependence of light damage on ocular pigmentation [12,36,37,38]. Even so, our data show that a maintained mydriasis during the photoexposure period induces a quicker degeneration than the one induced under miotic conditions. However, this difference is only observed up to a month after light exposure.

In this work, damage was induced by photo-exposing the animals to white fluorescent light, which contains all wavelengths. Because in our previous study, we used only linear bulbs and we found that light damage was more severe in the dorsal retina [6] (Table 3), in this study, we used two types of cold fluorescent bulbs: linear bulbs situated in the ceiling or circular bulbs situated around the transparent cages in order to observe whether the location of the light source influences the location of the retinal damage. Although in both instances light intensity within the cages was similar ($3,000\pm 100$ lux), and the inflicted damage was comparable at 3 months ALE, this was more severe at earlier times when circular bulbs were used. One possible explanation for this fact is that when circular bulbs are used, the animals receive light from all directions.

However, we did not find, as we were expecting, any differences in the location of the retinal damage between the two different light sources.

Very early ALE two pathological signs are observed: vascular leakage and photoreceptor death. In pigmented rats, light exposure causes two separate retinal degenerative events that may relate to differential light exposure across the retina: an early “arciform area” of degeneration in the superotemporal retina and a delayed degeneration in the central and ventral retina [6]. The “arciform area”, observed by vascular leakage of HRP, lasted up to a month ALE and it was the most severely affected region [6] (Table 3). In the albino retina, vascular leakage in the “arciform area” was observed only during the first week ALE just in 22 of the 54 retinas analyzed, indicating that HRP leakage within this area is less prevalent in albino than in pigmented animals (Table 3). Thus, the amount and duration of vascular leakage may depend, at least in part, on the melanin content of the eye. It is worth noting that, in spite of this lesser frequency and duration of vascular leakage, the degeneration in the albino strain, as in the pigmented one, started and was more severe in the “arciform area” (Table 3). Interestingly, this area is located in the “photosensitive area” described in the superior retina in normal rats [1,12,13,14,15,41,42].

Melanin content also has an effect on the degree of photoreceptor death. Photoexposure of pigmented rat to the same light intensity as the albino animals of this study (3,000 lux) but during a longer period (72 hours) induced photoreceptor loss but, importantly, only in the dilated eyes [6]. Besides, the amount of photoreceptor death was somewhat smaller than in the albino rats: the ONL decreased to 0-1 nuclei thick, except in the “arciform area” where with time most retinal layers disappeared [6] (Tables 1,3). In the albino rat, photoreceptor degeneration is more dramatic, and at 3 months ALE the ONL has disappeared, independently of pupil dilation (Tables 1,3). Curiously, the degeneration in the “arciform area” did not progress to the point seen in pigmented retinas. Therefore, albino rats are more sensitive to light because, in dilated and non dilated eyes, a smaller period of exposure produces the same amount of cell death than the degeneration observed in pigmented rats subjected to mydriasis and longer exposure time. But, in contrast, albino rats show long term less degeneration in the “arciform area” than the pigmented ones (Tables 1,3). We could speculate that this is due to a greater toxicity of light in this area in pigmented animals or to factors other than ocular pigmentation, as there are many other differences between albino and pigmented animals.

In this study in albino animals, from the first day ALE, the components of the ERG that correspond to the function of the outer and inner retina were almost completely abolished. Similar results have been reported by other authors using similar methods [43,44]. These data correlates well with the early photoreceptor loss observed in haematoxilin/eosin stained oriented cross sections that was more severe in the superior retina and in the dilated eyes and with the TUNEL-positive nuclei observed at 0 hours and 7 days ALE.

Light induces photoreceptor death by apoptosis [45]. Although photoreceptor death in haematoxylin/eosin stained sections was observed during at least 3 months ALE, TUNEL positive nuclei were only found in the retinas processed from 0 hours or 1 week ALE. This apparent discrepancy may be explained by the fact that the bulk of cell death occurs between 0 and 7 days ALE and because apoptosis is a very rapid event that takes only hours to complete, very few cells die at a given point at later stages and thus, are hard to find. On the other hand, it may be that not all the photoreceptors die by apoptosis, as it has been suggested [46,47; see below].

From 3 months ALE, there is an affectation of the inner retina that was firstly observed by the abnormal expression of pNFH. In these retinas, axonal pNFH signal reached the retinal periphery and it was also detected in some RGC somas and dendrites, mimicking the aberrant expression pattern, hallmark of RGC degeneration, described after light toxicity in pigmented animals [6], optic nerve injury [30] and ocular hypertension [22,25]. Thus, at 3 months ALE, RGCs started to show signs of degeneration which ended 3 months later in a significant decrease of this neuronal population.

What is causing the death of RGCs? In flat mounted retinas it was observed that RGC axons presented distorted non linear trajectories caused by strangulations. These axonal strangulations were more severe and frequent with time ALE and resembled those described in the retinas of rats and mice with inherited retinal degenerations [2,3,4,5,29] and in pigmented rats ALE [6]. These strangulations are caused by displaced vessels that, after crossing the optic fiber layer, run deep to supply subretinal vascular complexes and in doing so, traction the RGC axons. These vessels ran vertically from the inner retinal vascular plexus and are connected to subretinal vascular formations that belong to the outer plexus of the retinal circulation [4,6] and have been observed as well, though they were less extensive, in RCS-p+, P23H and in pigmented lightexposed rats [3,4,5,6].

Six months or more ALE, when RGC degeneration was significant, there were axonal bulbs and wandering axons above and below the vessel strangulations, suggesting that the axonal transport has been interrupted, causing an axotomy-like insult which is further supported by the abovementioned aberrant expression of pNFH and later RGC death.

Because RGC death in this model is triggered by axonal interruption, it was possible that the decrease of FG+ RGCs was due to a deterioration of axonal transport rather than actual RGC death. To investigate this possibility RGCs in control and at 9 and 12 months ALE were identified by retrograde axonal tracing and Brn3a expression. The number of surviving Brn3a+ RGCs matched that of FG+ RGCs, demonstrating that phototoxicity induces a delayed degeneration and death of RGCs. The parallelism between the numbers of FG-labelled and Brn3a-labelled cells in these retinas suggests that RGC death caused by axonal compression is a very rapid event.

