

**Universidad CEU Cardenal Herrera**

**Departamento de Ciencias Biomédicas**



**“Nuevas estrategias de  
neuroprotección para  
el tratamiento de la  
retinosis pigmentaria”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Dolores Tania Ramírez Lamelas

Dirigida por: Dra. Dña. María Miranda Sanz

Dr. D. Salvador Merida Donoso

**VALENCIA**

**2019**





DRA. DÑA. MARÍA MIRANDA SANZ PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD CARDENAL HERRERA CEU, DR. D. SALVADOR MERIDA DONOSO, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD CARDENAL HERRERA CEU CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “NUEVAS ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA” de la que es autora Dña .Dolores Tania Ramírez Lamelas, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y, para que conste a efectos oportunos, firmamos la presente en Moncada a

26 de enero de 2017

Fdo.: María Miranda Sanz

Fdo. Salvador Mérida Donoso



Este trabajo de investigación ha sido financiado por ayudas procedentes de:

- Universidad Cardenal Herrera CEU-Santander PRUCH1216: Estrategias de neuroprotección y reemplazo para el tratamiento de la Retinosis.

- Fundación Mutua Madrileña. Ayudas para la realización de proyectos de investigación y desarrollo tecnológico. 2013-2015



# AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que han formado parte de este viaje, que de una manera u otra han hecho posible la realización de esta tesis. Debo manifestar mi agradecimiento a todas ellas porque sin su fuerza, ánimo, ayuda y dedicación no hubiera sido posible llegar esta aquí.

Para comenzar el apartado de agradecimientos y como no podía ser de otra forma, en primer lugar, dar las gracias a una de las personas más extraordinarias y buenas que he conocido en mi vida, mi directora y amiga María Miranda Sanz. Gracias por darme la oportunidad cuando más lo necesitaba, por enseñarme el amor a la ciencia, a luchar y a descubrir que todo es posible si te lo propones. Gracias por confiar en mí por encima de cualquier obstáculo, a perdonar mis errores y permitir que aprenda de ellos. No encuentro palabras para expresar la gratitud y el cariño que siento por ti, querida María. Todas las personas que hemos tenido el privilegio de estar a su lado sabemos que su sentido del trabajo, de la justicia y la bondad sólo pueden confluír en una gran mujer y mejor ser humano, un ejemplo a seguir en todos los aspectos de la vida.

También agradezco muy efusivamente el apoyo y comprensión que en todo momento he recibido de Salvador Mérida Donoso. Gracias Salva por compartir tu sabiduría conmigo, por tus brillantes aportaciones a la tesis, por levantarme cuando estaba hundida y escucharme con cariño cuando te pedía ayuda. Gracias por la confianza que depositaste en mí.

Deseo mostrar de forma muy cariñosa, mi agradecimiento a mis compañeras y amigas, Sole y Laura, sois las mejores. Las mejores compañeras de laboratorio que podía encontrar, habéis hecho que esta locura de viaje valga la pena solo por conoceros. Os deseo todo lo mejor en vuestras vidas, porque os lo merecéis todo y más, que todos vuestros sueños se cumplan y yo pueda formar parte de ellos. ¡Lo que una pipeta une, que no lo separe el tiempo! Gracias chicas os quiero mucho.

Rosa, la gran Rosa, te lo he dicho en muchas ocasiones, gracias, nunca olvidaré lo mucho que has hecho por mí. De tu mano comencé a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación e hiciste que rápidamente me enganchara a él. Has sido mi maestra y mi referente siempre con tu mano tendida de forma incondicional, dispuesta a ayudarme y a dar la cara por mí en cualquier circunstancia Gracias, por tu paciencia y comprensión, por hacerme sentir querida hasta en mis fallos. En ese “¡Dolores Tania!” O “¡mare meua!”, no hay nadie que pueda poner más salero y cariño. Doy gracias a Dios por haberte conocido y tenerte como amiga. Te quiero Rosa.

Continuando mi singladura por el laboratorio tengo que mostrar mi enorme agradecimiento a Inma Almansa por estar siempre cuando y dónde la he necesitado, por escucharme y socorrerme al grito: “¡el HPLC no funciona!”. Gracias por tus impagables consejos, tu gran sabiduría y paciencia, apoyo, ánimo y bondad.

Gracias a Roberto, ha sido genial poder pasar mi último año de tesis contigo. Gracias por las risas y los momentos inolvidables que hemos compartido. Zuzane, many thanks you showing me that there are people like you in this world.

Mención aparte merece mi agradecimiento a Carlos Casanova, porque gran parte de esta tesis no hubiera sido posible sin tu ayuda. Gracias por tu aportación y por la oportunidad de trabajar contigo en el laboratorio.

A mi querida Ana, gracias por descubrirme a Miss caffèína y por las lecciones de fuerza de superación con la alegría que solo las grandes valientes saben dar. Gracias Ana, eres un ejemplo a seguir, te admiro y me enorgullezco de saber que eres mi amiga para siempre.

María Sebastián, mil gracias con mayúsculas. Siempre has estado ahí cuando te he necesitado, sólo ha hecho falta una llamada de teléfono o un “María por fi” para que acudieras al instante. Por entenderme y en más de una ocasión, aguantarme aunque te hiciera rabiar. Gracias por ser tan buena persona, que nadie te quite tu gracia y energía, que nadie te haga callar porque esa eres tú y es parte de tu magia.

A las personas que han pasado por el inframundo gracias. A Mariola, Juanjo, María García, Esther, María Maroto, Pili, Sara P., Teresa, Susi, Sara, Cristina y alguna más que me olvido seguro... ya sabéis que soy muy despistada. Chicas (sí, en este inframundo han pasado muchas más mujeres que hombres), muchas gracias a todas. A Cris porque los laboratorios no serían igual sin tí. Me debes una gran foto en que salgamos todas.

Una mención especial a Lorena, Carmen y Cecilia el alma de los laboratorios. No se puede ser más generosas repartiendo alegría y amor. Sois la luz que ilumina el laboratorio todos los días. Gracias por vuestras enriquecedoras conversaciones, por darme todo vuestro cariño y fuerza, por tratarme como a “una reina”. Solo puedo decir que os admiro por como sois y daros las gracias por todo.

Agradecerles profundamente y pedirles perdón a mis chiquillos, a mis pequeñajos, a mis ratones, sin ellos sí que sí, esta tesis hubiera sido imposible. Os quise desde que os conocí y ahora os echaré mucho de menos, aunque a veces olías muy mal y erais un poco pesados.

I would especially like to express my thanks Dra. Julie Sanderson and her team. I want to thank you again for having received me in your lab, sacrificing your time to listen and help me and offering me your advice and support, which I value greatly. Thanks for share your knowledgje with me.

Además del enorme agradecimiento a las personas que han formado parte de mi vida en el laboratorio, durante esta etapa también han estado a mi lado mis incondicionales amigas y compañeras de la Universidad.

Primero, como no, mi amiga, hermana, confidente, Ana, mi Anuchi. Hace doce años que comparto contigo los mejores y peores momentos de mi vida. No importa la distancia ni el tiempo que no nos hayamos visto, estamos al día. Entre nosotras todo sigue igual que durante aquellos maravillosos años que pasamos juntas y con nuestra querida Cristina. “Las tres mosqueteras siempre y para siempre”.

De aquella etapa universitaria muchas más entrañables amigas estuvieron y están en mi vida. Isa, Nata, Mai, Amaia, Elena. Gracias a todas. Haría un párrafo con cada una de vosotras porque os lo merecéis, pero serían más largos los agradecimientos que la tesis misma. ¡Benancia! Igone, ¿pensabas que me olvidaba de ti? Jamás. “Haciendo Bioquímica hay vida después de la tesis”, y ahora más que nunca lo sé. Tampoco quiero olvidar a mi querida compañera de fatigas, Kata, o mejor dicho Marta, ni a mis compañeros de clase, sobre todo a Andoni y López grandes científicos y mejores personas.

En este capítulo de agradecimientos quiero citar a unas cuantas personas que han estado cerca de mí siempre, y que con su apoyo anímico han colaborado en el presente proyecto desde el principio. Gracias Ana, Alejandra, Mónica, Carlos, mi entrañable amigo, hermano, Adrià.

A mis amigos de CONBIOPREVAL por todos los momentos vividos antes, durante y después del congreso. Por demostrarme la pasión por la ciencia de unos cuantos locos, que se unen para formar el mejor congreso lleno de pasión y de ilusión.

Por último la dedicatoria a mi familia. Mi querida y admirada familia que lo es todo para mí. Gracias tías, tíos, primas y primos por vuestro cariño incondicional, por amarme y respetarme, por acompañarme y mimarme toda mi vida. Gracias por estar en mi vida, porque no podría tener una familia mejor y más buena que la que tengo, por estar siempre a mi lado cuidándome, protegiéndome y guiándome. Alegrándose de mis triunfos y consolándome en mis fracasos, aportando amor a mi vida y procurando por mi felicidad. Gracias familia.

A tí, que has sido mi mano derecha durante todo este tiempo, siempre colmándome de felicidad, amor y comprensión, a tú que has aguantado estoicamente mis rabietas, mis lloros y mi mal humor, las presentaciones, traducciones y lecturas sobre trabajos de tesis totalmente desconocidos para ti y que te has esforzado por entender, A tí, Marcos, gracias. Esta tesis no hubiera sido posible sin tí, sin tu paciencia y generosidad, sin tu amor. Gracias por quererme como me quieres. Te quiero.

Finalmente y por encima de todos ellos, a mis padres, que han sido y son ejemplo modélico y admirable como padres y como personas. Los que nunca me fallan y siempre han confiado en mí, mi razón de ser y de existir, nada importa si vosotros no estáis a mi lado. Nada de mi vida tendría sentido si no fuera por vosotros. Gracias darme un hogar lleno de amor y enseñarme con vuestro ejemplo de humildad, el significado de los valores humanos, el trabajo, la honradez y el coraje. Os quiero y admiro más que a nada en el mundo, no sólo me disteis la vida, sino las ganas de vivir y la fortaleza para no rendir ante la adversidad porque en vosotros veo todos los días la lucha contra viento y marea por protegerme y para que sea siempre feliz. No existe un agradecimiento mayor que el amor que os tengo.

El presente trabajo es un homenaje a la persona, que a la par que mis padres, más me ha querido y ayudado en esta vida, a mi Mama, sin ella nada tendría sentido y no sería yo. Mama esto, todo este trabajo, estos años llenos de sacrificios y también de muchos buenos momentos, van dedicados a tí. Sé que aunque te fuiste, nunca me has soltado de la mano y me ayudas a caminar con paso firme y hacia delante, atiendes mis suplicas, y no estoy nunca sola porque desde ahí arriba siento que aún me estas observando y cuidando. Nos vemos como siempre, a las cinco en el parque. Gracias mama te quiero.

Ahora se abre una nueva etapa en mi vida llena de esperanzas y emociones, espero seguir compartiéndola con todos vosotros... ¡Hasta mañana corazones!, ¡Os quiero!.

**MUCHAS GRACIAS**

# **ÍNDICE GENERAL**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1.- ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR.....	14
2.- LA RETINA .....	16
2.1.- Estructura microscópica de la retina.....	16
2.2.- Tipos celulares de la retina .....	18
2.2.1.- Epitelio pigmentario de la Retina.....	18
2.2.2.- Retina neural.....	19
2.3.- Fisiología de la retina: proceso de fototransducción .....	31
3.- ESTRÉS OXIDATIVO.....	34
3.1.- Radicales libres.....	37
3.2.- Estrés oxidativo en la retina .....	38
3.3.- Defensas antioxidantes .....	39
3.4.- El sistema glutatión .....	43
3.4.1.- Síntesis del glutatión .....	43
3.4.2.- Función del glutatión.....	45
4.- DISTROFIAS RETINIANAS .....	47
5.- RETINOSIS PIGMENTARIA.....	48
5.1.- Definición y fisiopatología de retinosis pigmentaria.....	48
5.2.- Genética de la retinosis pigmentaria .....	50
5.3.- La inflamación en la retinosis pigmentaria.....	52
6.- TRATAMIENTOS EN RETINOSIS PIGMENTARIA.....	53
6.1.- Estrategias de neuroprotección en la retinosis pigmentaria.....	56
6.1.1.- Fortalecimiento de las vías de supervivencia de los fotorreceptores .....	57
6.1.2.- Prevención del inicio y la ejecución de los mecanismos de muerte celular en los fotorreceptores.....	72
7.- MODELOS EXPERIMENTALES DE RETINOSIS PIGMENTARIA.....	74
7.1.- Retinal degeneration 1 .....	75
<b>HIPÓTESIS</b> .....	78
<b>OBJETIVOS</b> .....	82

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	86
1.- EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	88
1.1.- Tratamiento y manejo de los animales de experimentación .....	88
1.1.1.- Condiciones de estabulación .....	88
1.1.2.- Manejo de los animales.....	88
1.2.- Diseño experimental .....	89
1.2.1.- Evaluación del papel neuroprotector del ácido lipoico, progesterona en la retina de ratones control y rd1.....	89
1.2.2.- Tratamiento con ácido lipoico, progesterona y tratamiento combinado de ácido lipoico y progesterona.....	90
1.3.- Obtención y procesado de muestras .....	91
1.3.1.- Estudios inmunohistoquímicos .....	91
1.4.- Procedimientos y técnicas .....	92
1.4.1.- Detección mediante la técnica de marcaje TUNEL .....	92
1.4.2.- Detecciones por inmunofluorescencia.....	94
1.5.- Tratamiento estadístico de los resultados .....	96
2.- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	96
2.1.- Diseño experimental .....	96
2.1.1.- Inducción de estrés oxidativo a células ARPE-19 mediante peróxido de hidrógeno .....	96
2.1.2.- Pre-tratamiento y co-incubación de células ARPE-19 con ácido lipoico y progesterona.....	96
2.2.- Obtención y procesado de muestras.....	98
2.2.1.- Obtención de células ARPE-19.....	98
2.3.- Procedimientos y técnicas .....	99
2.3.1.- Cultivo de células ARPE-19 .....	99
2.3.2.- Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTS .....	100
2.4.- Tratamiento estadístico de los resultados .....	101
3.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A NIVEL MOLECULAR .....	102
3.1.- Evaluación de la capacidad antioxidante total mediante el método de medición de la capacidad antioxidante-reductor de ion cúprico.....	103
3.2.- Índices topológicos.....	105
3.3.- Procesamiento de datos.....	107
3.4.- Evaluación de la actividad antioxidante .....	110
3.5.- Tratamiento estadístico de los resultados .....	112

<b>RESULTADOS</b> .....	114
1.- CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR EN LOS RATONES CONTROL Y RD1 A DÍA POST-NATAL 11 .....	116
1.1.- Efecto del ácido lipoico, progesterona y su combinación sobre la muerte de los fotorreceptores en la retina de los ratones control y rd1.....	116
2.- LA GLIOSIS REACTIVA DISMINUYE TRAS EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y LA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LIPOICO Y PROGESTERONA .....	120
2.1.- Efecto del ácido lipoico, la progesterona, y la combinación de ambos sobre la gliosis en la retina de los ratones control y rd1 .....	120
3.- CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA CATALÍTICA .....	126
4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS ARPE-19 SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO .....	131
4.1.- Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células ARPE-19. ....	131
4.2.- Efecto del ácido lipoico y la progesterona a diferentes concentraciones en un cultivo de células ARPE-19.....	133
4.3.- Determinación de la viabilidad celular en un cultivo de células ARPE-19 sometidas a un estrés oxidativo tras el tratamiento con ácido lipoico y progesterona .....	136
4.3.1.- Efecto del ácido lipoico como pre-tratamiento en las células ARPE-19 ante la inducción de estrés oxidativo con 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno.....	136
4.3.2.- Efecto de la progesterona como pre-tratamiento en las células ARPE-19 ante la inducción de estrés oxidativo con 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno .....	138
4.4.- Determinación de la viabilidad celular en un cultivo de células ARPE-19 co-incubadas con ácido lipoico y progesterona, y 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno .....	139
4.4.1.- Evaluación de la viabilidad celular de células ARPE-19 tras la incubación conjunta con ácido lipoico y 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno.....	140
4.4.2.-Evaluación de la viabilidad celular de células ARPE-19 tras la incubación conjunta con progesterona y 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno.....	141
5.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	143
5.1.- Capacidad antioxidante total.....	143
5.2.- Evaluación de la actividad antioxidante .....	147
<b>DISCUSIÓN</b> .....	150
1.- LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA Y ÁCIDO LIPOICO DISMINUYE LA MUERTE CELULAR DE LOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINA DE LOS RATONES RD1. ....	153
2.- LA GLIOSIS REACTIVA DISMINUYE TRAS EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y LA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LIPOICO Y PROGESTERONA .....	158

3.- EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y SU COMBINACIÓN SOBRE LA ENZIMA GLUTAMATO CISTEINA CATALASA EN LA RETINA DE RATONES CONTROL Y RD1 A DÍA POST-NATAL 11 .....	162
4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE UN CULTIVO CON CÉLULAS ARPE- 19....	165
4.1.- La inducción de estrés oxidativo mediante peróxido de hidrogeno disminuye significativamente la viabilidad celular en las células ARPE-19.....	166
4.2.- Protección de la viabilidad celular de las células ARPE- 19, tras la inducción de estrés oxidativo, mediante ácido lipoico y progesterona.....	166
5.- LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO LIPOICO Y LA PROGESTERONA SE EJERCE A TRAVÉS DE SUS PRINCIPALES METABOLITOS .....	169
<b>CONCLUSIONES</b> .....	174
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	178

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**17 $\beta$ HSD:** 17-beta-estradiol sintetasa

**3 $\alpha$ - HSD:** 3 $\alpha$  hidroxioesteroide deshidrogenasa

**3 $\beta$ HSD:** 3 $\beta$ -hidroxioesteroide deshidrogenasa

**5 $\alpha$ -DHP:** 5 $\alpha$ -Dihidroprogesterona

**5 $\alpha$ R:** 5 $\alpha$ -reductasa

**ACL:** Amaurosis congénita de Leber

**ADHL:** Ácido dihidrolipoico

**ADRP:** Autosómica dominante

**AL:** Ácido lipoico

**ALLOP:** 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona o alopregnanolona

**AMPA:** Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

**ARRP:** Autosómica recesiva

**ARVO (Association for research in vision and ophthalmology):** Asociación para la investigación en oftalmología y la visión

**AST:** Astaxantina

**AT:** Ácido tióctico

**ATP (Adenosin triphosphate):** Adenosín trifosfato

**BDNF (Brain-derived neurotrophic factor):** Factor neurotrófico derivado del cerebro

**bFGF (Basic fibroblast growth factor ):** Factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos

**BSA (Bovine serum albumin):** Albúmina sérica bovina

**C:** Carbono

**C3SP2:** Átomos de carbono con un doble enlace unidos a otros tres átomos de carbono.

**CAT:** Capacidad antioxidante total

**CCG:** Capa de las Células Ganglionares

**CNE:** Capa Nuclear Externa

**CNG (cyclic nucleotide gated):** Canales iónicos

**CNI:** Capa Nuclear Interna

**CNTF (Ciliary neurotrophic factor):** Factor neurotrófico ciliar

**CPE:** Capa Plexiforme externa

**CPI:** Capa Plexiforme Interna

**CSE:** Capa fotorreceptora de segmentos interiores y exteriores de los fotorreceptores

**Cu:** Cobre

**CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity):** Método de reducción de la capacidad antioxidante

**CYP11A1 (Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1):** Citocromo P450 de la familia 11 subfamilia A miembro 1

**ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest):** Entidades químicas de interés biológico

**DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole):** 4',6-diamidino-2-fenilindol.

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**DHEA-S:** Sulfato de dehidroepiandrosterona

**DHP:** 5 $\alpha$ - dihidroprogesterona

**DHT:** Dihidrotestosterona

**DMAE:** Degeneración macular asociada a la edad

**DMEM/HamF12 (Serum-free Dulbecco Modified Eagle Medium):** Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline):** Fosfato- solución salina tamponada de Dulbecco

**DR:** Distrofias retinianas

**E2:** 17- $\beta$ -estradiol o estradiol

**EBI (European Bioinformatics Institute):** Instituto europeo de bioinformática

**EMBL (The European Molecular Biology Laboratory):** Laboratorio europeo de biología molecular

**EPR:** Epitelio pigmentario de la retina

**ERG:** Electroretinograma

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ESC (embryonic stem cells):** células madre embrionarias

**ETA\_Epsilon\_3:** Medida de la electronegatividad de los átomos.

**ETA\_Psi\_1:** Medida de la predisposición a formar enlaces de hidrógeno de las moléculas y/o el área de superficie polar.

**FBS (Fetal Bovine Serum):** Suero fetal bovino

**FD:** Función discriminante

**FGF (fibroblast growth factor):** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GABA (Gamma aminobutyric acid):** Ácido gamma aminobutírico

**GC:** Guanilato ciclasa

**GCL:** Glutamato cisteína ligasa o  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa

**GCLC:** Glutamato cisteína ligasa catalítica

**GCLM:** Glutamato cisteína ligasa modificadora

**GDP (Guanosin diphosphate):** Guanosín difosfato

**GFAP (Glial fibrillary acidic protein):** Proteína fibrilar glial ácida

**Gln:** Glutamina

**GMPc (Guanosine monophosphate cyclic):** Guanosín monofosfato cíclico

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GR:** GSSG reductasa

**GS:** Glutación sintetasa

**GSH:** Glutación

**GSSG:** Disulfuro de glutación o forma oxidada del glutación

**GTP (Guanosin triphosphate):** Guanosín trifosfato

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**HClO:** Ácido hipocloroso

**HI:** Células horizontales de tipo I

**HII:** Células horizontales de tipo II

**HIII:** Células horizontales de tipo III

**HO<sub>2</sub>·:** Radical hidroperóxido

**IL:** Interleuquina

**IRA:** Insuficiencia renal aguda

**IRC:** Insuficiencia renal crónica

**K<sub>i</sub>:** Constante de inhibición

**K<sub>m</sub>:** Constante de afinidad

**MCAO (middle cerebral artery occlusion model):** Modelo de ratón oclusión de la arteria cerebral media

**MDA:** Malondialdehído

**MERTK (Human receptor tyrosine kinase):** Receptor tirosin quinasa humano

**MindS:** Mínimo E-estado de tipo de átomo =S.

**MinHsOH:** Mínimo E-estado de tipo de átomos –OH–.

**MinHsNH:** Mínimo E-estado de tipo de átomos –NH–.

**MLE:** Membrana Limitante Externa

**MLI:** Membrana Limitante Interna

**MTS (Solution Cell Proliferation Assay):** Método de Proliferación celular.

**NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate):** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**Nc:** Neocuproina

**NF-κB (nuclear factor kappa B):** Factor nuclear kappa B

**NGF (nerve growth factor):** Factor de crecimiento nervioso

**NGS (next generation sequencing):** Nuevas generaciones de secuenciación

**NGS (Normal goat serum):** Suero normal de cabra

**NHBAcc:** Recuento de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno.

**NHBd:** Recuento de E-estados para los átomos donantes de enlaces de hidrógeno.

**NHdsCH:** Recuento de E-estados de tipo de átomos =CH–.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**nNOS (Neuronal nitric oxide synthase ):** Óxido nítrico sintetasa neuronal

**NO:** Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Dióxido nítrico

**NOS (Nitric oxide synthase):** Óxido nítrico sintetasa

**nsCH3:** Recuento de E-estados de tipo de átomos –CH<sub>3</sub>.

**nssSe:** Recuento de E-estados de tipo de átomo –Se –.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido

**-OH (Hidroxy radical):** Radical hidroxilo

**ONOO<sup>-</sup>:** Radical peroxinitrito

**P4:** Pregn-4-ene-3,20-diona o progesterona

**PaDEL (Pharmaceutical Data Exploration Laboratory):** Laboratorio Farmacéutico de exploración de datos

**PB (Phosphate buffer):** Tampón fosfato

**PBS (Phosphate buffer saline):** Tampón fosfato salino

**PDE6 (Phosphodiesterase 6):** Fosfodiesterasa 6

**Pen/Strep:** Penicilina-estreptomicina

**Pen:** Penicilina

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKG (cGMP-dependent protein kinase):** Proteína quinasa dependiente de GMPc

**PN (Post-natal day):** Día postnatal

**PS:** Sulfato de pregnenolona

**rAAV (Recombinant adenoassociated virus):** Adenovirus recombinantes asociados

**RCS (Royal College of Surgeons):** Ratas del Real colegio de cirujanos de Inglaterra

**rd1 (Retinal degeneration 1):** Degeneración de retina 1

**rd10 (Retinal degeneration 10):** Degeneración de retina 10

**RK:** Rodopsina cinasa

**RL:** Radicales libres

**RP:** Retinosis pigmentaria

**RPE65- (LCA2):** Amaurosis congénita de Leber

**-SH:** Radical sulfhidrilo

**SNC:** Sistema nervioso central

**SOD:** Superóxido dismutasa

**Strep:** Estreptomicina

**TA:** Ácido tióctico

**TCM (traditional chinese medicine):** Medicina tradicional china

**TEC:** Tecnología de células encapsuladas

**THP:** Tetrahidrocannabinol

**TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha):** Factor de necrosis tumoral alfa

**TopoShape:** Medida de la forma molecular.

**TUDCA (Tauroursodeoxycholic acid):** Ácido tauroursodeoxicólico

**TUNEL: (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling):** Marcaje con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP

**VDH:** Dihidroxitamina D

**VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor):** Factor de crecimiento endotelial vascular

**Wt (Wilt type):** Ratón salvaje. Control

**XLRP:** Ligado al cromosoma X

**$\gamma$ GluCys :**  $\gamma$ -glutamilcisteína

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.- Anatomía del globo ocular humano.</b> .....	16
<b>Figura 2.- Capas de la retina.</b> .....	18
<b>Figura 3.- Estructura de los fotorreceptores.</b> .....	21
<b>Figura 4.- Diagrama de absorción espectral de los conos y los bastones.</b> .....	22
<b>Figura 5.- Campos receptivos de las células ganglionares.</b> .....	26
<b>Figura 6.- Proceso de transducción visual.</b> .....	33
<b>Figura 7.-Representación gráfica del balance de las sustancias antioxidantes y las pro-oxidantes.</b> .....	36
<b>Figura 8.- Interacción directa con especies reactivas: mecanismo SET y mecanismo HAT.</b> .....	40
<b>Figura 9.- Estructura química del ácido ascórbico.</b> .....	42
<b>Figura 10.- Estructura química del (+) – <math>\alpha</math>- tocoferol.</b> .....	42
<b>Figura 11.- Síntesis de glutatión.</b> .....	44
<b>Figura 12.- Esquema del metabolismo del glutatión.</b> .....	46
<b>Figura 13.- Visión en túnel característica de pacientes con retinosis pigmentaria.</b> .....	49
<b>Figura 14.- Estructura química del ácido lipoico y su forma reducida, el ácido dihidrolipoico.</b> .....	62
<b>Figura 15.- Engranaje de varios sistemas antioxidantes en colaboración para neutralizar los radicales libres.</b> .....	63
<b>Figura 16.- Metabolismo de la progesterona y sus derivados en la retina.</b> .....	68
<b>Figura 17.- Diseño experimental para el tratamiento con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ambos, de los ratones control y rd1.</b> .....	91
<b>Figura 18.- Representación gráfica de las zonas de conteo para el estudio del número de filas de fotorreceptores.</b> .....	93

<b>Figura 19.-</b> Diseño experimental del método de pre-tratamiento con ácido lipoico o progesterona.....	97
<b>Figura 20.-</b> Diseño experimental del método de co-incubación con ácido lipoico o progesterona.....	98
<b>Figura 21.-</b> Estructuras de MTS tetrazolio y su derivado formazán.....	101
<b>Figura 22.-</b> Principio químico del método la evaluación de la capacidad antioxidante reductor de ion cúprico.....	104
<b>Figura 23.-</b> Estructura química y fichero molfile de la tiourea.....	106
<b>Figura 24.-</b> Función discriminante.....	108
<b>Figura 25.-</b> Estructura molecular de cada una de las moléculas de estudio realizado con el programa ChemDraw.....	111
<b>Figura 26.-</b> Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones control y rd1, a día post-natal 11.....	117
<b>Figura 27.-</b> Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1, a día post-natal 11.....	120
<b>Figura 28.-</b> Inmunofluorescencia para la proteína ácida glial fibrilar en la periferia lejana, periferia central y centro retina de la retina de los ratones control y rd1, sin tratar y tratados (ácido lipoico, progesterona y ácido lipoico con progesterona) a día post-natal 11.....	122
<b>Figura 29.-</b> Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones control (sin y con tratamiento) y rd1 (sin y con tratamiento). .....	124
<b>Figura 30.-</b> Inmunofluorescencia para la proteína ácida glial fibrilar en la periferia lejana, periferia central y centro de la retina de los ratones rd1 sin tratar y rd1 tratados (ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona), a día post-natal 11.....	126
<b>Figura 31.-</b> Inmunofluorescencia para la expresión de glutamato cisteína ligasa catalítica en las diferentes zonas de la retina de los ratones control y rd1, sin tratar y tratados (ácido lipoico, progesterona, y la combinación de ácido lipoico y progesterona), a día post natal 11.....	128

<b>Figura 32.-</b> Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por la expresión de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica en la retina de ratones control (sin y con tratamiento) y rd1 (sin y con tratamiento). .....	130
<b>Figura 33.-</b> Representación gráfica de la expresión de la actividad de glutamato cisteína ligasa catalítica según el porcentaje de área en las diferentes partes de la retina a día post-natal 11 de ratones rd1. ....	131
<b>Figura 34 .-</b> Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras la inducción de un estrés oxidativo con diferentes dosis de peróxido de hidrógeno (0 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M y 750 $\mu$ M). .....	132
<b>Figura 35.-</b> Representación gráfica de la viabilidad celular de las células ARPE-19 a diferentes concentraciones de ácido lipoico (500 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M y 2000 $\mu$ M). .....	134
<b>Figura 36.-</b> Representación gráfica de la viabilidad celular de las células ARPE-19 a diferentes concentraciones de progesterona (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M). .....	135
<b>Figura 37.-</b> Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con ácido lipoico a diferentes concentraciones (500 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M y 2000 $\mu$ M) y la posterior inducción de estrés oxidativo con una dosis de 500 $\mu$ M peróxido de hidrógeno. ....	137
<b>Figura 38.-</b> Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con progesterona a diferentes concentraciones (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M), previo a la inducción de un estrés oxidativo con una dosis de 500 $\mu$ M peróxido de hidrógeno. ....	139
<b>Figura 39.-</b> Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras la incubación conjunta con ácido lipoico (500 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M y 2000 $\mu$ M) y 500 $\mu$ M peróxido de hidrógeno .....	141
<b>Figura 40.-</b> Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 co-incubadas con progesterona a diferentes concentraciones (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M), y 500 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	142
<b>Figura 41.-</b> Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método CUPRAC..	145

**Figura 42.-** Representación gráfica de la capacidad antioxidante total mediante el método CUPRAC. ....147

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.-</b> Ejemplos del papel de algunos genes implicados en el desarrollo de la retinosis pigmentosa.....	51
<b>Tabla 2.-</b> Lista de anticuerpos utilizados para técnicas de inmunofluorescencia.....	95
<b>Tabla 3.-</b> Resultados de la evaluación antioxidante del ácido ascórbico, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol en SPSS.....	148



# **INTRODUCCIÓN**



## 1.- ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR

La vista es extremadamente importante para la supervivencia humana. Más de la mitad de los receptores sensitivos se localizan en el ojo, y gran parte de la corteza cerebral participa en el procesamiento de la información visual (Tortola G. J. & Derrickson B., 2013).

El ojo o globo ocular es el órgano de la visión. Es una estructura esférica de aproximadamente 2,5 cm de diámetro con un marcado abombamiento sobre su superficie anterior y un peso aproximado de 7 gramos. Como órgano visual, percibe la radiación electromagnética del espectro visible (rango de longitudes de onda de 400 a 700 nm) y la transforma en impulsos electroquímicos que son transmitidos al cerebro en donde se formará la imagen (Tortola G. J. & Derrickson B., 2013).

En los mamíferos, el globo ocular está constituido por varias membranas yuxtapuestas y por los medios transparentes, que se disponen unos después de otros desde el polo anterior al posterior.

Las membranas que forman las paredes del ojo son tres, de fuera adentro (Moore K.L.D.A. & Agur A.M.R., 2007; Welsch U. & Sobotta J., 2008; Sobotta J. & Reinhard P., 2006) (Figura 1):

1.- **La capa externa o fibrosa**, consta de una parte posterior opaca (*esclerótica o esclera*) y una parte anterior transparente o *córnea*. La unión entre ambas se denomina limbo esclerocorneal.

1.1.- *La esclerótica* o esclera es una membrana firme compuesta por una superficie externa blanca (epiesclera), que presenta inserciones de los tendones del músculo orbitario y un estroma corneal constituido por tejido conectivo fibroelástico, cuya función es mantener y proteger las delicadas estructuras que contiene. Posteriormente la esclerótica presenta un orificio a través del cual pasa el nervio óptico.

1.2.- *La córnea* es una estructura transparente que ocupa la porción anterior del ojo. Presenta una curvatura más acentuada que la del resto del globo ocular. A ella se debe la mayor parte de la refracción de los rayos luminosos que penetran en el ojo.

2.- **La capa media o vascular**, también llamada **úvea**, está compuesta principalmente por tres estructuras: coroides, iris y cuerpo ciliar.

2.1.- *La coroides* es una capa vascular situada entre la esclera y la retina, que aporta nutrición a las capas retinianas más externas.

2.2.- El *iris* es un diafragma ajustable que deja un orificio central (la pupila) encargado de regular la cantidad de luz que penetra en el ojo. Tiene una gama cromática que se extiende desde el azul claro al marrón oscuro y divide el segmento anterior del ojo en las cámaras anterior y posterior.

2.3.- El *cuerpo ciliar* es un anillo que se sitúa entre el iris (parte contráctil del globo ocular) y la *ora serrata* (parte más periférica de la retina, ubicándose en el extremo anterior a la porción central). La ora serrata es la zona de empalme o confluencia entre la retina y el cuerpo ciliar, marca la transición entre el área que no es fotosensitiva y la compleja región de varias capas sensibles a la luz (Ross M.H., 2013; Honrubia F., 2001).

El cuerpo ciliar está constituido por dos partes bien diferenciadas:

- *La pars plicata*: Contiene los procesos ciliares, que son unos pliegues que se encuentran en la parte anterior del cuerpo ciliar. Son los encargados de la secreción del líquido que rellena la cámara anterior (el humor acuoso).
- *La pars plana*: En esta zona se encuentra el músculo ciliar, que es una banda circular de músculo liso que consta de fibras radiales y longitudinales que permiten adaptar la visión. Es el encargado de variar la curvatura del cristalino para poder enfocar a distintas distancias.