RGC degeneration is observed when photoreceptor loss is almost complete, in agreement with other models of photoreceptor degeneration either induced or inherited which supports the hypothesis that is due to retinal remodeling after photoreceptor degeneration [2,3,5,6]. Interestingly, in the albino strain photoreceptor's death is equally dramatic in dilated and not dilated eyes from 3 months onwards, and so, entails the same level of RGC loss in both eyes, independently of pupil dilation (Table 3). Isodensity maps showed that in albino animals, RGC death was distributed more or less evenly throughout the retina. This pattern of cell death is thus different than that observed in pigmented animals ALE because, in this strain, RGC death was mainly localized in the superior retina, peripheral to the "arciform area" of maximal degeneration [6] (Table 3). On the other hand, both albino animals and pigmented animals ALE [6] (Table 3) and dystrophic RCSp+ rats [2,3] show wedge-shaped sectors lacking RGCs. This is consequent with the proposed mechanism of axotomy-induced RGC loss: because vessels sever bundles of axons and not individual axons, RGC loss is observed in pie-shaped sectors. In this study we document using two different methods, FG tracing and Brn3a expression, that the diminution in RGC densities after photoreceptor degeneration is due to RGC death. RGC death has also been shown to a large extent in retinitis pigmentosa [8,9,10,11] but it remains to be shown whether it is due to the same remodeling mechanism.

In conclusion, these analyses demonstrate that light-induced toxicity in albino rats causes apoptotic photoreceptor death, which appears earlier in an "arciform area"

located in the mid-dorsal retina, but progresses with time spanning the whole retina. Secondary to photoreceptor degeneration and due to axonal compression by displaced blood vessels, RGCs are also affected and at long survival times ALE their number diminishes. Furthermore, we have also demonstrated that this lesion abolishes permanently and almost completely all the waves associated with the electroretinographic response. Finally, because these degenerative events have been described before but occur differently in pigmented animals with inherited retinal degenerations or ALE [3,4,5,6,29], they deserve further investigation in order to understand the influence of eye pigmentation and the aetiology of photoreceptor degeneration in retinal remodelling. Finally, strategies aimed to protect the retina in light-induced and inherited retinal degenerations should act early before the RGCs are affected.

FIGURE LEGENDS

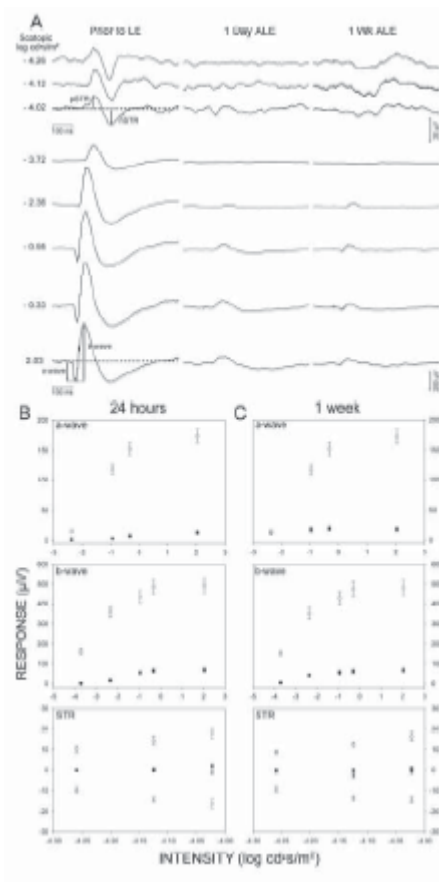


Figure 1. Light exposure abolishes the electroretinographic response

A: Electroretinograms from the left eyes (n=12), prior to light exposure and 1 day and 1

week ALE. **B-C** Amplitudes of the a- and b-waves and STR prior to light exposure (open symbols) and 24 hours (**B**) and 1 week (**C**) ALE (closed symbols). ALE: After light exposure.

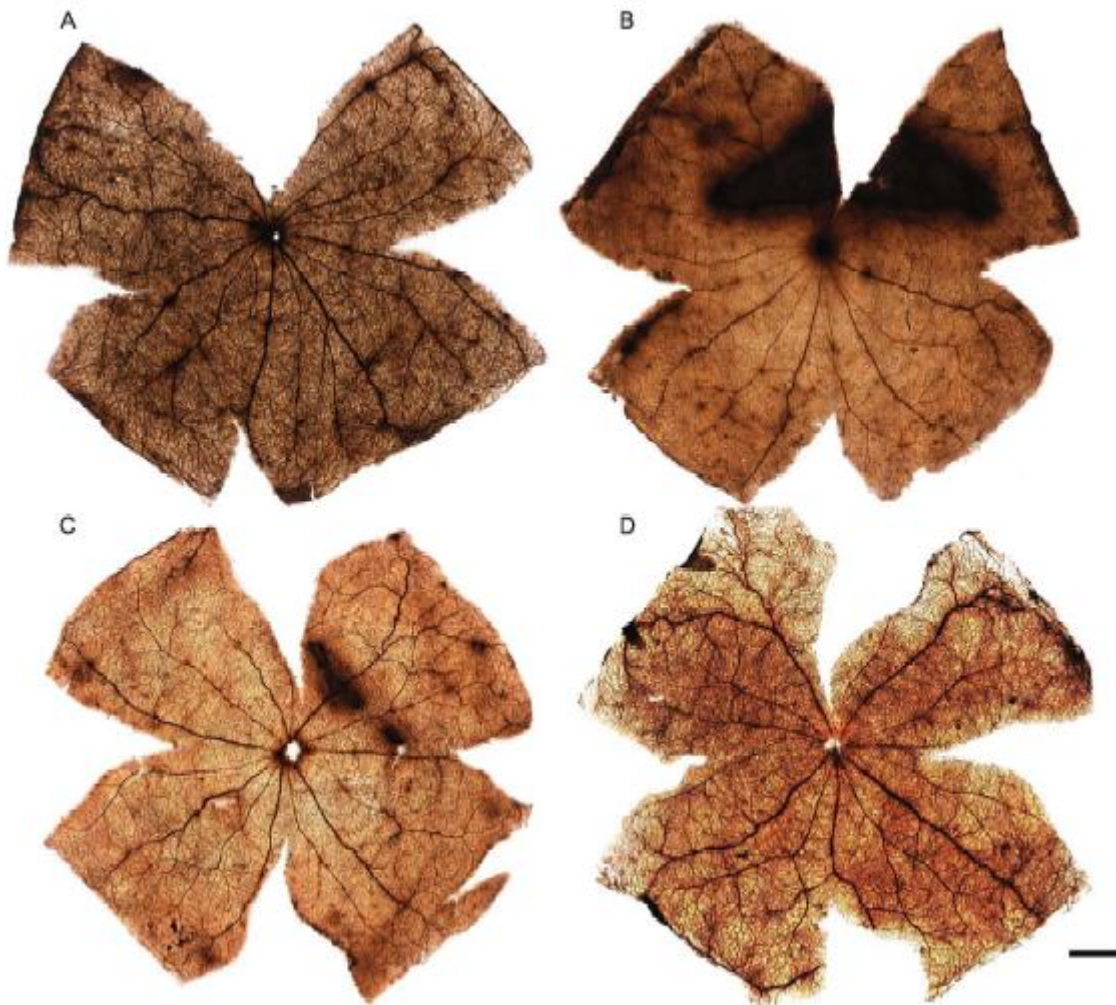


Figure 2. Light exposure provokes retinal vascular leakage

Photomontages of the retinal whole mounts of one control (A) and 3 light exposed animals (B,C,D) processed 0 hours (B) or 7 (C) or 30 days (D) ALE. The retinal vessels appear labelled with HRP in all the retinas and there is an “arciform area” showing HRP leakage in the retinas of the animals processed 0 hours (B) and 7 days (C) ALE. Bar: 1 mm. ALE: After light exposure.

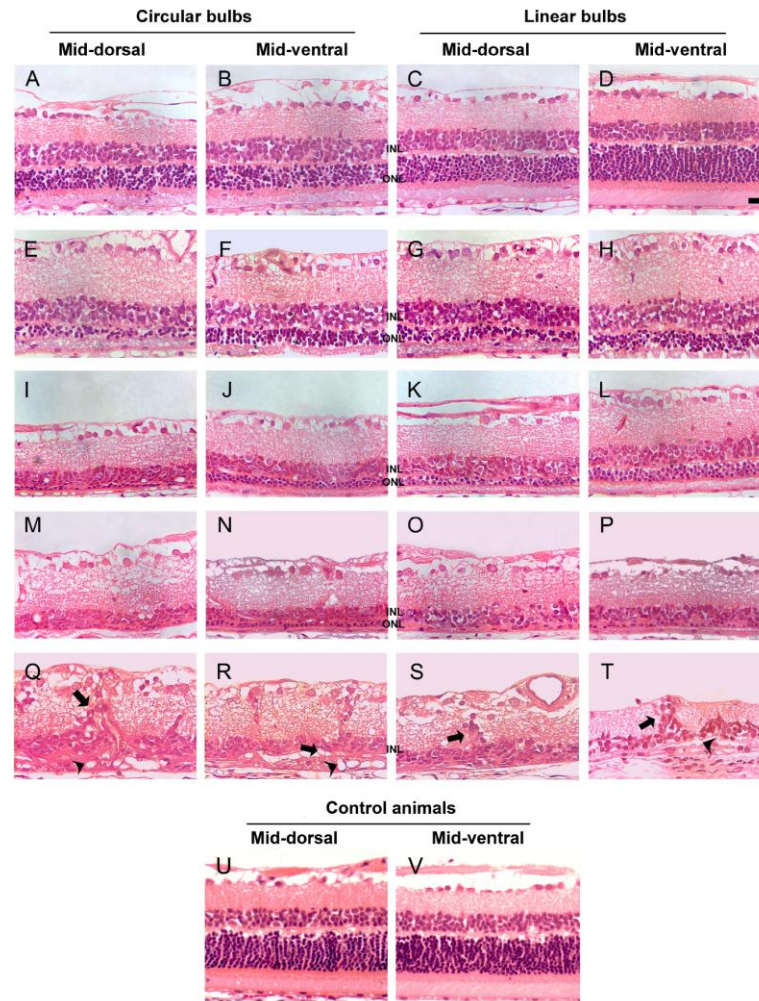


Figure 3. Temporal and spatial course of photoreceptor loss after light exposure

Haematoxylin/eosin stained retinal cross-sections of control retinas (lower row) and of the left (dilated) eyes from animals photoexposed under circular (left 2 columns) or linear (right 2 columns) bulbs. Images were taken from the middorsal and mid-ventral retina. **A-D**: animals processed at 0 hours, **E-H**: 7 days, **I-L** 1month, **M-P**: 3 months, **Q**: 6 months, **R,S**: 9 months, **T**: 12 months ALE and U,V control animals. Photoreceptor loss is observed in all sections but in **D** (animals processed 0 hours ALE; ventral retina) where the retinal structure is conserved and is similar to control animals (not shown). Photoreceptor loss was always more severe in the dorsal retina. During the first 3 months ALE, retinal damage was more drastic in the animals exposed to circular bulbs; however, from this time point onwards, it was similar in all animals (**M-P**). Six or more months ALE (**Q to T**), vascular complexes (arrowheads) were observed in the subretinal space, sometimes connected to vessels that ran vertically in the retina and that are surrounded by non pigmented cells (arrows). Bar: 100 μ m. ALE: After light exposure