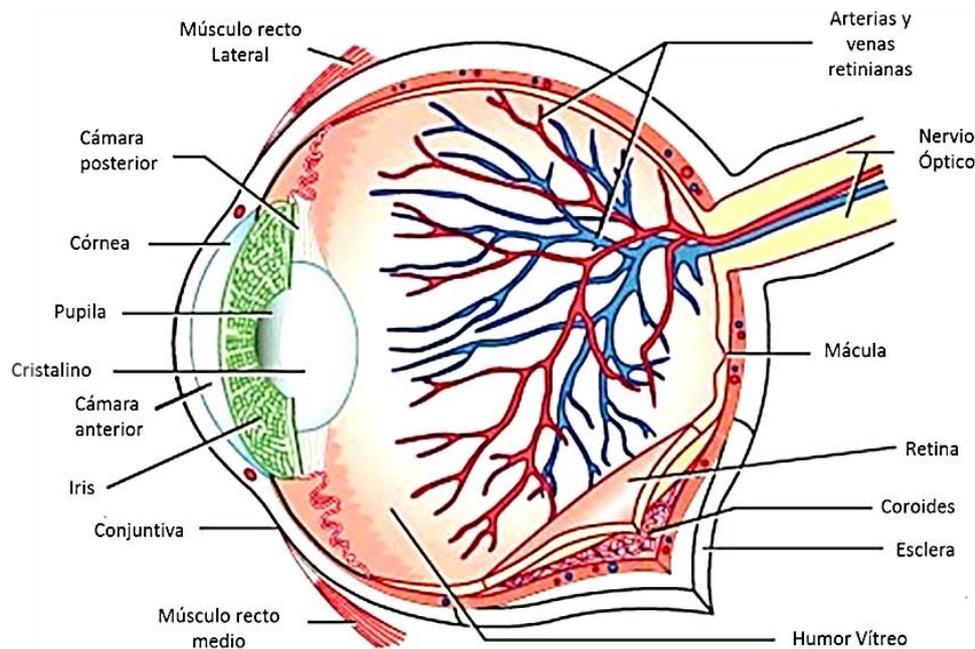
En los procesos ciliares se insertan las fibras del ligamento suspensorio del cristalino que se encargan de mantenerlo en su posición y también son responsables de la producción del *humor acuoso*. Dicho fluido se produce mediante un mecanismo de secreción activa (80% del total) y por mecanismos de secreción pasiva, como ultrafiltración y difusión, que dependen a su vez, de la presión sanguínea, la presión osmótica plasmática y la presión intraocular. Está compuesto por agua en un 99%, aporta nutrientes a las estructuras avasculares del ojo y es el principal responsable del mantenimiento de la presión intraocular. El humor acuoso rellena la cámara posterior y por la pupila pasa a la cámara anterior (Honrubia F., 2001).

3.- **La capa interna o nerviosa** o la parte sensorial del ojo, compuesta por la *retina*: membrana interior del ojo, constituida por varias capas de células, que recibe imágenes y las envía al cerebro a través del nervio óptico.

Compuesta por diferentes capas celulares, la retina supone una especie de tejido sensible a la luminosidad y que genera diversos procesos hasta llegar a la transmisión de un impulso nervioso hacia el cerebro.

El espacio interno del globo ocular está delimitado por las tres cámaras de fluido: la **cámara anterior** (entre la córnea y el iris), **cámara posterior** (entre el iris, las fibras de la zónula y el cristalino) y la **cámara vítrea** (entre el cristalino y la retina). Como hemos comentado anteriormente, las primeras dos cámaras están llenas de *humor acuoso*, mientras que la cámara vítrea se llena con un fluido más viscoso, el *humor vítreo* (Kolb H., 2012).

La función de la retina es transformar las señales luminosas que recibe del exterior en impulsos nerviosos mediante un proceso conocido como *fototransducción*. Esos impulsos nerviosos salen de la retina a través del nervio óptico y viajan a la corteza cerebral para su procesamiento (Kolb H., 2000). Al llegar a la superficie de la retina, la luz atraviesa sus múltiples capas antes de llegar a las células fotorreceptoras, donde los fotones son absorbidos y transformados en impulsos electro-químicos.



**Figura 1.- Anatomía del globo ocular humano.** Adaptación de Merriam-Webster. Anatomy of the Human Eye (Webster M., 2006).

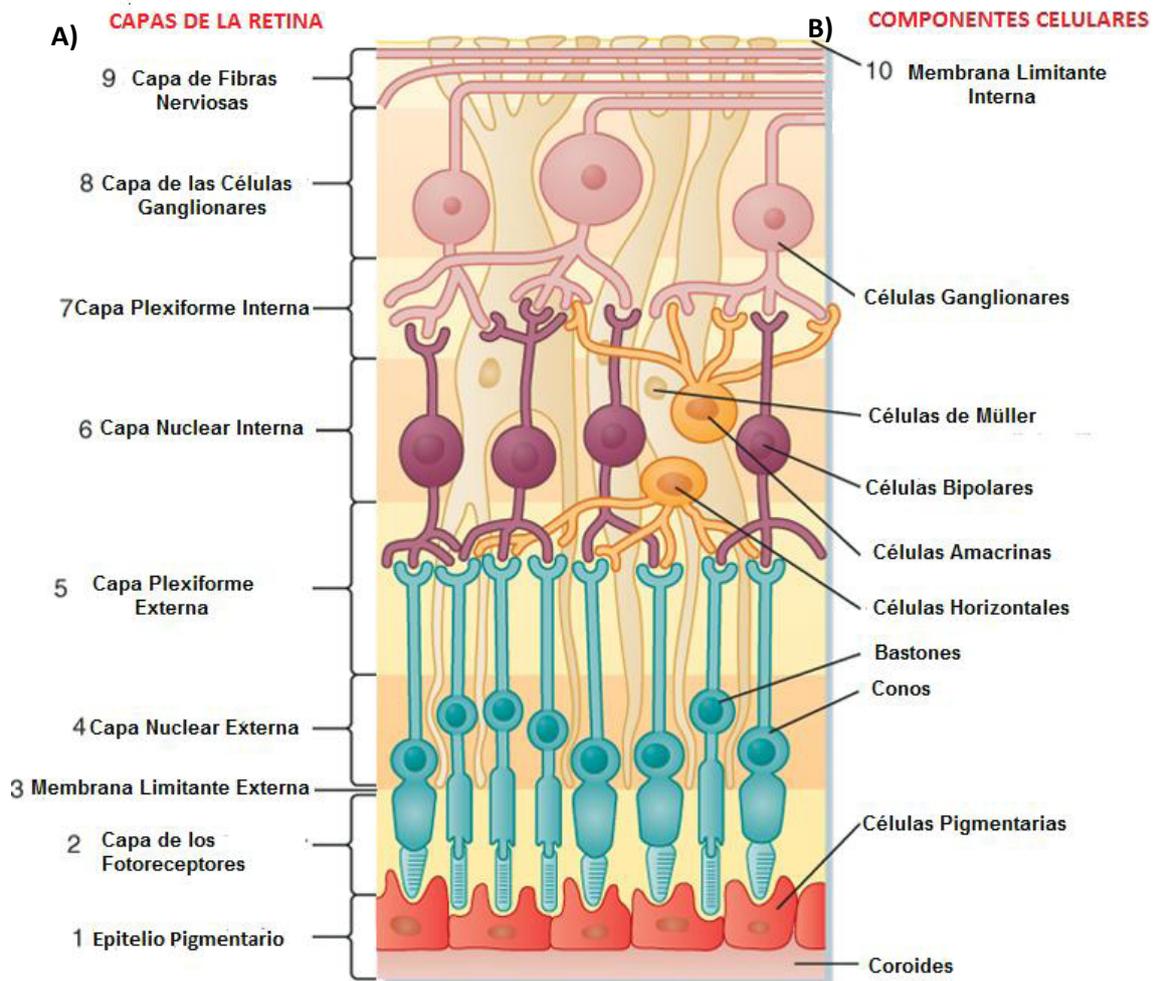
## 2.- LA RETINA

### 2.1.- Estructura microscópica de la retina

La retina está formada por distintos tipos celulares, básicamente neuronas, (Guyton A., 2012; Kolb H., 2011) que se distribuyen a lo largo de 10 capas, 9 constituyen la retina sensorial y la décima es el epitelio pigmentario (Ramón y Cajal S., 1892; Gallego A., 1971; Ross M.H., & Pawlina W., 2006). Desde la capa más externa localizada en la parte posterior de la coroides

(que no forma parte de la neuroretina), pero es imprescindible para su correcto funcionamiento (Kolb H., 1994; Ross M.H, & Pawlina W., 2006), hasta la parte más interna de la retina en contacto con el humor vítreo, las capas de la retina son (Figura 2):

- 1.- *El epitelio pigmentario (EPR)*. Aunque no se considera parte de la retina neural, cumple funciones imprescindibles en la fototransducción y la integridad de los fotorreceptores.
- 2.- *La capa fotorreceptora de segmentos interiores y exteriores de los fotorreceptores (bastones y conos), (CSE)*. Constituida por los segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras de la retina.
- 3.- *Membrana limitante externa (MLE)*, situada entre los núcleos y los segmentos externos de los fotorreceptores, la MLE está compuesta por uniones intercelulares entre las células de Müller y los fotorreceptores.
- 4.- *Capa nuclear externa (CNE)*, que contiene los núcleos de las células fotorreceptoras.
- 5.- *Capa plexiforme externa (CPE)*, con las extensiones de las células bipolares y horizontales con los fotorreceptores.
- 6.- *Capa nuclear interna (CNI)*, en donde se sitúan los cuerpos de células o bipolares, amacrinas y horizontales.
- 7.- *Capa plexiforme interna (CPI)*, que comprende las conexiones de las células ganglionares con las células amacrinas y bipolares.
- 8.- *Capa de las células ganglionares (CCG)*, donde se localizan las células ganglionares y algunas células amacrinas desplazadas.
- 9.- *Capa de fibras nerviosas*, que contiene los axones de las células ganglionares que pasan al nervio óptico.
- 10.- *Membrana Limitante interna (MLI)*, constituida por la lámina basal de las células de Müller.



**Figura 2.- Capas de la retina.** A) Se especifica las diferentes capas que componen la retina. B) Componentes celulares de la retina. Imagen adaptada de Koppen R. & Stanton S., 2008 (Koppen R. & Stanton S., 2008).

## 2.2.- Tipos celulares de la retina

En los mamíferos, la retina madura se compone de dos tejidos distintos:

**2.2.1.- El epitelio pigmentado de la retina** (retinal pigment epithelium), con una sola capa de células epiteliales.

**2.2.2.- La retina neural**, compuesta por neuronas y células gliales.

### 2.2.1.- Epitelio Pigmentario de la Retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una capa de células epiteliales cúbicas asociadas entre sí por medio de uniones de tipo ocluyente y adherente en su cara ápico-lateral.

Se trata de un tejido altamente polarizado cuyo lado basal contiene numerosos pliegues formando un laberinto basal (Geneser F., 2000; Sparrow J.R. et al., 2010). Las células del EPR, se caracterizan por contener abundantes gránulos de melanina en su citoplasma (Junqueira L.C. & Carneiro C., 2001), los cuales absorben el exceso de luz, impidiendo así que se produzcan reflejos lumínicos que perjudicarían a la formación correcta de la imagen (Geneser F., 2000).

Las células epiteliales que componen el EPR realizan funciones altamente especializadas, incluyendo: el almacenamiento, transporte y conversión del retinol (Kalloniatis M. & Fletcher E.L., 2004), la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, funciones antioxidantes, (Gibis B. et al., 2001), el transporte selectivo de iones, nutrientes y metabolitos y el mantenimiento de la barrera hemato-retiniana (Geneser F., 2000; Buraczynska M. et al., 2002).

El epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores están íntimamente relacionados de forma que mutaciones en genes expresados en fotorreceptores conducen a la degeneración del EPR en patologías como la enfermedad de Stargardt, y en otros casos, mutaciones de genes típicos del EPR provocan distrofias retinianas como la amaurosis congénita de Leber, la retinosis pigmentaria (RP) o la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Strauss O., 2005).

### **2.2.2.- Retina Neural**

La retina neural consta de seis tipos celulares neuronales: a) Células fotorreceptoras: los conos y los bastones, b) células bipolares, c) células horizontales, d) células amacrinas, e) células ganglionares y f) las células gliales: astrocitos, microglía y células de Müller.

#### *a) Fotorreceptores: conos y bastones*

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. Estos, son neuronas sensibles a la luz y constituyen el tipo celular más importante de la retina, estimándose aproximadamente unos 130 millones de fotorreceptores en la retina humana (Kolb H., 2013b).

Existen dos tipos de fotorreceptores en la retina de los mamíferos: los bastones y los conos, los cuales ocupan una posición única en el sistema visual de los vertebrados ya que son las células sensoriales que transducen la acción de las ondas luminosas que forman la imagen.

La distribución de los receptores en la retina no es homogénea. En la especie humana, existe una región central donde la visión es más nítida al presentar una alta concentración de conos, la **fóvea** (Curcio C.A. et al., 1987). Por ello, la imagen que cae exactamente en la fóvea proporciona una visión más clara. En nuestra especie existe sólo una fóvea en cada globo ocular, ubicada en el centro de la retina (Rapp L.M. et al., 2000). Sin embargo no todos los mamíferos presentan fóvea. En el caso del ratón, tan solo sólo un 2,8% del total de fotorreceptores (~437.000 células/mm<sup>2</sup>) son conos (Carter-Dawson L.D. & LaVail M.M., 1979; Jeon C.J. et al., 1998).

Los fotorreceptores se distinguen entre sí por su forma, el tipo de fotopigmento que contienen, su distribución en la retina y el patrón de sus conexiones sinápticas. Además, cada uno de ellos está especializado 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) y por otro lado, los conos presentan una resolución espacial y temporal alta e intervienen en la visión diurna (fotópica) y cromática (Dowling J.E., 1987).

En la morfología tanto de los conos como de los bastones, se distinguen cuatro regiones bien diferenciadas (Bear M.F. et al., 1998; Germain F. et al., 2010; Wright A.F. et al., 2010) (Figura 3):

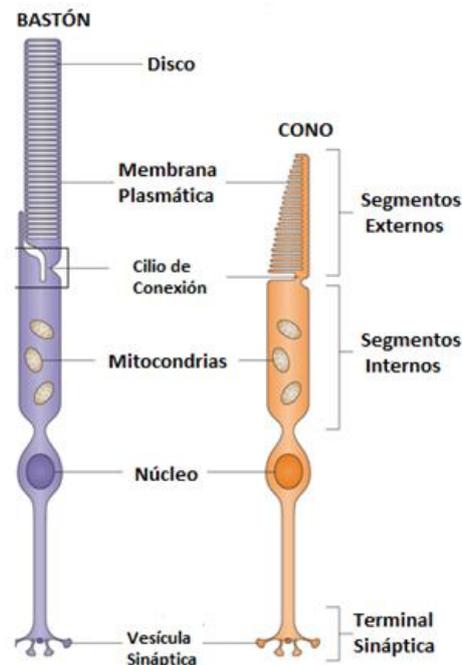
1) **Segmento externo**: contiene los pigmentos visuales. Los fotorreceptores de tipo bastón presentan un segmento externo cilíndrico y largo. Están constituidos por discos membranosos aislados de la membrana plasmática donde se encuentran inmersos los pigmentos sensibles a las radiaciones luminosas. Mientras que los de tipo cono se caracterizan por presentar un segmento externo afilado y corto.

En los conos no existen discos membranosos aislados sino múltiples repliegues de la membrana plasmática (Bear M.F. et al., 1998).

2) **Segmento interno**: encargado del metabolismo celular ya que en esta parte se encuentra un gran número de mitocondrias y ribosomas. En esta zona se ensamblan las moléculas de opsina (Cuenca N., 2006).

3) **Región pericarial o cuerpo celular**: contiene el núcleo de la célula. Los conos tienen sus cuerpos celulares situados en una hilera sencilla.

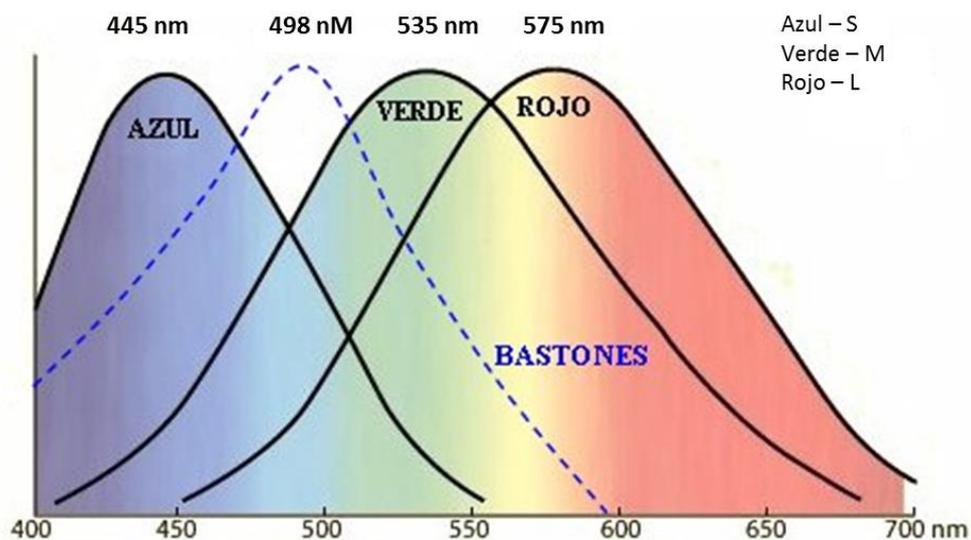
4) **Terminal sináptica:** encargada de transmitir la información a las neuronas de segundo orden. Es la porción terminal de los fotorreceptores. Efectúa los contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares que representan las etapas siguientes en el proceso visual. La terminación sináptica de los fotorreceptores se denomina *pedículo o pie terminal*, debido a que su terminal sináptica es plana. El cuerpo sináptico del bastón, por ser pequeño y redondeado, recibe el nombre de esférula o bulbo terminal (Artigas M. et al., 1996).