	Pigmented rats (Data from: Marco-Gomariz et al, J Comp Neurol 2006) 3000 lux during 72 hours				Albino Sprague-Dawley rats 3000 lux during 48 hours (n=26)							
	Linear Bulbs				Circular Bulbs (n=13)				Linear Bulbs (n=13)			
	Dorsal retina		Ventral retina		Dorsal retina		Ventral retina		Dorsal retina		Ventral retina	
Time ALE	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)	Left eye (dilated)	Right eye (undilated)
0 hours	0-1	10-12	2-4	10-12	4-6	5-7 (n=2)	6-8	10-12	5-7	6-8 (n=2)	10-12	10-12
1 week	0-1	10-12	2-4	10-12	0-1	1-2 (n=2)	2-4	3-5	1-2	1-3 (n=2)	3-5	3-6
1 month	Reduced OPL. No ONL	10-12	Reduced ONL and OPL	10-12	Reduced OPL. No ONL. (n=2)		Reduced OPL and ONL (1-3 nuclei).		Reduced OPL and ONL (0-2 nuclei).		Reduced OPL and ONL (1-3 nuclei). (n=2)	
3 months	No ONL. No OPL. Reduced INL (0-1 nuclei).	10-12	Reduced ONL(0-1 nuclei).	10-12	No ONL. No OPL. Thinner INL (2-3 nuclei). (n=4)							
6 months or longer	Very thin retina, no layers. Subretinal vessels. RGC loss.	10-12	Reduced ONL (0-1 nuclei). Thinner INL (1-3 nuclei). Subretinal vessels. RGC loss.	10-12	Very thin INL (1-2 nuclei). Subretinal complexes of vessels. Significant RGC loss. (n=10)							

Table 1: Temporal course of retinal degeneration after light exposure: effect of eye pigmentation, light source and pupil dilation

Data from the first column correspond to pigmented Lister-Hooded and pigmented non-dystrophic Royal College of Surgeons rats exposed to 3000 lux during 72 hours from a previous study (Marco-Gomariz et al., 2006, reference 6). Control animals in this and the previous study and the undilated right eyes of pigmented rats in the previous study showed an outer nuclear layer (ONL) 12 to 14 nuclei thick and an inner nuclear layer (INL) 3 to 4 nuclei thick (not shown).

Numbers in 0 hours and 1 week rows and in all rows of the right undilated eyes of the pigmented animals refer to the nuclei thickness of the ONL. n= number of animals. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, GCL: ganglion cell layer, NFL: nerve fibre layer. RGC: retinal ganglion cells.

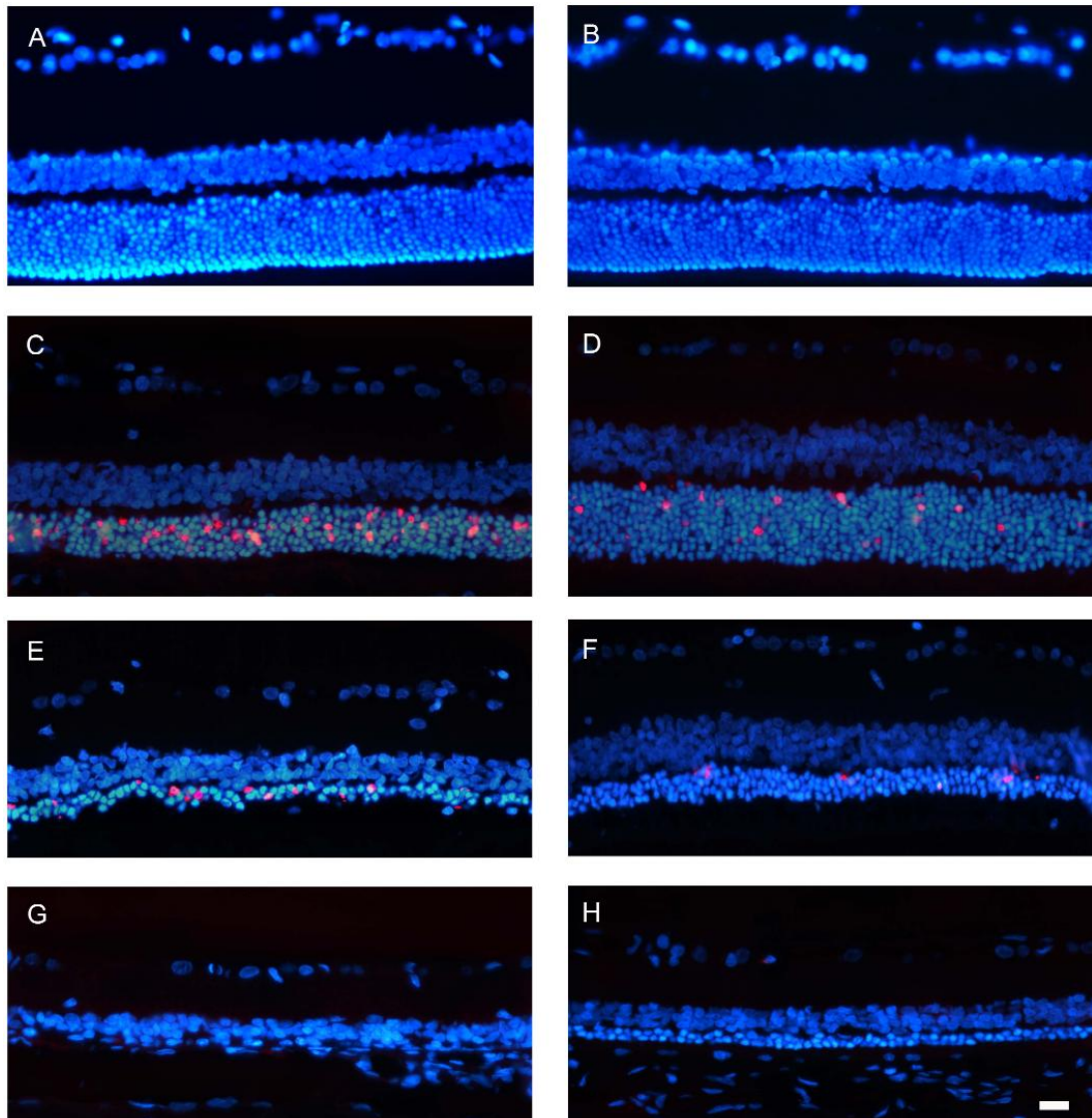


Figure 4. Light-exposure induces apoptotic photoreceptor death

Photomicrographs of TUNEL positive nuclei (red signal) in cross sections from the mid-dorsal (left column) and mid-ventral (right column) retina of control animals (**A,B**) and of light exposed animals processed 0 hours (**C,D**), 7 days (**E,F**) and 1 month (**G,H**) ALE. All retinal nuclei have been counterstained with DAPI (blue). Immediately ALE, TUNEL-positive nuclei were very abundant in the mid-dorsal retina (**C**), whilst in the ventral retina only a few scattered TUNEL-positive photoreceptor nuclei were observed (**D**). Seven days ALE, the number of TUNEL-positive photoreceptor nuclei decreased, but there were still more apoptotic photoreceptors in the dorsal (**E**) than in the ventral (**F**) retina. One month ALE (**G,H**), no TUNEL-positive photoreceptor nuclei were observed. Bar: 100 μm .

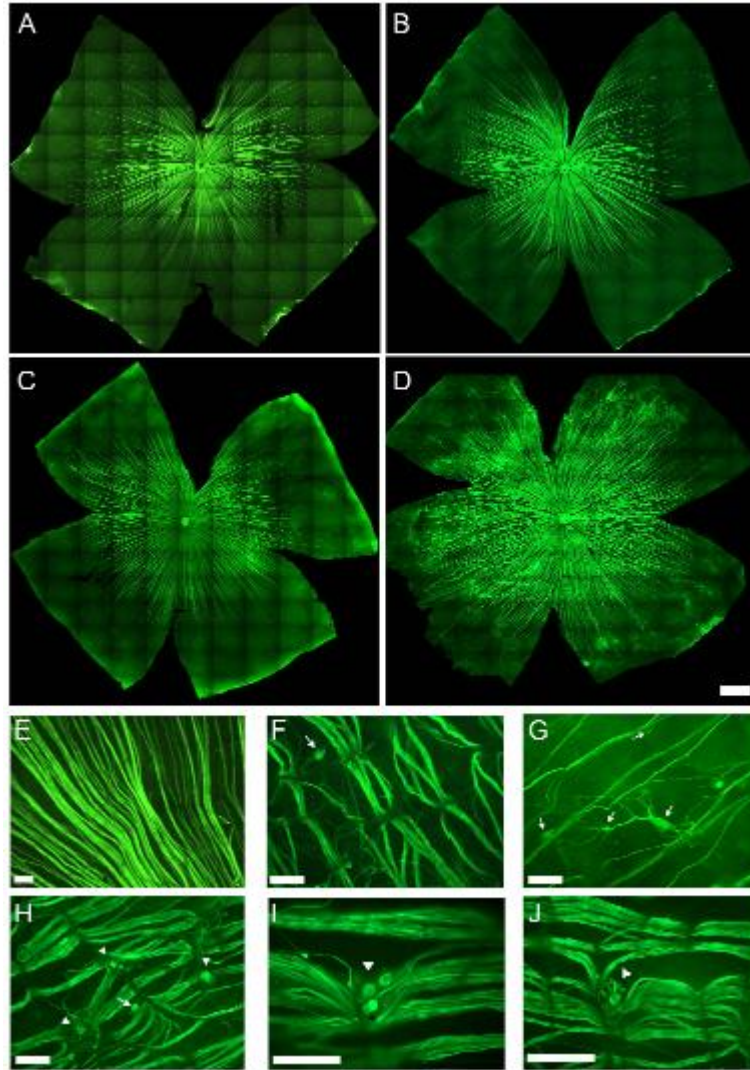


Figure 5. RGC axonal abnormalities after light exposure.

Photomontages of representative pNFH immunostained retinas from one control (**A**) and three light-exposed animals (**B-D**) processed 3 (**B**), 9 (**C**) and 12 (**D**) months ALE. The linear trajectory of the RGC axons observed in the control retinas (**A**) becomes irregular in the retinas processed 3 or more (**B-D**) months ALE. These axonal abnormalities are more important and severe as the time ALE increases (compare **B** to **D**). **E-J**: Microphotographs of the optic nerve fiber layer in whole mount preparations of the retinas of one control animal (**E**) and five experimental animals processed 9 (**F,G,H**) or 12 (**I,J**) months ALE. In the experimental animals axonal compressions by retinal vessels (**F,H-J**), axonal bulbs and meandering axons (arrowheads, **H-J**) and pNFH+ RGC somas (arrows, **F-H**) are observed. Bars: 50 μ m.