**Figura 3.- Estructura de los fotorreceptores.** Representación esquemática de las partes de las que consta un bastón (izquierda) y un cono (derecha). (Imagen adaptada de (Wright A.F. et al., 2010).

Los fotopigmentos de los conos y bastones no son iguales: el de los bastones se denomina **rodopsina**, sensible a longitudes de onda cercana a 500nm (luz verde-azul). El ser humano y otros primates presentan una visión tricromática del color. Esto quiere decir que nuestra percepción de una gran cantidad de colores se debe a la estimulación de sólo tres tipos de conos. Estos, presentan diferentes tipos de **opsinas**, lo que les hace sensibles a diferentes longitudes de onda de la luz.

Así, en la retina de los mamíferos se encuentran conos “azules” o conos S (*short wavelength*) porque su pigmento se excita de forma máxima con luz de 430 nm de longitud de onda, y solamente forman el 2% del conjunto de conos. Son los que poseen mayor sensibilidad (por responder a energías menores) y mayoritariamente se encuentran fuera de la fóvea. Los conos “verdes” o conos M (*medium wavelength*), cuyo pigmento se excita al máximo con luz de 530 nm y constituyen el 33% de esta clase y, en primates, conos “rojos” o conos L (*large wavelength*) activados de forma máxima por luz de 560 nm de longitud de onda, y constituyen la gran mayoría del conjunto, con un 65%. Tanto los conos M como los L se hallan concentrados en la fóvea (Bear M.F. et al., 1998; Geneser F., 2000; Kolb H., 2013). Los conos de diferente sensibilidad de longitud de onda y las consiguientes vías de conectividad en el cerebro son, por supuesto, la base de la percepción del color en nuestra imagen visual (Kolb H., 2005) (Figura 4). El grado de excitación de un receptor (cono o bastón) sería una suma, para cada frecuencia, del producto de la absorción por la intensidad de luz entrante (Ira F., 2003).



**Figura 4.- Diagrama de absorción espectral de los conos y los bastones.** Cada pigmento absorbe de manera máxima la luz con una longitud de onda diferente. Los conos se clasifican según la longitud de onda de la radiación que captan en: bajos (S), medios (M) y altos (L). La visión del color se debe a la actividad de los conos azules, verdes y rojos.

La transducción de la energía luminosa en impulsos nerviosos sigue una secuencia causa-efecto, que es lo contrario de lo que suele ocurrir en el proceso de detección de estímulos sensitivos. Los bastones y conos contienen numerosos canales para el ión sodio en la membrana celular de su segmento externo, y en la oscuridad están abiertos la mayoría de

estos canales. La consecuencia es la difusión continua del ión sodio hacia el segmento externo y a través de su estrecha conexión con su segmento interno. El escaso flujo del ión sodio que tiene lugar en ausencia de estimulación luminosa se denomina corriente de oscuridad y hace que la membrana de los fotorreceptores presente una cierta despolarización en situaciones de oscuridad. Los canales del ión sodio existentes en el segmento externo se cierran rápidamente en respuesta a la luz, reduciendo la corriente de oscuridad y dando lugar a la hiperpolarización del fotorreceptor (Ira F., 2003).

La complejidad de los fotorreceptores, sus regiones altamente especializadas, el gran número de proteínas que intervienen en su correcto funcionamiento y su alto consumo de energía predisponen a estas células a padecer patologías, provocadas por causas ambientales o por mutaciones genéticas, que desembocan en disfunciones visuales o en ceguera.

#### *b) Células bipolares*

Las células bipolares de la retina están situadas en la zona intermedia de la retina.

Se trata de neuronas que disponen de dos terminaciones, una dendrita y un axón, la dendrita las conecta con las células fotorreceptoras (conos y bastones), mientras que el axón sirve para realizar la conexión con la capa celular más externa de la retina, formada por las llamadas células ganglionares de las que parte el nervio óptico. Las células bipolares conectan con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y transmiten las señales hacia las células ganglionares. Presentan un cuerpo celular situado en la capa nuclear interna de donde parte una expansión externa, dendrítica, que se dirige hacia la capa plexiforme externa, donde contacta con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y una expansión interna o axón, más larga que la dendrítica, que termina a nivel de la capa plexiforme interna sinaptando con las células ganglionares (Artigas M. et al., 1995).

Su comunicación con los bastones es convergente, es decir, que varios bastones se comunican con una única célula bipolar, mientras que la transmisión de los conos es lineal, esto es, un único cono sinapta con una única célula bipolar (Boycott B.B. & Wässle H., 1991).

Existen dos tipos de células bipolares, aquellas que contactan con conos (tipo ON y OFF), las cuales hacen sinapsis directamente con las células ganglionares, y las celulares bipolares que contactan con los bastones (tipo ON) que hacen sinapsis con células amacrinas, que actúan como intermediarias y, transmiten la información a las células ganglionares (Kolb H. et al, 2000; Nelson R., 2012).

### c) *Células horizontales*

El soma de las células horizontales se localiza en el límite exterior de la capa interna, desde donde envía sus prolongaciones hasta la capa plexiforme externa. Estas prolongaciones se extienden horizontalmente abarcando una gran superficie.

Atendiendo a criterios morfológicos, se han descrito tres tipos de células horizontales en humanos (Kolb H. et al., 1992, 1994; Ahnert R. & Kolb H., 1994). Las *células horizontales de tipo I (HI)*, no poseen axón y contactan preferencialmente con conos rojos y verdes aunque también con conos azules; las *células horizontales de tipo II (HII)*, o células horizontales con axón, contactan preferentemente con conos azules pero también con otros tipos de conos a nivel de sus terminaciones dendríticas y únicamente con conos azules a nivel de su axón terminal. Por último, las *células horizontales de tipo III (HIII)* son semejantes a las células de tipo I, aunque de mayor tamaño a cualquier excentricidad y evitan cualquier contacto con conos azules (Ahnelt R. & Kolb H., 1994).

### d) *Células amacrinas*

Las células amacrinas son interneuronas que se encuentran en las capas más profundas de la retina del ojo humano.

Como respuesta a los estímulos visuales, las células amacrinas interactúan sinápticamente a nivel de la capa plexiforme interna (CPI) e influyen en los procesos de impulsos nerviosos retinales, estableciendo contacto entre las células bipolares y las células ganglionares (Kolb H., 2013b).

Las células amacrinas fueron descritas por primera vez por Dogiel (1891), quien resaltó el hecho de que en ellas se pudiera encontrar un verdadero axón, por ello se les denominó amacrinas o anaxónicas. En 1892 los estudios de Ramón y Cajal arrojaron más luz acerca de estas interneuronas de asociación (Dogiel A., 1891; Kolb H., 2013b).

Hoy en día sabemos que existen ciertos tipos de células amacrinas en la retina de los vertebrados que poseen prolongaciones axónicas largas y que probablemente funcionan como tal. Se han clasificado alrededor de 40 tipos diferentes de células amacrinas. La mayoría de ellas desempeñan un papel como inhibitorio utilizando los neurotransmisores ácido gamma-aminobutírico o glicina (Kolb H., 2013b).

e) *Células ganglionares (GCRs)*

Las células ganglionares son las neuronas finales de la retina de los vertebrados y recogen la información del exterior. Sus cuerpos están localizados en el estrato de células ganglionares, y con sus dendritas conectan con las células bipolares y con las células amacrinas de la capa plexiforme interna (Nelson R., 2007). Sus axones viajan a través del nervio óptico a las estructuras receptoras de la retina en el cerebro, donde tendrá lugar el procesamiento de la información (Kim N.R. et al., 2010).

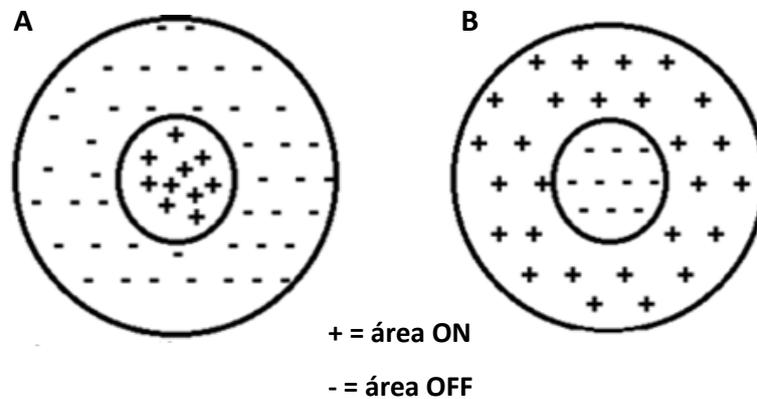
En el sistema visual, el campo receptivo de una célula ganglionar específica se define como la región de la capa fotorreceptora en la retina que, al ser estimulada por la luz, altera la actividad (envío de señales) de esa célula ganglionar (Kong J.H. et al., 2005).

En 1953 Kuffler, en investigaciones con fibras del nervio óptico de gato demostró que estas fibras podían responder de manera diferente según la parte del campo receptivo que era estimulada. El propio Kuffler observó como los campos receptivos de las células ganglionares (nervio óptico) del gato presentaban una configuración centro-periferia. Kuffler, Barlow, Hubel & Wiesel en los años 70, pusieron de manifiesto una característica común de las células bipolares y ganglionares en la retina, todas ellas respondían de una forma casi óptima a un estímulo circular pequeño y que incidía en el campo sensorial receptor de la célula (Kuffer S.W., 1953; Barlow H.B. & Mollon J.D., 1982; Hubel D.H. & Wiesel T.N., 1970).

El campo sensorial receptor de una célula ganglionar de la retina es la zona del entorno que al proyectarse sobre una parte concreta de la retina y estimularla influye sobre la frecuencia de descargas de dicha de dicha célula, aumentándola (ON), o disminuyéndola (OFF).

Dividimos las células ganglionares de la retina en dos tipos diferentes dependiendo de su campo receptor: *Células centro-ON periferia-OFF* y *células centro-OFF periferia ON*. Estas células se activan o no dependiendo de dónde incide la luz sobre el campo receptivo. Recordemos que el campo receptivo de una neurona en particular es determinado normalmente como un área en la que la presencia de un estímulo luminoso en este caso, alterará la actividad de esa neurona (ON-OFF), cuya entrada en el caso de la visión está en los fotorreceptores conos y bastones, y que las células ganglionares se encargan de transmitir con un largo axón hasta el cerebro (Artigas M. et al., 2005; Berne K. & Levy S., 2006).

Una célula ganglionar centro-ON periferia-OFF se disparará cuando el centro de su campo receptivo detecte la luz, pero será inhibida cuando el área que rodea al centro (la periferia) de su campo receptivo detecte la luz. Las células centro-OFF periferia-ON responden de manera exactamente opuesta ante el estímulo de la luz (Germain F. et al., 2010; Kolb H., 2001) (Figura 5).



**Figura 5.- Campos receptivos de las células ganglionares.** Las células ganglionares de la retina pueden ser excitadas o inhibidas dependiendo del lugar del campo receptivo sobre el cual pasa el estímulo visual, dado que los campos receptivos de las células ganglionares son concéntricos. Existen básicamente dos tipos de campos receptivos: el primero tiene un centro ON o encendido y una periferia OFF o apagado. A) *Células centro-ON periferia-OFF* y B) *Células centro-OFF periferia-ON*, estas se activan o no dependiendo de dónde incide la luz sobre el campo receptivo. (Imagen modificada de [www.ub.edu](http://www.ub.edu)).

#### f) *Células gliales*

Las células no neuronales más importantes de la retina son: los astrocitos, las células de Müller y las células de la microglía. Los astrocitos se sitúan en la capa de las fibras nerviosas, rodeando a éstas y a los vasos sanguíneos (Ramírez J.M. et al., 1996), las células de Müller se extienden a lo ancho de toda la retina dando sustento y soporte mecánico a las neuronas de la retina y por último, las células de la microglía, con un pequeño tamaño y morfología variable; son parte del sistema inmune y su función es fundamentalmente fagocítica (Mérida S. et al., 2015; Sobrado P. et al., 2007; Galindo-Romero C. et al., 2013). Hay dos tipos de macroglia en la retina de mamíferos: los astrocitos y las células de Müller. Anatómicamente, los astrocitos se limitan a la capa de fibras nerviosas, mientras que las células de Müller corren radialmente desde la superficie vítrea, o la membrana limitante interna, a la membrana limitante externa (Newman E. et al., 1996; Newman E. et al., 2001; Kur J. et al., 2014; Metea M. R. et al., 2006).

*f.1) Astrocitos*

Los astrocitos se encuentran casi exclusivamente en la parte más interna de la retina (Kolb H. et al., 2000). Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongados a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (Schnitzer J., 1988), además se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de ramificaciones fibrosas (Schnitzer J., 1988; Kolb H. et al., 2000).

Los astrocitos pueden desempeñar las funciones de protección, nutrición y mantenimiento de la homeostasis. En la retina: 1) los astrocitos se encuentran rodeando a los axones y vasos sanguíneos de las células ganglionares y forman parte de la barrera hematoencefálica ejerciendo una función protectora, 2) estas células contienen abundante glucógeno, por lo que podrían contribuir a su función nutritiva proporcionando metabolitos a las neuronas, 3) y por último, se piensa que los astrocitos pueden intervenir en la homeostasis iónica, contribuyendo a regular los niveles extracelulares de potasio, y el metabolismo de determinados neurotransmisores (Höllander H. et al., 1991; Kolb H. et al., 2000). También se ha comprobado que los astrocitos son muy resistentes al estrés oxidativo, debido a su elevado contenido en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y su capacidad para regenerar glutatión (Kettenmann H. et al., 1996; Wilson J.X., 1997).

Cuando se produce un daño en el sistema nervioso, y hay una destrucción neuronal, tiene lugar una proliferación de astrocitos (astrocitos reactivos), formando una cicatriz glial (Miller R.H. et al., 1986). Los astrocitos reactivos presentan más prolongaciones y filamentos gliales que los normales, desarrollando una mayor actividad metabólica (Kimelberg H.K., 1989; Dusart I. et al., 1991). Se ha visto como estos están implicados en diversas patologías retinianas. Wolter J.R, observó que las células gliales retinianas, en un ojo glaucomatoso, estaban hipertrofiadas formando una cicatriz glial como respuesta a una gran destrucción neuronal (Wolter J.R., 1955).

Las propiedades estructurales del citoesqueleto de astrocitos son mantenidas gracias a la red de filamentos intermedios, de los cuales el componente fundamental es la proteína fibrilar glial también llamada filamentos gliales o proteína gliofibrilar ácida (GFAP) (Guillamón-Vivancos T. et al., 2015). Entre las funciones de la GFAP se encuentra la de desempeñar un papel crucial en la modulación de la motilidad celular (Jacque C.M. et al., 1978), la proliferación, el tráfico de vesículas y la interacción entre los astrocitos y las neuronas (Wilding C. et al., 2015; Eddleston M. et al., 1993), además está involucrado en el correcto funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Venkatesh K. et al., 2013).

*f. b) Células de Müller*

Las células gliales de Müller son la glía predominante de la retina de los vertebrados. Están dispuestas verticalmente a través de la retina: desde el soma, en la capa nuclear interna, irradian prolongaciones hacia las capas más internas de la retina, rodeando vasos sanguíneos (Kolb H. et al., 2000) y en contacto con el humor vítreo, proporcionando apoyo funcional y estructural a las neuronas de la retina (Newman E.A. & Reichenbach A., 1996; Lahmar I. et al., 2014). También emiten prolongaciones hacia las capas de los fotorreceptores, rodeando a estas células (Fisher S.K. & Lewis G.P., 2003; Germain F. et al., 2010).

Una característica morfológica de estas células es la enorme variedad de formas que se pueden encontrar en función de la especie (Kolb H. et al., 2000). Además, dentro de una misma retina se pueden observar variaciones en la morfología de las células de Müller, según la zona concreta donde se encuentren. Las células Müller son el elemento glial predominante en la retina (representa 90% de la retina glial). Estas células están orientadas radialmente atravesando la retina, desde su frontera interior (vítreo) hasta el extremo distal de la capa nuclear externa (Vecino E. et al., 2016). Las células de Müller pueden ser fácilmente identificadas por su morfología característica, ya que contienen un gran retículo endoplásmico con cantidades variables de gránulos de glucógeno (Hogan M.J. et al., 1971).

Las células de Müller están íntimamente involucradas en un amplio rango de actividades imprescindibles para la viabilidad y la supervivencia neuronal, además de ser el soporte arquitectónico de la retina, mantienen la homeostasis del medio extracelular de la retina (iones, agua, neurotransmisor moléculas, y pH) (Gallina C. et al., 2015; Bringmann A., 2013; Bringmann A. et al., 2006). También, pueden estar involucradas en la fagocitosis de desechos neurales y en la liberación de sustancias neuroactivas tales como ácido gamma aminobutírico (gamma aminobutyric acid, GABA), taurina y dopamina (Newman E.A. et al., 1984), en la síntesis del ácido retinoico a partir de retinol (Edwards R.B., 1994) y parece que están involucradas en el control de la angiogénesis (Reichenbach A. et al., 1995; Kolb H. et al., 2000; Kumar A. et al., 2013).