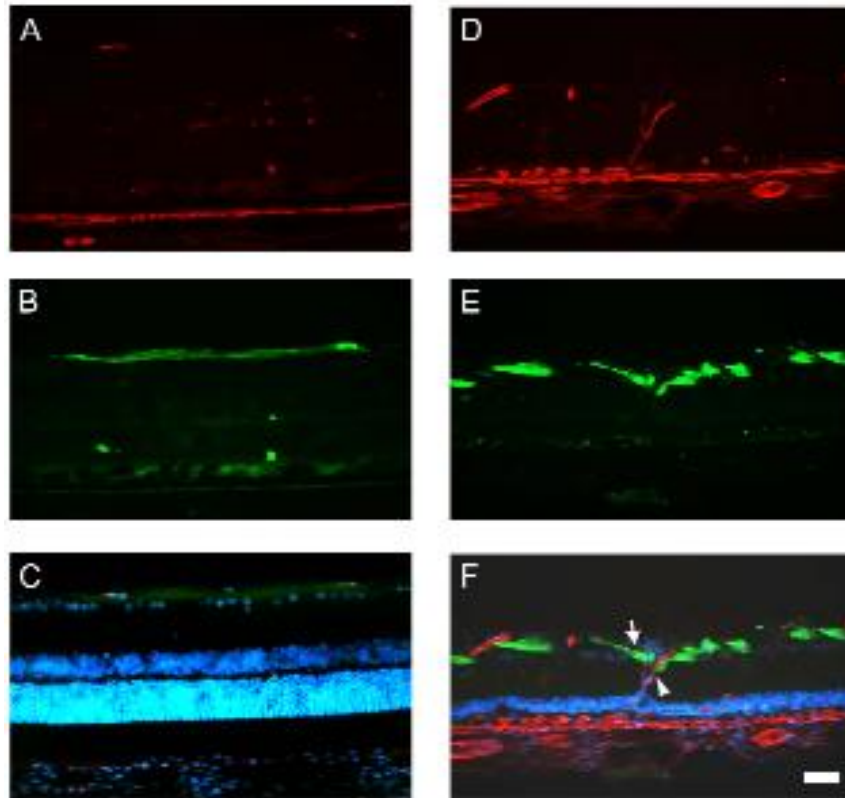


Figure 6: RGC axons are compressed by displaced retinal vessels

Representative retinal cross-sections from a control (**A-C**) and a photoexposed animal processed 12 months ALE (**D-F**) doubly immunoreacted to detect retinal vessels (red signal, **A** and **D**) and neurofilaments (green signal, **B** and **E**). In **C** and **F** are shown the corresponding coupled images and DAPI counterstaining. In control retinas, DAPI staining shows the typical layered structure of the retina, where RGC axons run parallel to the retinal layers (**B**), above the RGC nuclei (**C**). After light exposure, however, the ONL has disappeared, DAPI positive nuclei are observed crossing vertically the IPL (**F**) and the RGC axons are interrupted and dragged down (**E**, arrow) by retinal vessels crossing vertically the retina (**D**, arrowhead). Bar: 100 μ m.

Retina	Control P60				Control P625			
	FG		Brn3a		FG		Brn3a	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
1	79,090	82,653	78,732	87,628	80,535	86,019	85,923	80,348
2	77,567	74,237	90,197	93,896	82,306	83,783	82,264	86,695
3	76,965	79,478	87,835	81,566	77,599	76,522	73,943	84,896
4	82,944	84,076	90,263	82,157	82,363	75,536	85,813	84,025
5	86,150	86,657	83,680	90,021	87,124	86,927	82,157	82,043
Mean±SD	80,534±3,492	81,420±4,274	86,141±4,410	87,053±4,691	81,985±3,098	81,757±4,798	82,020±4,871	83,601±2,471
RE & LE Mean±SD	80,981±3,928		86,597±4,575		81,871±4,040		82,810±3,544	

Retina	0 hours ALE		1 month ALE		3 months ALE		6 months ALE	
	FG		FG		FG		FG	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
1	77,599	83,222	77,056	76,898	75,042	73,903	69,502	68,920
2	72,212	81,476	78,765	83,769	78,143	75,253	76,384	69,076
3	79,741	81,811	78,222	81,657	85,926	86,537	74,067	65,018
4	79,566	82,836	75,421	78,090	75,422	78,678	67,569	59,964
5	84,260	70,931	81,745	81,662	85,240	83,579	85,791	85,077
6	85,777	86,247	82,745	82,350	78,962	81,399	83,231	74,394
7	88,858	81,813			72,119	77,312	70,240	75,843
8	88,846	90,211						
Mean±SD	82,107±5,470	82,318±5,120	78,992±2,543	80,737±2,423	78,693±4,822	79,523±4,219	75,255±6,487	71,184±7,545
RE & LE Mean±SD	82,212±5,298		79,865±2,633		79,108±4,549		73,219±7,324 §	

Retina	9 months ALE				12 months ALE			
	FG		Brn3a		FG		Brn3a	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
1	79,691	74,467	#	#	76,939	81,085	#	#
2	79,849	77,367	#	#	73,287	72,567	#	#
3	63,045	67,771	#	#	49,278	58,418	#	#
4	50,506	49,366	#	#	70,271	61,707	#	#
5	79,281	73,755	#	#	70,240	64,704	#	#
6	64,954	66,632	#	#	64,199	71,006	67,899	69,783
7	71,375	73,308	72,185	73,010	66,378	70,817	64,725	67,955
8	71,112	71,992	73,506	72,970	54,433	70,131	67,779	70,999
9	70,420	69,746	73,952	69,119	71,656	63,259	61,138	76,592
10	65,203	73,296	69,397	73,944	70,404	70,004	69,647	69,997
Mean±SD	69,543±9,159	69,770±7,857	72,260±2,050	72,261±2,142	66,708±8,641	68,369±6,506	66,237±3,001	71,065±2,932
RE & LE Mean±SD	69,656±8,306 §		72,260±1,941 §		67,539±7,493 §		68,651±2,413 §	

Table 2. Quantification of the total population of RGCs in control and experimental retinas at different periods after light exposure.

In all retinas, RGCs were identified by retrograde tracing with fluorogold (FG). In addition, RGCs present in control retinas and in some retinas analyzed 9 and 12 months ALE were identified as well by Brn3a immunodetection. The whole population of FG or Brn3a positive RGCs was automatically quantified. At the bottom of each group is shown the mean \pm the standard deviation (SD) of RGCs counted in the left or right retinas. Because there was not a significant difference in the number of RGCs between right and left retinas within each group, is also shown the mean \pm SD of RGCs present in the right and left eyes of each group. P60 and P365 refer to control animals of 60 and 365 days of age, respectively. RE: right eye, LE: left eye. ALE: after light exposure. §: Statistically significant when compared to their respective control values (Brn3a or FG) (Mann-Whitney test $p < 0.001$).