Es sabido que las células de Müller proporcionan agua y homeostasis iónica a la retina, proporcionan el neurotransmisor glutamato, protegen las neuronas del estrés oxidativo y segregan sustancias vasoactivas, neuroactivas y neuroprotectoras (Frasson M. et al., 1999). Por otra parte, su morfología les permite actuar como «fibras ópticas» que transmiten la luz desde la membrana limitante interna a través de la totalidad de la retina hasta los segmentos externos fotosensibles de los fotorreceptores (Bringmann A. et al., 2006). Todo este conjunto

de mecanismos moleculares, fundamentales para un mantenimiento y funcionamiento correcto de la retina, resalta la importancia de las células de Müller en las patologías retinianas (Franze K. et al., 2007). De acuerdo con esto, las células de Müller tienen múltiples papeles que son cruciales como son el apoyo al desarrollo neuronal, la supervivencia y el procesamiento visual (Sarthy V. & Ripps H., 2001; Reichenbach A. & Bringmann A., 2010). En términos de inmunohistoquímica existen varias proteínas restringidas a los astrocitos y a las células de Müller, como la vimentina y la proteína ácida glial fibrilar (glial fibrillary acidic protein, GFAP). Además, se ha visto como el anticuerpo GFAP es capaz de proteger las células del estrés oxidativo en glaucoma (Wilding C. et al., 2015) o como responden a la degeneración de las células fotorreceptoras de por una forma atípica de gliosis (Iandiev I. et al., 2006).

Lo más notable, es que las células de Müller se vuelven 'activas' o 'reactivas' en respuesta a prácticamente todas las alteraciones patológicas de la retina (Bringmann A. et al., 2006). Esta reacción se llama gliosis celular. La gliosis celular es un componente de la respuesta de la retina a los estímulos patógenos y que también incluye la activación microglial, alteraciones de la vasculatura y la migración de leucocitos derivados de la sangre en el tejido de la retina. Muy probablemente, el inicio de al menos ciertas formas de gliosis celular, requieren una interacción entre la microglía y células de Müller, tal como se muestra en el caso de daño por la luz en la retina (Harada T. et al., 2002).

En general, las células microgliales modulan la producción de una variedad de factores tróficos a través de las células de Müller, incluyendo unos que promueven la supervivencia y otros que promueven la muerte de las células fotorreceptoras (Harada T. et al., 2002).

#### *f.c) Microglia*

La microglía son las células efectoras inmunes del SNC y la retina y constituyen aproximadamente el 5% de todas las células gliales.

El fenotipo de la microglía depende de su localización, estado de diferenciación y funciones (Rezaie P. et al., 2005). Tradicionalmente se distingue entre: 1) microglía ameboide, 2) microglía ramificada o madura (también llamada “quiescente” o en “reposo”) y 3) la microglía reactiva o activada. Aunque cada una de ellas desarrolla diferentes papeles funcionales, todas están implicadas en el crecimiento neuronal, la supervivencia y la regeneración mediante la regulación de la biosíntesis de factores de crecimiento.

La microglía comparte funciones de la inmunidad innata con otros fagocitos mononucleados, como macrófagos, monocitos y células dendríticas. Participa en la limpieza de restos celulares, generación de señales para la restauración de tejidos y resistencia a patógenos, además, colabora en el inicio de la respuesta adaptativa actuando como célula presentadora de antígenos y mandando señales a los linfocitos T para regular la respuesta efectora (Mérida S. et al., 2015; Harry G.D. & Kraft A.D., 2008; Perry V.H. et al., 2009).

Los macrófagos fagocitan y matan a los microorganismos invasores y presentan un importante papel fagocítico como primera defensa en la inmunidad innata, pero también ante los patógenos y las células infectadas que están dirigidos por una respuesta inmune adaptativa (Mérida S. et al., 2015). Estos liberan diferentes productos tóxicos que ayudan a los microorganismos fagocíticos, como es la liberación péptidos antimicrobianos, especies reactivas de nitrógeno (NO), y especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Rajendram R. et al., 2007; Bosch-Morell F. et al., 2002; Forman H. J. et al., 2001). Los macrófagos también apoyan la inflamación inicial mediante la secreción de las proteínas de señalización (citocinas y quimiocinas) que activan otras células del sistema inmune y dan lugar a la respuesta inmune (Gordon S., 2007).

Las células de la microglía pueden permanecer en estado quiescente durante largos periodos de tiempo y modificar dicho estado, en respuesta a una amplia variedad de estímulos patológicos, incluyendo traumatismo, inflamación e isquemia (Subramanian K. et al., 2012). La transformación desde la forma inactiva (microglía ramificada) hasta la activa está estrictamente controlada y acompañada por la producción de sustancias (citoquinas, aminoácidos excitatorios, glutamato, radicales libres...) por medio de las cuales se comunican con otras células del cerebro y del sistema inmunológico.

En el estado activado, la microglía ejerce una función esencial para la supervivencia neuronal y la inmunidad innata, elimina restos celulares tóxicos y aumenta la supervivencia neuronal produciendo factores tróficos y anti-inflamatorios. Además, facilita la reparación glial, es decir, la migración de células madre hasta el sitio de inflamación o daño, pudiendo estar implicada en la neurogénesis (Block F. et al., 2007). Pero también, por otro lado, ciertos estímulos provocan que la microglía alcance un estado de sobreactivación que puede incrementar el daño cerebral (Polazzi E. & Contestabile A., 2002) por la secreción de una serie de factores citotóxicos como óxido nítrico (NO) y el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) (Biber K. et al., 2007).

En el ojo, se sabe que la retina presenta microglía (Merida S. et al., 2015). Las poblaciones de células de origen mieloide, principalmente macrófagos, los cuales están constantemente reemplazados (Mérida, S. et al., 2015), están situados anatómicamente dentro de las límites gliales de los vasos de la retina interior y todo el parénquima de la retina (Zhang C. & Tso M.O., 2003; Dick A.D., 2009). La microglia expresan diversos marcadores asociados a macrófagos como son CD14, CD11b, y receptores hormonales similares a EGF mucina-1 (EMR1; también conocido como F4 /80 en ratones) (Merida S. et al., 2015; Kettenmann H. et al., 2011).

En la retinosis pigmentosa (RP) se ha observado como la degeneración de los fotorreceptores va acompañada de gliosis reactiva con activación y migración de la microglía de las capas internas de la retina a las externas y al espacio subretiniano (Roque R.S. et al., 1996; Gupta N. et al., 2003; Zeng H.Y. et al., 2005; Peng B. et al., 2014). En los últimos años se ha descrito un aumento de mediadores inflamatorios como interleuquinas (IL) y citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ,...) y quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), quimioquinas (motivo CC) ligando 5 (también llamadas CCL5 o reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas, RANTES) e IL-8,... en retina de ratones rd10 (Yoshida K. et al., 2012b) y en humor acuoso y vítreo de pacientes con RP (Yoshida K. et al., 2012a). Los autores sugieren que este incremento de mediadores inflamatorios contribuiría a una peor función visual en pacientes.

### **2.3.- Fisiología de la retina: proceso de fototransducción**

La función más importante de la retina en el mecanismo de la visión es la transformación de los estímulos luminosos en señales eléctricas. Este fenómeno es denominado transducción visual o fototransducción y tiene lugar en los segmentos externos de los fotorreceptores (conos y bastones).

Los segmentos externos de los bastones están formados por una acumulación de discos membranosos en forma de pilas de monedas rodeados por la membrana celular, donde se encuentra un pigmento fotosensible llamado rodopsina. En los conos los discos están formados por repliegues de la propia membrana plasmática y las moléculas fotosensibles se denominan opsinas (Cuenca N., 2009; Ira S., 2003). Estos pigmentos visuales están formados por una parte proteica, opsina, que determina la longitud de onda del fotón que absorberá, y la vitamina A1, 11-cis-retinaldehído (retinal) que es la porción que absorbe la luz (cromatóforo) (Cuenca N., 2009; Ira S., 2003).

En oscuridad, el potencial de membrana de los bastones es de -30 mV, siendo considerablemente menor que el resto del potencial típico de las neuronas (-60 a -90 mV) y otras células eléctricamente activas. Consecuentemente de esta despolarización en oscuridad, los bastones secretan constantemente neurotransmisores, y las neuronas bipolares de la retina están estimuladas (Ira S., 2003; Darnell R., 1990; Artigas M. et al., 2005; Berne L. & Levy K. 2006).

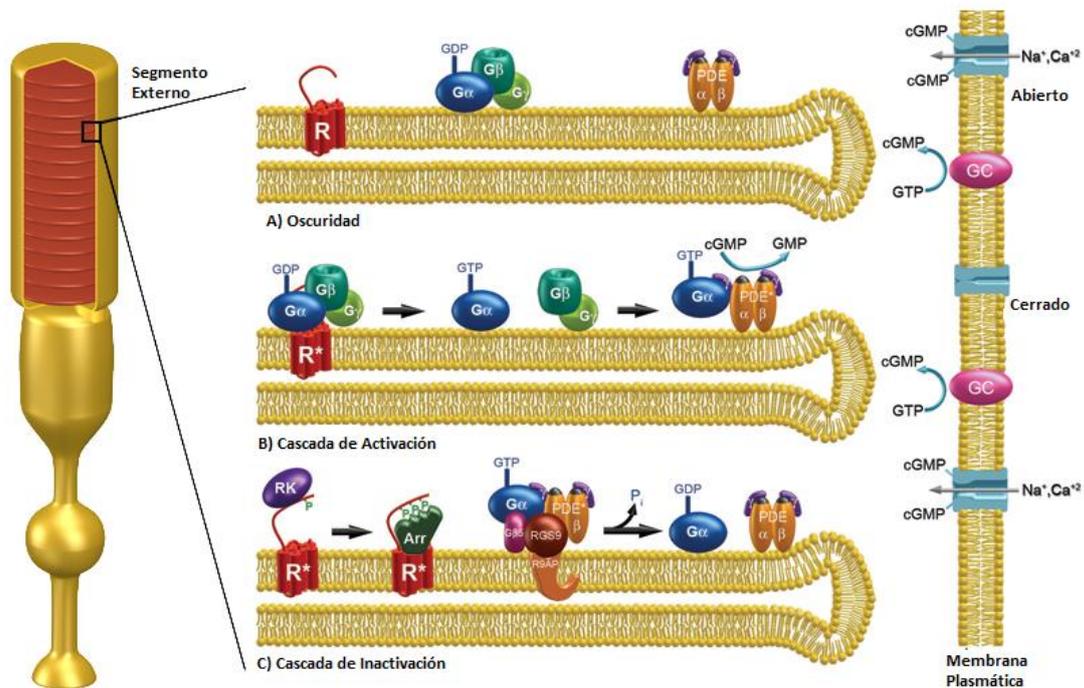
En condiciones lumínicas, debido a la absorción de fotones por los fotorreceptores de los receptores, se produce la estimulación de los discos del segmento externo, que activan una compleja cascada de reacciones enzimáticas y bioquímicas como respuesta a la luz, induciendo el cierre de los canales catiónicos de la membrana del fotorreceptor, impidiendo la salida de iones sodio y calcio. Este tráfico de iones determina la hiperpolarización de la célula provocando la retención de neurotransmisores como el glutamato (Cuenca N., 2009; Riquelme A. et al., 2010).

El evento molecular inicial de la fototransducción, consiste en la absorción de un fotón por parte de la rodopsina, el cual causa la isomerización del retinal (R) (11-cis-retinal), a su estado activo (11-trans-retinal) y alcanza su forma activa más estable: metarrodopsina II (R\*) (Rawn J.D., 1989; Hargrave P.A. et al., 2001; Arshavsky V.Y et al., 2012; Wert K.J. et al., 2014). La rodopsina, excitada por la luz, cataliza el intercambio de los nucleótidos guanosildifosfato (GDP) por guaniltrifosfato (GTP) en una proteína G denominada transducina.

La transducina consta de 3 subunidades (alfa, beta y gama), siendo la subunidad alfa ( $T\alpha$ -GTP) la utilizada para activar a otra enzima inhibidora de la fosfodiesterasa guanosín monofosfato cíclico (GMPc-específica 6) (PDE6) (Ching K. & Jason C. ,2015; Fu X., 2010), siendo esta enzima muy importante en la cascada de la fototransducción para el mantenimiento de los niveles de guanomonofosfato cíclico (GMPc) (Wert K.J. et al., 2014).

La transducina activada aumenta la actividad de PDE6 que a su vez estimula la degradación de GMPc a 5'-GMP (Alberts B. et al., 2008). La rápida reducción de los niveles de GMPc después de la estimulación lumínica, causa el rápido cierre de los canales de canales iónicos (cyclic nucleotide gated, CNG) localizados en la membrana plasmática, por lo que los niveles de iones sodio y calcio se reducen en la membrana y causan la hiperpolarización de la misma, iniciándose así la respuesta a la luz (Kang C. & Chen J. , 2015; Cuenca N., 2009; Ira S., 2003; Riquelme A. et al., 2010; Arshavsky V.Y & Burns S., 2012 Wert K.J. et al., 2014).

El resultado final es una disminución de la secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los fotorreceptores (Wert K.J. et al., 2014). La sinapsis con las células bipolares es inhibida, formándose un impulso nervioso que es transmitido a las células ganglionares y de éstas al cerebro (Riquelme A. et al., 2010).



**Figura 6.- Proceso de transducción visual.** Cascada bioquímica activada por la luz en un fotorreceptor: A) En la oscuridad, el GMPc regula un canal de sodio y provoca una corriente de iones sodio hacia el interior y la despolarización de la célula. B) La activación de la rodopsina por la energía luminosa hace que la proteína G (transducina) intercambie GDP por GTP, lo que a su vez activa al enzima fosfodiesterasa. C: La fosfodiesterasa degrada el GMPc y desactiva la corriente de oscuridad (Modificado de Arshavsky K. & Burns J., 2012).

El calcio también ejerce efectos muy importantes en la cascada de la fototransducción. Los niveles citosólicos de calcio disminuyen en presencia de luz, al cesar su entrada a través de los canales sensibles a GMPc.

Cuando la concentración de calcio disminuye por debajo de 10 nM, se estimula una proteína guanilato ciclasa (GC), localizada en la membrana plasmática, la cual sintetiza GMPc a partir de GTP. Esto conlleva a la recuperación de los niveles de GMPc presentes en el estado de oscuridad. Además, existen otras proteínas moduladoras de la cascada de excitación, las cuales funcionan de una manera dependiente de la concentración de iones calcio: la calmodulina,

proteína que regula directamente los canales iónicos dependientes de GMPc, y la recoverina, la cual regula la acción de la rodopsina quinasa de una manera dosis-dependiente de iones calcio (Hargrave P.A., 1993; Alberts B. et al., 2008).

Después de la activación de toda la cascada de fototransducción por la luz, es esencial la recuperación oportuna del fotorreceptor para que pueda responder de nuevo a la absorción de fotones, para ello se requiere la inactivación de cada uno de los componentes activados, como la transducina y la PDE6, así como la regeneración eficiente de la rodopsina, lo que se realiza mediante la rodopsina cinasa (RK), pero ésta a su vez debe activarse con GMPc, por lo que es necesario una rápida restauración de la concentración de esta (Fu Y.X., 2010) .

De esta forma la fosforilación de la rodopsina previene la unión de esta a la proteína G y el bastón vuelve al estado de reposo. Las alteraciones en cualquier paso de esta cascada pueden provocar la muerte del fotorreceptor (Schmidt S.Y & Berson E.L., 1990; Nakao T. et al., 2012).

### **3.- ESTRÉS OXIDATIVO**

Se denomina estrés oxidativo a aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante que puede afectar a la homeostasis del estado redox (Sies H., 1991). La instauración del proceso de estrés oxidativo ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, a favor de los primeros, llevando a la generación de grandes cantidades de radicales libres o al detrimento de la velocidad de neutralización de éstos (Halliwell B. & Whiteman M. et al., 2004). Este proceso conduce a la oxidación de biomoléculas con la consiguiente pérdida de sus funciones biológicas; así como al descontrol homeostático junto al potencial daño oxidativo contra las células y tejidos (Halliwell B. & Whiteman M. et al., 2004; Hicks J.J. et al., 2006). La cronicidad del estrés oxidativo conlleva importantes implicaciones en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la obesidad, la aterogénesis, la diabetes, los transtornos neurodegenerativos y el cáncer (Galili et al., 2007; Furukawa S. et al., 2004) (Figura 7).

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. El oxígeno es una molécula altamente inestable con gran capacidad de aceptar los electrones de otras moléculas, esta afinidad hace que se formen moléculas de oxígeno inestable con un electrón desapareado en la última capa, es decir radicales libres de oxígeno, de ahí que se les denomine genéricamente especies reactivas de oxígeno (ERO), con una gran capacidad de reacción.

En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RL) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno ( $\text{HO}^\cdot$  y  $\text{O}_2^\cdot$ ), por este motivo muchos autores los llaman especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas dos denominaciones (RL y ERO), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ERO no son necesariamente radicales, como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso. Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse a las ERO que engloba a las otras categorías o condiciones.

Los RL son todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los RL tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena.

Se ha demostrado la función de las ERO en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Hardy K. & Hunt N.H., 2004; Zimmerman M.C. et al., 2002), además las ERO, pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, (Minamiyama Y. et al., 2007; Fillebeen C. & Pantopoulos K., 2002) o, contribuir a la regulación del proceso inflamatorio (Bourbon A. et al., 2004).

Las principales ERO involucrados en la neurodegeneración son anión superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y el altamente reactivo radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ). Son productos normales del metabolismo del oxígeno y se producen en exceso durante el curso de la isquemia/reperfusión que a través de una variedad de mecanismos, son capaces de inducir daños y, en casos graves, la muerte celular a través de alteraciones mitocondriales que conducen a la liberación de citocromo C o por la activación de factor nuclear de transcripción kappa B (NFκB).



**Figura 7.- Representación gráfica del balance de las sustancias antioxidantes y las pro-oxidantes.** La superación de los sistema pro-oxidantes por los antioxidantes favorece la instauración del estrés oxidativo, caracterizado por la producción exacerbada de radicales libres y especies reactivas de oxígeno u otras especies reactivas. Esta situación conlleva al desarrollo de daños oxidativo, por medio de la oxidación de las moléculas y/o alteración de la homeostasis. (Imagen adaptada de Barbosa S. et al., 2008).