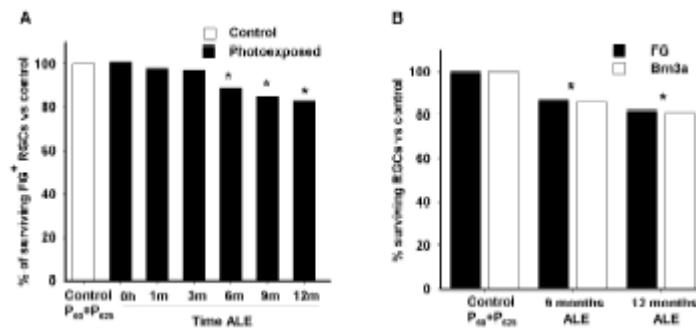


Figure 7. Percentage of retinal ganglion cell loss after light exposure

A: Graph showing the percentage of surviving FG-traced RGCs at increasing times ALE. The loss of RGCs is first significant 6 months ALE. **B:** Graph showing the percentage of surviving FG or Brn3a positive RGCs 9 and 12 months ALE. With both markers is observed that at these time points there is a significant diminution of the RGC population. In both graphs the percentages were calculated by considering 100% the control numbers obtained from 60 and 365 days old animals (P60 + P365). h: hours, m: months, ALE: after light exposure.

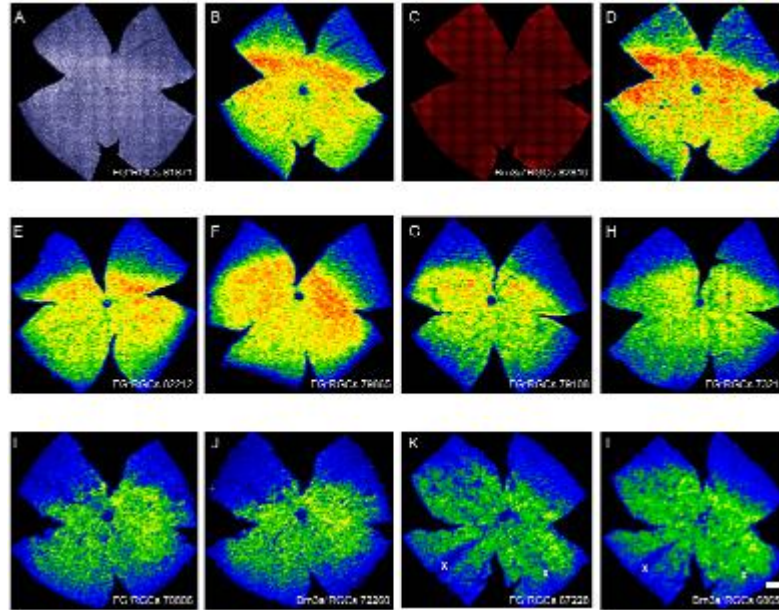


Figure 8. Topography of RGC loss after light exposure

A and C: Photomontages of a representative control retina showing RGCs identified by Fluorogold (FG) tracing (**A**) or Brn3a immunodetection (**C**). **B and D** are their corresponding isodensity maps showing the spatial distribution of FG or Brn3a positive RGCs. These maps are filled contour plots generated by assigning to each one of the subdivisions of each individual frame a colour code according to its RGC density value within a colour-scale range that goes from 0 (purple) to 3,500 or higher (red) RGCs/mm² (**B** bottom). With both markers is observed that in control retinas RGCs are densest in the dorsal pole, along the naso-temporal axis (A-D). **E to L:** isodensity maps obtained from representative photoexposed retinas processed at increasing times ALE: 0 hours (**E**), 1 month (**F**), 3 months (**G**) 6 months (**H**) 9 months (**I, J** generated from the same retina where RGCs were doubly identified by FG-tracing (**I**) and Brn3a detection (**J**) and 12 months (**K, L** generated from the same retina where RGCs were doubly identified by FG-tracing (**K**) and Brn3a detection (**L**)). RGC loss is observed at 6 months ALE (**H**), as warm colours (red-oranges) are replaced by cooler ones (yellow-green-blues). At 9 (**I, J**) and 12 months (**K, L**) ALE, yellow and oranges have almost disappeared from the maps, indicating that RGC loss has gone further and that is observed to the same amount whether RGCs are identified by FG tracing (**I, K**) or Brn3a expression (**J, L**). Wedge-shaped areas of RGC loss have been marked with an X in K-L. At the bottom of each map is shown the number of RGCs counted in the retina wherefrom the map has been generated. Superior pole is at 12 o'clock. Bar: 1 mm.

DIFFERENCES BETWEEN PIGMENTED AND ALBINO RATS AFTER PHOTOTOXIC-INDUCED RETINAL DEGENERATION.	
PIGMENTED	ALBINO
1. <u>Pupil dilation.</u>	
Necessary for phototoxicity.	Not necessary, but increases light toxicity at early periods.
2. <u>Light-sensitive “arciform area” in the dorsal retina.</u>	
Blood retinal barrier breakdown almost always present in this area.	Blood retinal barrier breakdown present in this area only in 41% of the retinas.
Longer duration of HRP leakage (up to one month).	Shorter duration of HRP leakage (up to 7 days).
Retinal degeneration in this area much more severe: a very thin retina containing a few cells and the retinal nerve fiber layer remained 1 year ALE.	Photoreceptor degeneration starts and is more severe in this area, but only at early periods ALE
3. <u>Diffuse photoreceptor degeneration in areas other than the light sensitive “arciform” area.</u>	
Less severe than in albino rats.	More severe than in pigmented rats.
4. <u>Axonal compression by retinal vessels.</u>	
Two types of axonal compressions: a “localized” in the “arciform” area and a “diffuse” in the rest of the retina.	Only is observed the “diffuse” axonal compression
Starts earlier and progresses faster than in albino rats: it is observed 21 days ALE in the light sensitive “arciform” area (causes significant RGC death in the superior retina, see below) and by 4 months ALE has extended throughout the whole retina. This late “diffuse” form of axonal compression is more prevalent in the peripapillary ventral retina.	Starts later, at around 3 months and is “diffuse”, although at early times (3-9 months) is more prevalent in the dorsal retina.
5. <u>Retinal Ganglion cell death.</u>	
Following the two types of the axonal compressions, there are two types of RGC loss: a “localized” form peripheral to the “arciform area” and a “diffuse” form that sometimes is sectorial (wedge-shaped sectors).	RGC death is “diffuse” although at late times ALE it is observed a sectorial (wedge-shaped sectors) loss.
Is more abundant in the superior retina, due to the axonal compressions in the light sensitive “arciform” area. Wedge-shaped sectors lacking RGCs can be seen 9 or more months ALE in the ventral retina.	Is diffuse and significant 6 months ALE. Wedge-shaped areas lacking RGCs can be seen at 12 months ALE mainly in the ventral retina.
6. <u>Subretinal vascular complexes.</u>	
Were seen always in the areas where photoreceptor degeneration was almost complete	
Start earlier and are more abundant: they could be seen from 7 days ALE in the “arciform area”, from 3 months in the peripapillary and all throughout the ventral retina at 9 months.	First seen at around 6 months in the dorsal retina and extended throughout the retina with time ALE.