Por otra parte, se ha visto que la acumulación de ERO induce al estrés oxidativo y causa la despolarización de la membrana mitocondrial, que es seguida por la liberación del citocromo C, la activación de caspasas, y la apoptosis (Luo P.F. et al., 2012). Un aumento en los niveles de ERO puede provocar el mal funcionamiento de órganos tales como el cerebro (Muriach M. et al., 2010; Pomierny-Chamioło L., 2013), tejido especialmente susceptible al ataque de agentes oxidantes, al presentar un elevado consumo de oxígeno y un gran contenido en sustratos fácilmente oxidables (Noterdmann R., 1994), la retina (Miranda M. et al., 2010), puesto que presenta la mayor tasa metabólica por peso en el cuerpo y está constantemente expuesta a ERO, de hecho, el sistema redox es particularmente importante para la supervivencia de la retina. De hecho, en todos los tejidos, el aumento de los niveles de ERO puede dar lugar a la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y daño en el ADN (Devi B.G. & Chan A.W., 1999; Pomierny-Chamioło L. et al., 2013). Los biomarcadores de estrés oxidativo se han determinado en muchos trastornos neurológicos y psiquiátricos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, trastorno bipolar,...

### 3.1.- Radicales libres

Las ERO proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados (Rybczynska M., 2004). En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno (REDOX), que tienen lugar por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria controlada y también en ocasiones, como respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperóxia y exceso de ejercicio e isquemia.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas J. & Blattna J., 1986).
2. Una excesiva actividad de la nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa fagocítica.
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios; en concreto la enzima cicloxigenasa, la lipoxigenasa y la citocromo P-450 (Rybczynska M., 2004).
4. La deslocalización de metales de transición (iones hierro e iones cobre) de sus sitios de depósito.
5. La hiperactividad de la xantina oxidasa.
6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa.
7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano D. et al., 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich I., 1983).
2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell B. & Gutteridge J.M., 1986).

### 3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush M.A. et al., 1982).

Los RL pueden inducir alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas) (Carmody R.J. et al., 1999; Liang F.Q. et al., 2003; Yamada H. et al., 1999; Okoye G. et al., 2003; Valko M. et al., 2007). Pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos los cuales pueden conducir en último término a apoptosis y muerte neuronal (Paravicini T.M. & Touyz R.M., 2008; Gupta N. et al., 2007; Torchinsky A. & Toder V., 2007; Svensk A.M. et al., 2004; Liu P.K. et al., 2002); y se han relacionado entre otras enfermedades, con la hipertensión (Touyz R.M., 2004), la disfunción cardiovascular (Ramachandran V. et al., 2003), la inflamación (Telfer J.F. & Brock J.H., 2004), y enfermedades como la diabetes (Arnal E. et al., 2010; Miranda M. et al., 2007; Muriach M. et al., 2006; Miranda M. et al., 2004), la RP (Carmody R.J. et al., 1999; Hackam A.S. et al., 2004), el SIDA (Jareño E.J. et al., 2002) etc.

#### **3.2.- Estrés oxidativo en la retina**

Numerosos estudios han demostrado como la retina es altamente sensible al daño ocasionado por el estrés oxidativo (Miranda M. et al., 2010). La retina, necesita grandes cantidades de oxígeno y el contenido de lípidos insaturados y su constante exposición a la luz la convierten en un sitio de elección para la producción de radicales de oxígeno y la peroxidación lipídica (Miranda M. et al., 2010; Liang F.Q & Godley B.F., 2003; Yamada H. et al., 1999; Yamada H. et al., 2001; Okoye G. et al., 2003; Bosch-Morell F. et al., 2015). Por lo que, cada vez hay mayor evidencia de como el estrés oxidativo contribuye a numerosas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la RP, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma, retinopatía diabética y a el daño causado por la luz (Berson E.L. et al., 1993; Berson E.L. et al., 2004; Bazan NG, 2006).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) desencadena el desarrollo de la DMAE (Ardeljan D. & Chan CC., 2013). ERO también puede ser importante en la patogénesis de la RP y glaucoma. Las células fotorreceptoras en RP y las células ganglionares en el glaucoma son altamente sensibles al estrés oxidativo durante las primeras etapas de la degeneración celular. En ambos tipos de células, los estímulos apoptóticos, que desencadenan la muerte apoptótica, se ven agravados por el estrés oxidativo (Chrysostomou V. et al., 2013, Himori N. et al., 2013, Oveson B.C. et al., 2011; Sanvicens N. et al., 2004).

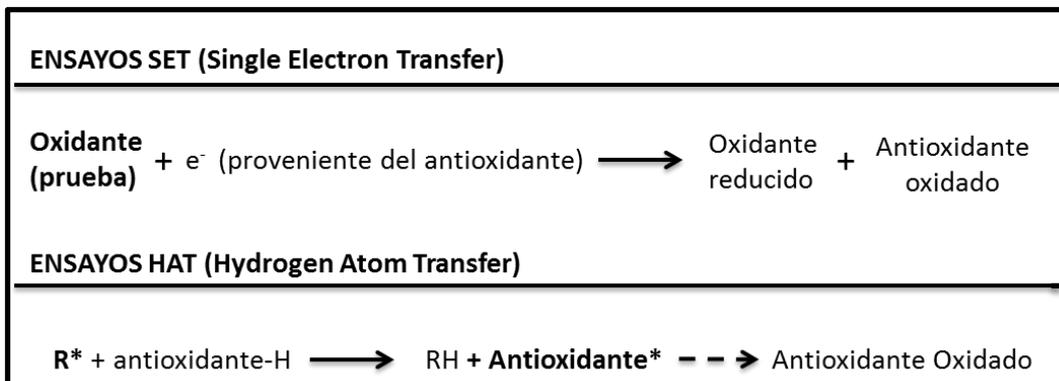
### 3.3.- Defensas antioxidantes

La exposición a los RL debido a los daños generados por la exposición excesiva al sol, tabaco, mala alimentación.... ha llevado a el organismo humano a desarrollar una serie de mecanismos de defensa (Cadenas E., 1997), siendo estos: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparación, (iii) mecanismos de defensas físicas, y (iv) mecanismos de defensas antioxidantes (Valko M. et al., 2007).

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell B. & Gutteridge J.M., 1986), dicho de otra forma, un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). El término sustrato oxidable incluye casi toda macromolécula que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.

El término antioxidante resulta de una amplia descripción que engloba numerosas sustancias, de las cuales los captadores de radicales representan sólo una categoría, asociada únicamente al caso particular en el que se origina la formación de un nuevo RL más estable y menos dañino tras su interacción con la especie radical (Cos P. et al., 2003). Esta reacción es debida a una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón, o bien, de un átomo de hidrógeno a la especie radicalaria, dando como resultado la formación de un radical derivado del antioxidante (captador de radical) que, en la mayoría de las ocasiones, presenta carácter inerte, estable o de cierta reactividad (Cadenas E. et al., 1997).

En referencia a la actividad antioxidante, ésta se encuentra determinada por tres factores fundamentales: la capacidad del antioxidante para acceder a la zona de reacción, su reactividad química, desarrollada por dos posibles mecanismos de acción: el mecanismo SET "single electron transfer" y el mecanismo HAT "hydrogen atom transfer" (Figura 8) (Halliwell, B., 2007) y, finalmente, por la estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.



**Figura 8.- Interacción directa con especies reactivas: mecanismo SET y mecanismo HAT.** El mecanismo SET permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. En el mecanismo HAT el antioxidante estabiliza radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente (Bartosz G., 2009).

La desintoxicación de las ERO es uno de los requisitos para la vida aerobia, por ello que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante integrado por las defensas antioxidantes endógenas y exógenas:

- Defensas antioxidantes endógena: Formadas por enzimas con capacidad antioxidante directas, es decir inactivan directamente a las ERO (Poulson H.E. et al., 1998; Zhong Y. et al., 2002) como son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y la catalasa etc ..., y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales, como son glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc (Sies H., 1991).

Estas enzimas catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos (Chaudière B. et al., 1999). La acción antioxidante de todas estas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular. Entre las enzimas

mencionadas, dos casos ameritan un comentario adicional. El primero, la SOD se distingue pues si bien su acción remueve un radical libre (superóxido), como producto de su acción se forma una especie que también es reactiva, peróxido de hidrógeno. Esto último pone de manifiesto la importancia que tiene otras enzimas capaces de remover peróxido de hidrógeno, como es GSx. La segunda enzima que amerita comentario es la glutatión reductasa pues su acción antioxidante es doble ya que ésta cataliza no solo la remoción de un ROS sino que además, como resultado de ello, da lugar a la formación de GSH, un importante antioxidante celular.

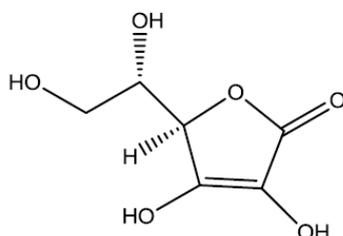
Debido a que la retina es especialmente sensible al EO, dispone de sustancias antioxidantes como los pigmentos visuales o por ejemplo vitaminas como la vitaminas C y E, los cuales contrarrestan los efectos nocivos de los RL en el ojo (Garland D.L., 1991; Stoyanovsky D.A. et al., 1995; Rozanowska M. et al., 2012). En el humor acuoso existen elevados niveles de ácido ascórbico o vitamina C y de glutatión (GSH) (Umapathy A. et al., 2013) capaces de proteger al ojo del daño oxidativo, neutralizando los radicales libres y las ERO (Ringvold A., 1996).

- Defensas antioxidantes exógenas: Formadas por sustancias no enzimáticas que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes, como son el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), los carotenoides, los flavonoides, el ácido lipoíco y otros antioxidantes (Valko M. et al., 2007). En este apartado podemos incluir minerales como el selenio, zinc, cobre y compuestos como la coenzima Q10.

Las estructuras químicas de todas estas moléculas es muy diferente. Por ejemplo, la vitamina C, generalmente conocida como ácido ascórbico aunque en su estructura no existe ningún grupo carboxilo, ha sido propuesta desde hace muchos años como un eficaz antioxidante. Entre sus propiedades químicas sobresale su fuerte poder reductor, es decir, la facilidad con que se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico.

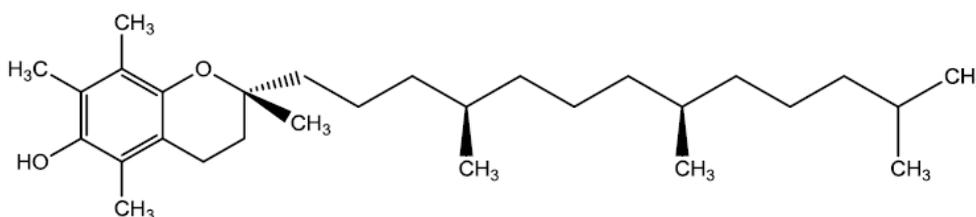
Tiene un peso molecular de 176,13 Da, es hidrosoluble y posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras. Tales propiedades se deben a su estructura enediol y a la posibilidad de ionizar el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia (figura 9). Eventualmente, puede disociarse el hidroxilo del carbono 2, formando un dianión, aunque no adquiere la misma estabilidad que la del carbono 3. La forma natural de la vitamina es el isómero L que posee propiedades nutricionales; el isómero óptico

del carbono 4 D tiene alrededor de 10% de la actividad del isómero L- pero sin fines vitamínicos, al igual que el isómero óptico del carbono 5, el ácido iso-ascórbico (Jesse F. et al., 2000: Marcelo H.S. & Cafara T.A., 2007).



**Figura 9.- Estructura química del ácido ascórbico.**

La actividad antioxidante de los tocoferoles (Vitamina E) está basada en el sistema redox tocoferol-tocoferilquinona. Son secuestradores de radicales libres y de radicales peróxidos. Se ha sugerido que la larga cadena de título permite al tocoferol repartirse entre las membranas lipofilas de células y orgánulos, donde ejercerían su actividad antioxidante, evitando el daño oxidativo. El  $\alpha$ -tocoferol, con su cadena de isopreno de 16 carbonos protege mejor de la oxidación a microsomas de hígado, sinaptosomas de cerebro y liposomas de fosfatidil-colina que otros derivados del cromano con cadenas de C11, C6, C3 y C1, cuya actividad va disminuyendo a medida que se acorta la cadena (Duran M. & Padilla B., 1993) (figura 10). En lo que se refiere a propiedades antioxidantes, es lógico que el acetato de tocoferilo, que es la forma comercial más frecuente de la vitamina E, carezca de ellas, ya que el grupo hidroxilo se encuentra protegido. Sin embargo, en algunas condiciones, como pueden ser sistemas acuosos ácidos, se produce un cierto grado de hidrólisis, liberándose tocoferol, que actúa como antioxidante (Schuler P., 1990).



**Figura 10.- Estructura química del (+) –  $\alpha$ - tocoferol.**

### 3.4.- El sistema glutatión

El glutatión es un tripéptido,  $\gamma$ -l-glutamyl-l-cysteinyl-glicina, que se encuentra en todos los tejidos de mamíferos y especialmente altamente concentrado en el hígado. Existe glutatión en las formas tiol reducida (GSH) y disulfuro oxidado (GSSG) (Kaplowitz N. et al., 1985).

Por decirlo de otro modo, se denomina sistema glutatión, al conjunto formado por el glutatión (GSH) y las enzimas relacionadas con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister A. & Anderson M.E., 1983). El GSH es un tripéptido de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace  $\gamma$ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister A. & Anderson M.E., 1983). Es el tiol no proteico más abundante en prácticamente todas las células animales (Dringen R., 2000) y su presencia se puede explicar por su función de protección frente a la toxicidad del oxígeno.

#### 3.4.1.- Síntesis del Glutathion

La síntesis de GSH se produce en el citosol de prácticamente todas las células a partir del glutamato, la cisteína y en dos pasos consecutivos (1) catalizados por la enzima ligasa  $\gamma$ -glutamilcisteína (GCL, también conocido como la sintetasa de  $\gamma$ -glutamilcisteína) y (2) catalizados por la glutatión sintetasa (GS) (Meister A. & Anderson M.E., 1983).

(1) El primer paso de la biosíntesis de GSH se considera limitante de la velocidad, es catalizada por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), para dicha reacción se requiere de ATP con glutamato y cisteína para formar un dipéptido,  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ GluCys) (Aoyama A. & Nakaki T., 2013).

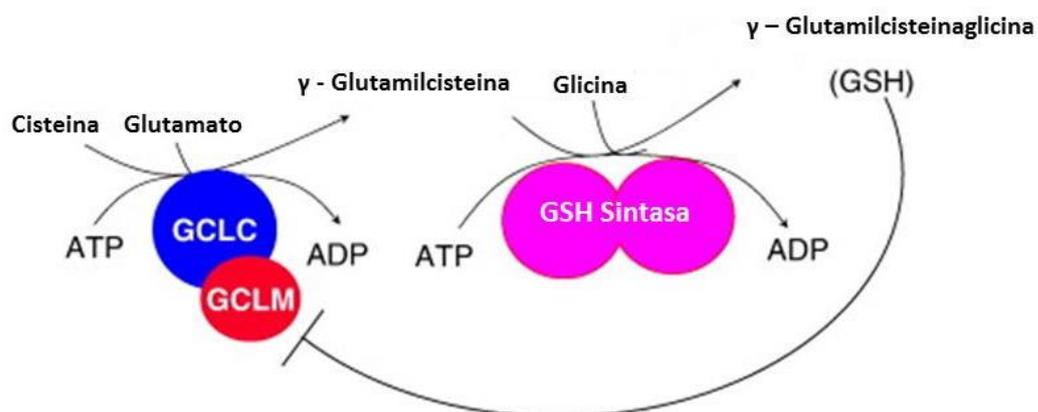


La GCL es una enzima heterodímera de aproximadamente 73-kDa y está compuesta por dos subunidades: una subunidad catalítica o pesada (GCLC) y una subunidad ligera o modificadora (GCLM) (Richman P.G. et al., 1975; Shelly C. & Lu M., 2009; Aoyama A. & Nakaki T., 2013). La GCLM no tiene actividad enzimática; Sin embargo tiene una importante función reguladora (Huang C.S. et al., 1993a, Huang C.S. et al., 1993b) pues ratones knockout para la GCLM son

viables, pero en ausencia de la GCLM, la GCLC es catalíticamente ineficiente, dando lugar a una disminución de la concentración GSH (Yang et al., 2002). Además, se ha visto como la asociación de GCLM con GCLC disminuye el valor de la constante de afinidad ( $K_m$ ) para el glutamato y aumenta el valor de la constante de inhibición ( $K_i$ ) para la inhibición de la retroalimentación de GSH (Chen G. et al, 2005).

La formación de esta enzima está regulada por estrés, viéndose aumentada en condiciones de daño oxidativo aunque no exista ningún cambio en la expresión de ambas enzimas (Krejsa C.M et al., 2010). La GCL es considerada la enzima limitante de la velocidad de síntesis ya que la sobreexpresión de GS no aumenta los niveles de GSH en tanto que la sobreexpresión de GCL incrementa la síntesis de GSH (Grant C.M et al., 1997).