Table 3. Differences between pigmented and albino rats after lightinduced retinal degeneration.

Light intensity was 3000 lux both for pigmented and albino animals. The duration of light exposure was 72 hours in the pigmented rats and 48 hours in albino rats. The duration of light exposure was reduced because in preliminary experiments we observed that 72 hours of light exposure had devastating effects on the albino rat retina (data not shown). Data from pigmented animals are from: Marco-Gomariz et al., J Comp Neurol 2006. HRP: Horse-radish peroxidase. ALE: After Light Exposure.

Acknowledgments

We thank José Manuel Bernal-Garro, Leticia Nieto-López, Isabel Cánovas-Martínez and Lidia Coll-Alcaraz for excellent technical help.

REFERENCES

1. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 2008; 14: 782-806.
2. Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 1996; 7:1995-9.
3. Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol* 1998; 392:58- 77.
4. Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado-Montalban N, Lund RD. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res* 2003; 27:183–96.
5. García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res* 2010; 91:800-10.
6. Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP. Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol* 2006a; 498:163-79.
7. Marco-Gomariz MA, Aguilera-Meseguer ME, Cánovas-Martínez I, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP. The Sensitive Region Of The Rat Retina Is Due To Differential Light Exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006b; 47: ARVO E-abstract 4567.
8. Gartner S, Henkind P. Pathology of retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 1982; 89:1425-32.
9. Santos A, Humayun MS, de Juan EJr, Greenburg RJ, Marsh MJ, Klock IB, Milam AH. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115:511-5.
10. Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*. 1998; 17:175-205.
11. Eng JG, Agrawal RN, Tozer KR, Ross-Cisneros FN, Dagnelie G, Greenberg RJ, Chader GJ, Weiland JD, Rao NA, Sadun AA, Humayun MS. Morphometric analysis of optic nerves and retina from an end-stage retinitis pigmentosa patient implanted with an active epiretinal array. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Feb 4. [Epub ahead of print] doi:10.1167/iovs.09-4936

12. Rapp LM, Williams TP. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal Light damage. *Vis Res* 1980; 20:1127-31.
13. Williams TP, Howell WL. Action spectrum of retinal light-damage in albino rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:285-7.
14. Borges JM, Edward DP, Tso MO. A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats. *Curr Eye Res* 1990; 9:799-803.
15. Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT. Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol* 2002; 75:547-55.
16. Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Anderson RE. Topography of retinal damage in light-exposed albino rats. *Exp Eye Res* 2008; 87:292-5.
17. Vaughan DK, Coulibaly SF, Darrow RM, Organisciak DT. A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:848-55.
18. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Colmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vis Res* 2009a; 49:115–26.
19. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas- Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:3860-8.
20. Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Automated quantification and topographical distribution of the whole population of Sand L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:3171-83.
21. Alarcón-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis* 2009; 15:2373-83.
22. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis* 2009b; 15:2578-98.
23. Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye-dil. *Exp Neurol* 1988; 102:92-101.
24. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Colmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vis Res* 2009c; 49:637-47.

-
25. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2010; 90:168-83.
 26. Linden R, Perry VH. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res* 1983; 272: 145-9.
 27. Dodd J, Solter D, Jessell TM. Monoclonal antibodies against carbohydrate differentiation antigens identify subsets of primary sensory neurons. *Nature* 1984; 311:469-72.
 28. Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1988; 8:265-80.
 29. Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:537-45.
 30. Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: A comparative study. *Vis Res* 2009; 49:2808-25.
 31. Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 1982; 298: 84-6.
 32. Veeranna Lee JH, Pareek TK, Jaffee H, Boland B, Vinod KY, Amin N, Kulkarni AB, Pant HC, Nixon RA. Neurofilament tail phosphorylation: identity of the RT- 97 phosphoepitope and regulation in neurons by cross-talk among proline-directed kinases. *J Neurochem* 2008; 107:35-49.
 33. Wood JN, Anderton BH. Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Bioscience Reports* 1981; 1:263-8.
 34. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: Neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol* 2001; 45:261-7.
 35. Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Expe Neurol* 2002; 178:243-58.
 36. Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1966; 5:450-73.
 37. LaVail MM, Gorrin GM. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. *Exp Eye Res* 1987; 44:877-89.
 38. Wasowicz M, Morice C, Ferrari P, Callebert J, Versaux-Botteri C. Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:813-20.

-
39. Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP. Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol Sci* 2000; 15:120-4.
40. Glickman RD. Phototoxicity to the retina: mechanism of damage. *Int J Toxicol* 2002; 21:473-9.
41. Li F, Cao W, Anderson RE. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp Eye Res* 2001; 73:569-77.
42. Tanito M, Kaidzu S, Anderson RE. Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:1864-72.
43. Ranchon I, Gorrard JM, Cluzel J, Vennat JC, Doly M. Light-induced variations of retinal sensitivity in rats. *Curr Eye Res* 1998; 17:14-23.
44. Seiler MJ, Liu OL, Cooper NG, Callahan TL, Petry HM, Aramant RB. Selective photoreceptor damage in albino rats using continuous blue light. A protocol useful for retinal degeneration and transplantation research. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:599-607
45. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:275-306.
46. Yu TY, Acosta ML, Ready S, Cheong YL, Kalloniatis M. Light exposure causes functional changes in the retina: increased photoreceptor cation channel permeability, photoreceptor apoptosis, and altered retinal metabolic function. *J Neurochem* 2007 103:714-24.
47. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekström P, Paquet-Durand F. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* 2008; 38:253-69.