(2) El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintetasa (GS), dicha reacción también requiere de ATP con  $\gamma$ - glutamilcisteína y glicina para formar GSH. Aunque no se sabe mucho acerca de los mecanismos exactos que subyacen a la regulación de la actividad de la GS en comparación con los de GCL (Shelly C. & Lu M., 2009; Aoyama A. & Nakaki T., 2013); si es sabido que la GS está compuesta de dos subunidades aparentemente idénticas (Oppenheimer L. et al., 1979). La deficiencia de esta enzima en los seres humanos puede resultar en niveles de GSH inferiores y tiene consecuencias metabólicas dramáticos porque la  $\gamma$ -glutamilcisteína acumulada se convierte en 5-oxoprolina, que puede causar acidosis metabólica grave, anemia hemolítica, y daño al sistema nervioso central (Shi Z.Z. et al. , 1996). (Figura 11).



**Figura 11.- Síntesis de glutatión.** La síntesis de GSH se produce a través de un proceso enzimático en el que requiere de dos pasos. El primer paso es catalizado por ligasa glutamato-cisteína, que se compone de subunidades catalíticas y de modificación. Este paso conjuga cisteína con glutamato, dando lugar a la generación de  $\gamma$ -glutamilcisteína. El segundo paso es

catalizada por la enzima glutatión sintetasa, que añade glicina a gamma-glutamylcisteína para formar  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine o GSH. La GSH ejerce una inhibición de retroalimentación negativa sobre GCL. (Imagen adaptada de Shelly C. Lu, 2013).

### **3.4.2.- Función del glutatión**

El GSH podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El GSSG es regenerado de nuevo a su forma reducida por medio de la glutatión reductasa NADPH dependiente, que es constitutivamente activa, por ello el GSH es la forma más abundante en la célula preparada para contrarrestar el estrés oxidativo (Ballatori N. et al., 2009).

La presencia de GSH en el cuerpo constituye en sí una defensa contra los radicales libres. El GSH es dependiente del NADPH que es el sustrato necesario para la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del  $H_2O_2$  y de lipoperóxidos (L-OOH). La relación GSH/GSSG es un indicador fiable del estado redox celular, una reducción crónica de GSH/GSSG refleja una capacidad antioxidante reducida y un aumento de la vulnerabilidad al daño oxidativo (Jones B.W., 2006). El estrés oxidativo se activa como consecuencia del agotamiento de GSH o el aumento de los niveles de GSSG. Entre los roles que se le atribuyen al GSH se encuentra el de la protección de las células frente a el estrés oxidativo o lo daños causados por la radiación, la desintoxicación de metabolitos xenobióticos o peróxidos, y la regeneración de vitaminas antioxidantes (Miranda M. et al., 2010).

El glutatión está relacionado con la actividad de diferentes enzimas como:

- Actividad peroxidasa representada por tres enzimas:

1. Glutatión peroxidasa (GPx): enzima que contiene selenio y capaz de reducir el  $H_2O_2$  a agua por oxidación del GSH. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutatión peroxidasa.

Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima (Van Vleet J.F. et al., 1981).

2. Glutathion transferasa con acción peroxidasa: algunos isoenzimas de la glutathion S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutathion peroxidasa está disminuida mientras que la actividad glutathion transferasa está aumentada (Schramm H. et al., 1985).

3. Glutathion peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos oxidados de membranas biológicas. Es un monómero y ha sido descubierto como una seleno enzima distinta de la clásica GPx basándose en su DNA<sub>C</sub> y secuencia aminoácida.

- Actividad glutathion disulfuro reductasa: el GSSG formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutathion reductasa. Por tanto esta enzima mantiene el estado reducido del glutathion, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.

El producto final de la oxidación de GSH es GSSG, constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro, que es regenerado por la glutathion reductasa (GR), enzima que transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta molécula.

Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR el GSH no es consumido, pero es reciclado y así puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera (Figura 12).

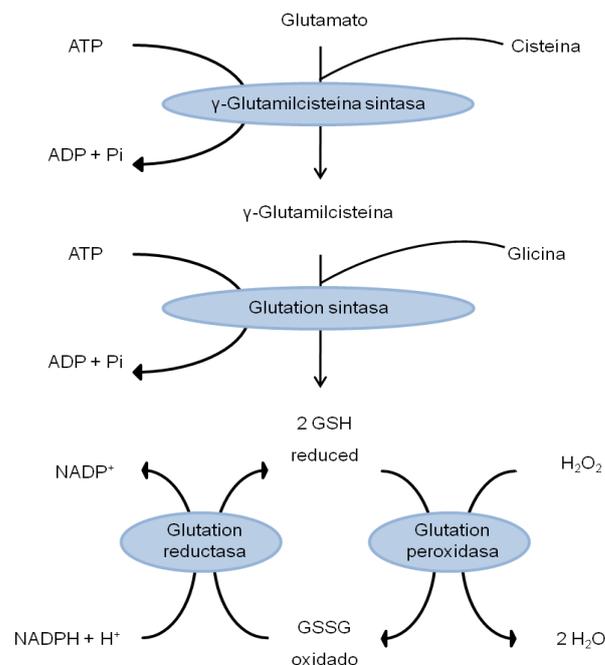


Figura 12.- Esquema del metabolismo del glutathion (Adaptado de Massaad C.A. et al., 2011).

#### 4.- DISTROFIAS RETINIANAS

Las distrofias retinianas (DR) son un grupo de enfermedades degenerativas de la retina las cuales tienen una elevada variabilidad clínica y heterogeneidad genética (Benjamin M. et al., 2015). Dichas enfermedades se pueden dividir entre ser sindrómicas (síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Senior-Locken, síndrome de Alport...) o no sindrómicas (retinosis pigmentaria, distrofias maculares, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Stargardt, etc.).

Actualmente, se conocen más de 260 genes y loci responsables de algún tipo de DR (<https://sph.uth.edu/retnet/>). A modo de ejemplo, existen 53 genes responsables del desarrollo de la RP o 22 genes responsables de amaurosis congénita de Leber. Además, distintas mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a cuadros clínicos diferentes o el mismo cuadro clínico pero con diferentes patrones de herencia (Ávila-Fernández A., 2011).

Las manifestaciones más comunes de estos trastornos incluyen desde la pérdida de la visión nocturna a la pérdida de visión diurna (por la muerte progresiva primero de los bastones y luego de los conos), así como la visión de túnel y la posterior progresión a la ceguera total. Además, la gravedad por lo general aumenta con la edad (Benjamin M. et al., 2015; Daiger S.P. et al., 2015).

Según el tipo de fotorreceptor que se ve afectado primariamente, las DR se pueden clasificar en cuatro grupos:

- 1.- Distrofias de bastones: Son DR que inicialmente afectan a los bastones y progresivamente se extienden también a los conos. Ejemplos de este tipo de DR son la RP.
- 2.- Distrofias de conos: Se caracteriza por la pérdida inicial de la visión central, la agudeza visual y la dificultad para percibir colores debido a la pérdida progresiva de los conos. Entre las distrofias de los conos más frecuentes, se encuentra la enfermedad de Stargardt, de herencia recesiva, aunque existen un gran número de distrofias maculares que reciben distintos nombres en función del patrón que presentan en los estudios de fondo de ojo (Roosing S. et al., 2014).
- 3.- Distrofias de conos y bastones: En este tipo de distrofias, la muerte de los conos se produce con anterioridad a la muerte de los bastones. Una de las más comunes y de entidad clínica de inicio temprano es la amaurosis congénita de Leber (ACL), se caracteriza

por una pérdida visual muy severa de forma congénita o antes del primer año de vida por la pérdida simultánea de conos y bastones (Roosing S. et al., 2014; Hamel C.P., 2014).

4.- Otras distrofias de retina: Algunas de las DR son difíciles de catalogar porque aunque afectan a la retina, se asocian, además, a alteraciones de otras estructuras oculares. Como por ejemplo La coroideremia que es una DR ligada al cromosoma X caracterizada por una degeneración progresiva de la coroides, el EPR y la retina; la retinosquiasis, también ligada al cromosoma X caracterizada por una degeneración macular temprana; el síndrome de Goldmann-Favre es una distrofia vitreoretiniana muy poco frecuente con un patrón de herencia autosómico recesivo, etc... (Hamel C.P., 2014).

## **5.- RETINOSIS PIGMENTARIA**

### **5.1.- Definición y fisiopatología de retinosis pigmentaria**

La RP es una enfermedad genética de tipo hereditaria que se caracteriza por la muerte progresiva de los fotorreceptores (Han J. et al, 2013; Daiger S.P. et al., 2003; Farrar G.J. et al., 2002).

La prevalencia mundial de la enfermedad es de 1 en 4.000 para un total de más de 1 millón de personas afectas (Bunker C.H. et al., 1984). La RP representa aproximadamente la mitad de los casos de las enfermedades retinianas hereditarias a nivel mundial (Daiger S.P. et al., 2013).

Existe gran variabilidad en cuanto a la edad de inicio de la enfermedad, normalmente, los primeros síntomas se producen en la infancia, pero los síntomas más severos no se manifiestan hasta la edad adulta (40-50 años) (Hartong D.T. et al., 2006; Sahni J.N. et al., 2011). A pesar de esto, la edad de aparición de los síntomas es una medida imprecisa ya que el declive de la enfermedad va a depender de los factores ambientales y dietéticos, defectos primarios genéticos, estrés oxidativo, etc... (Hartong D.T. et al., 2006; Miranda M. et al., 2010; Punzo C. et al., 2012).

Desde su comienzo, los principales síntomas que provocan esta enfermedad retiniana son:

- Una deficiencia en la adaptación a la oscuridad, debido a la pérdida progresiva de los bastones (ceguera nocturna), una disminución del campo visual periférico (conocido como visión de túnel) (Figura 13), fotofobia y problemas en la visión en color y pérdida de agudeza visual (etapa en la que se produce la degeneración de los conos). Además se produce una alteración en el fondo del ojo, que muestra palidez papilar, disminución del calibre de los vasos

y depósitos de pigmento en forma de osteoclastos. El resultado final es la pérdida de la visión central como consecuencia de la muerte lenta y progresiva de los conos (Farrar G.J. et al., 2002, Tsui I. et al., 2007, Mitamura Y. et al., 2012). En la progresión de los síntomas en la RP, la ceguera nocturna generalmente precede a la visión de túnel por años o incluso décadas (Anasagasti A. et al, 2012; Ayuso C. & Millan J.M., 2010).



**Figura 13.- Visión en túnel característica de pacientes con retinosis pigmentaria.** Debido a la muerte progresiva de los bastones se va reduciendo el campo visual periférico, dando lugar a la llamada visión en túnel.

El mecanismo por el cual la muerte gradual de los conos va seguida a la muerte de los bastones es hasta ahora desconocido, siendo esta la clave para resolver los misterios de la RP. Existen 3 teorías de porque los conos dependen de los bastones para su supervivencia: 1) Una vez que los bastones mueren, estos liberan factores o agentes tóxicos que causan la muerte de los conos (Ripps R., 2002); 2) La microglía activada por la muerte de los bastones, migra a la capa de fotorreceptores y secreta sustancias tóxicas que hacen que los conos empiecen a degenerarse (Gupta N. et al., 2003); 3) los bastones producen un factor de supervivencia que es requerido por los conos, la falta de segregación de este factor da lugar a la disminución progresiva de la supervivencia de los conos (Leveillard T. et al., 2004).

Sin embargo, estas teorías no pueden explicar por qué los conos a menudo sobreviven durante años después de que todos los bastones hayan desaparecido, o la tremenda variabilidad de síntomas que existen entre los individuos en el momento de la muerte de los conos (Komeina K. et al., 2006).

## 5.2.- Genética de la retinosis pigmentaria

Los estudios epidemiológicos realizados en nuestro país indican que la forma autosómica dominante de la enfermedad está implicada en alrededor de un 15% de los casos mientras que las formas autosómico recesivas suponen el 34% y las formas ligadas al cromosoma X un 7%. El 50% de los casos son esporádicos, sin antecedentes familiares. Se supone que estos casos son en su mayoría de herencia autosómica recesiva pero no pueden descartarse mutaciones de novo en genes con herencia autosómica dominante (Ayuso C. & Millán J.M, 2010). El 1 de octubre de 2015, se indentificó que existían 238 genes y 278 loci independientes que intervienen en las degeneraciones retinianas (RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>). Debido a esta enorme heterogeneidad genética, la RP constituye un problema para el desarrollo de tratamientos que tienen que ver con defectos genéticos primarios. De hecho, la presentación clínica y la gravedad de la enfermedad varía con el patrón de herencia (Chang S. et al., 2011).

Típicamente, la RP puede clasificarse en dos grupos:

- No sindrómica: La enfermedad está restringida únicamente a los ojos, y a su vez puede ser transmitida genéticamente como autosómica dominante (30%-40% de los casos) (ADRP), autosómica recesiva (50% -60%) (ARRP), o ligado al cromosoma X (5%-15%) (XLRP), (Anasagasti A. et al., 2012; Petrs-Silva H. & Linden R., 2013; Hartong D.T. et al., 2006; Bunker C.H. et al., 1984; Grondahl J., 1987; Hamel C., 2006). Aproximadamente el 50% de los casos son esporádicos (Shu X. et al., 2007).
- Sindrómica: Aunque la RP es una enfermedad asociada a la vista generalmente, algunos casos se han asociado a enfermedades no oculares, los cuales pueden implicar más de 30 casos de síndromes diferentes (Wert K.J. et al., 2014; Hartong D.T. et al., 2006; Petrs-Silva H. & Linden R., 2013; Anasagasti A. et al., 2012; Chang S. et al., 2011 y Ferrari S. et al., 2011), siendo el síndrome de Usher el más común (caracterizado por presentar un deterioro auditivo congénito) o el síndrome de Bardet-Biedl caracterizado por un amplio espectro de signos clínicos, incluyendo la degeneración progresiva de la retina, polidactilia postaxial, la obesidad, dificultades de aprendizaje, etc... (Beales P.L. et al., 1999).

La mayoría de los casos de RP son monogénicos, sin embargo la enfermedad es muy heterogénea genéticamente. La mayoría de los genes causantes de la RP solo son responsables una pequeña proporción de casos (Mebed R. et al., 2015; Ayuso C. & Millan J.M., 2010 ), siendo los genes más importantes implicados en la RP: el gen de la rodopsina (RHO) (Mebed et al., 2015; Kim K.J. et al., 2011; Audo I. et al., 2010; Hamel C., 2006; Berson E.L. et al., 2002), lo que conduce a aproximadamente 25% de las retinitis dominante pigmentosa, el gen USH2A, causa aproximadamente el 20% de la enfermedad recesiva (incluyendo muchos con el síndrome de Usher tipo II), y el gen que RPGR que representa alrededor del 70% de la retinitis pigmentaria ligada al cromosoma X (Ayuso C. & Millan J.M., 2010; Dryja T.P. & Berson E.L., 1995) (Tabla 1 ).

Gen	Función	Herencia
CNGA1	Subunidad alfa del canal catiónico de la membrana plasmática de los fotorreceptores (fototransducción)	arRP
CNGB1	Subunidad beta del canal catiónico de la membrana plasmática de los fotorreceptores (fototransducción)	arRP
GUCA1B	Activador de la guanilato ciclasa (recirculariza el GMPc; fototransducción)	adRP
RHO	Rodopsina. Capta fotones de luz (fototransducción)	adRP, arRP
PDE6A	Subunidad alfa de la fosfodiesterasa del GMPc (fototransducción)	arRP
PDE6B	Subunidad beta de la fosfodiesterasa del GMPc (fototransducción)	arRP
SAG	Arrestina. Provoca la inactivación de rodopsina tras su activación por la luz (fototransducción)	arRP

**Tabla 1.- Ejemplos del papel de los algunos genes implicados en el desarrollo de la RP.** (Herencia; adRP: autosómica dominante; arRP: RP autosómica recesiva; XIRP: RP ligada al cromosoma) (Dryja T.P. & Berson E.L., 1995).

Actualmente no existe tratamiento que detenga la evolución de la enfermedad o logre revertir el proceso patogénico. El abordaje terapéutico se limita a retrasar la progresión mediante la protección de la luz solar y el suplemento con multivitamínicos, además de dispositivos ópticos y electrónicos, como las gafas de visión nocturna y el tratamiento de las complicaciones que se presenten (Dufier J.L., 2003).

### 5.3.- La inflamación en la retinosis pigmentaria

La inflamación es una respuesta adaptativa del sistema inmune ante una agresión externa, ya sea por un agente químico, o por virus o por bacterias, para el mantenimiento de la homeostasis y la restauración de su funcionalidad (Chen X. & Heping S., 2015).

El privilegio inmune es una propiedad de algunos sitios inmunoprivilegiados, como el cerebro, los órganos de reproducción y el ojo, y comprende un conjunto de procesos moleculares complejos que controlan la inflamación para prevenir el daño en los tejidos especiales (Streilein J.W., 2003; Ono S.J., 2003).

El ojo posee un sistema inmune especial en el cual se incluyen reguladores e inhibidores de la respuesta inmune, lo que ayuda a modular la respuesta ante la presencia de un antígeno. Este inmunoprivilegio se consigue a través de tres mecanismos: (a) barreras físicas como la hematoacuosa y la hemato-retiniana; (b) un microambiente intraocular inmunosupresor y (c) la tolerancia periférica, la cual provoca la inactivación o la muerte celular de los linfocitos B y T "autorreactivos" en los órganos linfoides periféricos (bazo y nódulos linfáticos) (Taylor H.M., 2009). En concreto, la retina se considera un tejido inmunoprivilegiado debido a sus propiedades anatómicas y fisiológicas únicas (Chen X. & Heping S., 2015; Ono S.J., 2003).

Recientemente, la inflamación crónica se considera que es un factor etiológico de la RP, aunque, todavía no está claro si la inflamación es un contribuyente central o menor a la patogénesis de la RP (Yoshida N. et al., 2013; Viringipurampeer I.A. et al., 2013). Estudios más detallados han detectado los elevados niveles significativos de células inflamatorias y factores inflamatorios en el humor acuoso y vítreo y en la sangre de pacientes con RP, incluyendo múltiples citocinas y quimiocinas tales como las interleuquinas 1, 2, 8 (IL-1, IL-2, IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Viringipurampeer I.A. et al., 2013; Martínez-Fernández de la Cámara C. et al., 2015; Martínez-Fernández de la Cámara C. et al., 2013).

Cuando hay daño celular, bacterias, lipopolisacáridos o ERO, la microglía se activa, migra al lugar del daño donde actúa y fagocita a las células dañadas liberando TNF $\alpha$ , ERO y proteasas de manera general. En el caso de las RP, se crea un ambiente tóxico extracelular que destruye células sanas lo que produce un ciclo que amplifica el daño y acelera la muerte de los fotorreceptores (Zeng H.Y. et al., 2005; Peng B. et al., 2014; Zeng H. et al., 2014). De hecho, se ha observado como la degeneración de los fotorreceptores va acompañada de gliosis reactiva con activación y migración de la microglía de las capas internas de la retina, a las externas y al espacio subretiniano (Roque R.S. et al., 1996; Gupta N. et al., 2003; Zeng H.Y. et al., 2005; Peng

H. et al., 2014). Además, diferentes estudios han puesto de manifiesto como la activación de las células microgliales en la retina y la regulación positiva de TNF- $\alpha$  son eventos tempranos implicados en la muerte de los fotorreceptores en modelos murinos de RP (Yoshida N. et al., 2013; Cuenca N. et al., 2014).

Diferentes estudios muestran como además de la activación de la microglia, la activación de las células de Müller en estadios más avanzados de la RP forman una cicatriz glial en el espacio subretiniano. Tras sufrir un daño, las células gliales de Müller liberan quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$ , que promueven la infiltración de células inmunitarias (Cuenca N. et al., 2014). La activación de las células gliales de Müller asociada a la degeneración de los fotorreceptores también se ha observado en varios modelos animales de RP con sobreexpresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (Yu D.Y. et al., 2004; Cronin T. et al., 2010; Roesch K. et al., 2012; Chua J. et al., 2013).

## 6.- TRATAMIENTOS EN RETINOSIS PIGMENTARIA

Un objetivo clave en el desarrollo de una terapia efectiva para la RP es la comprensión de su fisiopatología, y la identificación de los eventos moleculares y los mecanismos de la enfermedad que ocurren en la retina degenerativa.

En la actualidad, los posibles enfoques terapéuticos dirigidos a la búsqueda de una posible cura para la RP se centran en:

1.- **Terapia génica:** Consiste en la reparación de genes y silencio génico de aquellas mutaciones que causan la enfermedad. Este tipo de terapias requieren de un diagnóstico y tratamientos tempranos, así como que los fotorreceptores sean viables aún en el momento de la intervención.

Actualmente, la terapia génica es la opción más prometedora para el tratamiento de las enfermedades retinianas, ya que tiene como objetivo la corrección del defecto genético causante de la enfermedad. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías tales como la “next generation sequencing”(NGS), más genes mutantes que causan la degeneración retiniana han sido encontrados (Shu X. et al., 2015) haciendo de esta terapia la más factible para la corrección del defecto genético.

La mayoría de estas terapias consisten en el uso de vectores virales, en concreto la terapias actuales se han basado en el uso del “recombinant adenoassociated virus” (rAAV) (Binny C.J. & Nathwani A.C., 2012). Un ejemplo de terapia génica para la RP es el uso de estos rAAV con el promotor del gen receptor tirosin quinasa humano (*Human receptor tyrosine kinase*, MERTK). Este gen está identificado como defectuoso en un modelo de ratas que presentan RP: the Royal College of Surgeons (RCS). Las mutaciones en MERTK son responsables de una rara forma autosómica recesiva de RP en humanos (Gal A. et al., 2000; Tada A. et al., 2006; Brea-Fernández A.J. et al., 2008). Smith y col. demuestran como en efecto puede haber una cierta supervivencia de los fotorreceptores, pero esta sólo se prolonga durante 12 semanas, incluso en presencia de la continua expresión del transgen MERTK (Smith A.J. et al., 2003). Una posible explicación es que una vez que se activa la maquinaria de la degeneración, esta se puede retrasar, pero no parar la muerte progresiva de los fotorreceptores (Sancho-Pelluz J. et al., 2008).

En consecuencia, uno de los principales objetivos de los estudios de terapia génica actual es el desarrollo de vectores AAV altamente eficientes (Petrus-Silva H. et al., 2009; Petrus-Silva H. et al., 2011) que permitan al menos una preservación parcial de la estructura del fotorreceptor (Han J. et al., 2013).

Por otro lado, la terapia génica para la mutación RPE65, que se asocia con amaurosis congénita de Leber RPE65 (LCA2), ha sido utilizada en la clínica con resultados esperanzadores (Bennett J. et al., 2012; Testa F. et al., 2013; Cideciyan A.V. et al., 2008; Cideciyan A.V. et al., 2013). Sin embargo, los defectos genéticos específicos con una sola mutación de genes se han encontrado en sólo unos pocos pacientes, limitando así la aplicación potencial de la terapia génica. Por otra parte, se ha demostrado que a pesar de que la terapia génica condujo a una mejoría visual importante, la degeneración retiniana continuó progresando en las regiones tratadas y no tratadas de la retina (Cideciyan A.V. et al., 2013). Para evaluar mejor las opciones de tratamiento para los pacientes humanos con ARRP causadas por mutaciones en la subunidad beta de la fosfodiesterasa 6 (PDE6B), se necesitan más estudios para explorar los efectos de las intervenciones terapéuticas en modelos animales más grandes en varias etapas de la degeneración de los fotorreceptores (Han J. et al., 2013).

Como conclusión, las posibilidades de éxito de la terapia génica están seriamente comprometidas por dos factores importantes: 1) la terapia génica es más eficaz cuando se inicia el tratamiento temprano, antes de la aparición de la muerte celular de fotorreceptores (Shu X. et al., 2015; Colella P. et al., 2012), 2) La alta heterogeneidad genética de esta

enfermedad requiere correcciones para cada mutación y en la práctica el número de pacientes con una misma mutación es muy pequeño, por lo que esto significa que las terapias génicas deben ser adecuadas a cada paciente (Zheng A. et al., 2015; Petrs-Silva H. & Linden R., 2014).

2.- **Estrategias de neuroprotección:** Son estrategias independientes de la mutación, las cuales tienen como objetivo preservar la viabilidad de las células afectadas y favorecer sus mecanismos de supervivencia. Además con este tipo de tratamiento tiene como objetivo proteger de la muerte tanto a los bastones (portadores de la mutación), como a los conos, que degeneran de forma secundaria a la mutación.

Este término hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores en el sistema nervioso central (SNC), capaz de prevenir, mitigar o retrasar, los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades como el Alzheimer, lesiones cerebrales, etc.

Además, proporciona un entorno favorable para prolongar la viabilidad de los fotorreceptores por su efecto sobre las vías bioquímicas secundarias. Se trata de una estrategia terapéutica que se puede lograr ya sea mediante la activación de factores de crecimiento neurotróficos, como por la inhibición de las vías de proapoptóticas (Xu Y. & Peng L., 2015). Recientemente se ha demostrado que los factores antiapoptóticos como la proinsulina enlentecen la degeneración de la retina en el ratón rd10 (Corrochano S. et al., 2008).

Debido a la relevancia de las estrategias de neuroprotección en este trabajo, en el siguiente apartado se hará una descripción más detallada sobre en qué consisten y su efecto terapéutico para el tratamiento de la RP actualmente.

3.- **Estrategias de reemplazo:** Se han convertido en una prometedora estrategia terapéutica para la RP (Shu X. et al., 2015). Este tipo de estrategias incluyen diferentes técnicas para sustituir o reemplazar los fotorreceptores que se han degenerado o perdido.

Se basan en el trasplante de células de la retina (uso de células madre embrionarias; embryonic stem cells, ESC), neuroesferas) el uso de prótesis o la optogenética (Deisseroth K. et al., 2006, Barber A.C. et al., 2013, Yvon C. et al., 2015; Nguyen H.V. et al, 2015; Shu X. et al, 2015).

La ontogenética, nacida de la óptica y la genómica, es una técnica prometedora para comprender mejor los traumas y las enfermedades neurodegenerativas. Esta novedosa técnica consiste en inyectar de un virus benigno, cuya información genética proviene de unas algas

fotosensibles. Así las células neurales se vuelven sensibles a la luz. Las proteínas, que actúan como interruptores, encienden o apagan las neuronas en función de los destellos de luz enviados en milisegundos mediante cables de fibra óptica (Kirpichnikov M.P. & Ostrovskiy M.A., 2015).

4.- **Otras:** La teoría del uso de la medicina tradicional china (traditional chinese medicine, TCM). Se basa principalmente en la práctica de la medicina china y está en constante enriquecimiento y desarrollo con la experiencia práctica. Diferentes estudios han demostrado como el uso de la acupuntura o de hierbas tradicionales chinas pueden detener en parte el avance de la enfermedad (Xu J. & Peng Q., 2015; Ma S. et al., 2012; Peng Q., 2011). Así la combinación de la medicina tradicional china con las estrategias actuales puede ser un objetivo prometedor para la reducción de la progresión de la RP (Xu J. & Peng Q., 2015; Shu X. et al., 2015).

La adopción de la estrategia terapéutica idónea depende en gran parte de la fase en la que se encuentre el proceso degenerativo. Muchos autores han propuesto el uso combinado de estas estrategias para hacer frente a la progresión de la enfermedad, ya que una de las hipótesis que se están barajando actualmente es que el uso conjunto de estas estrategias ofrece resultados tal vez más beneficios que cada una de ellas por separado. La razón de esto es que no solo se centran en la sustitución del gen defectuoso, sino también en la supervivencia de las células fotorreceptoras restantes. De tal manera que se podría en un futuro adecuar la estrategia a cada uno de los pacientes, sin importar la fase en la que se encuentre la degeneración retiniana.

De hecho se ha propuesto, después de diferentes estudios preclínicos y clínicos, que la terapia de reemplazo de genes usando inyecciones intravítreas de vectores AAV altamente eficientes y penetrantes combinados con antioxidantes, factores de crecimiento u otros reactivos farmacológicos, podría llegar a ser una estrategia importante para el tratamiento de la RP en el futuro. (Han J. et al., 2013; Grimm C. et al., 2002; Rex T.S. et al., 2004; Sanz M.M. et al., 2007).

### **6.1.- Estrategias de neuroprotección en la retinosis pigmentaria**

El término neuroprotección hace referencia a cualquier maniobra terapéutica que logre mantener la integridad de la función neuronal y evitar la muerte celular secundaria y la isquemia tras la lesión neuronal. La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se debe a un cúmulo de proteínas en el cerebro, que derivan en la sintomatología que hoy día

conocemos como demencia. Si somos capaces de proteger las neuronas y las células nerviosas cerebrales, el daño causado por esas proteínas puede quedar minimizado, lo que en la práctica supondría contar con un neuroprotector, un elemento capaz de prevenir el estrés oxidativo o inflamatorio. Es importante señalar que de ese efecto neuroprotector no sólo se beneficia el alzhéimer o el párkinson, sino que también otras patologías como el ictus cerebral (Djalchetti R. et al., 2003).

El tratamiento neuroprotector está ideado para interferir con una cascada de eventos celulares que producen la muerte celular: liberación de neuro-transmisores excitatorios, aumento de calcio, producción de productos tóxicos que incluyen óxido nítrico, radicales libres y activación de fosfolipasas. Para ello disponemos de diferentes fármacos y vitaminas que han demostrado una eficacia significativa, así como toda una serie de medidas relacionadas con hábitos de vida saludables

Las estrategias de neuroprotección en la RP podríamos clasificarlas en dos tipos: 1) aquellas cuyo objetivo es fortalecer las vías de supervivencia de los fotorreceptores y 2) aquellas cuyo principal objetivo es prevenir el inicio y la ejecución de los mecanismos de muerte celular en los fotorreceptores.

#### ***6.1.1.- Fortalecimiento de las vías de supervivencia de los fotorreceptores***

En cuanto al tratamiento de la RP, actualmente muchos estudios se están centrando en las formas de prevenir la muerte celular, a través del fortalecimiento de las vías de supervivencia de los fotorreceptores, mediante la administración de compuestos como anti-apoptóticos, anti-inflamatorios y/o neurotróficos.

En este contexto, diferentes estudios han demostrado como la administración de factores neurotróficos, de antioxidantes (solos o en cócteles), y más recientemente de neuroesteroides tales como la progesterona (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015) pueden ralentizar la neurodegeneración de la retina que se produce en las degeneraciones retinianas (Fernandez-Sanchez L. et al., 2011; Fernandez-Sanchez L. et al., 2012; Fernandez-Sanchez L. et al., 2012b; Lax P. et al., 2014; Fernández-Sánchez L. et al., 2015).

##### *a) Factores neurotróficos*

Las neurotrofinas, también llamadas factores neurotróficos, son una familia de proteínas que favorecen la supervivencia de las neuronas. Estas sustancias pertenecen a una familia de factores de crecimiento que son un tipo de proteínas que se vierten al torrente sanguíneo y son capaces de unirse a receptores de determinadas células para estimular su supervivencia,

crecimiento o diferenciación. Los factores neurotróficos son secretados por determinados tejidos, siendo una de sus funciones impedir a las neuronas diana que inicien la muerte celular programada (apoptosis), permitiendo así que las neuronas sobrevivan. Las neurotrofinas también inducen la diferenciación celular de células progenitoras para formar neuronas. (Vecino E. et al., 2015).

La familia de las neurotrofinas está formada por el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), la neurotrofina-1 (NT-1), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4 (NT-4), entre otros.

Los factores neurotróficos fueron estudiados por su potencial para mejorar la supervivencia de las neuronas en modelos genéticos y mejorar la respuesta sobre el estrés oxidativo que se produce de la degeneración de la retina (Kenneth R. et al., 2014). El uso de factores neurotróficos se justifica con la evidencia de que, al degenerarse la retina, se produce una activación de las vías neuroprotectoras endógenas. Esta activación induce a la producción de moléculas tales como: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) (LaVail M.M. et al., 1998), la cardiotrofina-1, el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Vigneswara V. et al., 2015), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF)... (Vecino E., et al., 2015; Zheng X.R. et al., 2012). Todos estos factores neurotróficos promueven la supervivencia celular (LaVail M.M. et al., 1998; Gao J. & Hollyfield J.G., 1996; Akhtar M. et al., 2004; Roth S., 2004).

LaVail et al., demostraron como la inyección vía intravítrea de factores de supervivencia, tales como BDNF, la neurotrofina-3, la neurotrofina-4 y el CNTF, en varios modelos animales con degeneración de la retina, incluyendo el ratón rd1, puede retardar la progresión de la muerte celular de los fotorreceptores (LaVail M.M. et al., 1998; LaVail M.M. et al., 2000; Liang F.Q. et al., 2001; Frasson M. et al., 2002).

El CNTF aumenta la supervivencia de los fotorreceptores actuando como un factor neuroprotector (Wen R. et al., 2012; Tao W. et al., 2012). El desarrollo simultáneo de la tecnología de células encapsuladas (TEC) en forma de microcápsulas implantables intraoculares, permitió la administración de CNTF a niveles fisiológicos durante largos períodos de tiempo. Este hecho ha permitido su utilización en ensayos clínicos en humanos donde se ha

podido demostrar su eficacia como neuroprotector (Tao W. et al., 2002; Tao W. et al., 2006; Tao W. et al., 2007).

Una primera fase (Fase I) de ensayos clínicos en humanos tratados con CNTF, se realizó en 10 pacientes con retinitis pigmentosa avanzada. En esta primera fase, los dispositivos de TEC fueron bien tolerados, y sin efectos adversos significativos a CNTF. En este ensayo varios participantes presentaron un aparente aumento de la agudeza visual (Sieving P.A. et al., 2009). En posteriores ensayos de fase II de CNTF para RP, Talcott y colaboradores monitorizando directamente los conos observaron como el número de conos se mantenía estable durante intervalos de tiempo que abarcan entre los 12 y los 35 meses en aquellos pacientes que recibieron implantes de CNTF, mientras que en los pacientes a los que se les administró placebo se observó una disminución del 9% al 24% en el número de conos. Estos datos clínicos demuestran como el CNTF puede tener efectos neurotróficos en los conos humanos (Talcott K.E. et al., 2011).

Durante las dos últimas décadas, se ha demostrado como una gran variedad de factores neurotróficos atenúan la degeneración de los fotorreceptores y en parte pueden preservar la función retiniana en diferentes modelos animales con degeneración hereditaria de la retina y otras enfermedades que implican la pérdida de fotorreceptores (Wenzel A. et al., 2005; Buch P.K. et al., 2007). Pero a veces estas estrategias suelen ser insuficientes, debido a que normalmente estos fármacos tienen tiempos de vida media corta, no pueden atravesar totalmente la barrera sangre-retina y se tiene que asumir el riesgo de efectos secundarios inaceptables cuando se administran por vía sistémica, por lo que se están desarrollando estrategias que permitan una administración local y sostenida de estos factores en la retina (Jung G. et al., 2013). Entre estas estrategias se incluyen Implantes intravítreos con dispositivos de un material biodegradable cargados con el factor en cuestión, el uso de vectores virales o no virales y trasplantes intraoculares de células modificadas genéticamente para secretar factores de crecimiento (Cayouette M. & Gravel C., 1997; Gamm D.M. et al., 2007; McGee P. et al., 2001; Miyazaki M. et al., 2003; Jung G. et al., 2013).

Curiosamente, la combinación de algunos de estos factores tróficos proporciona neuroprotección sinérgica en el rescate de los fotorreceptores (Miyazaki M. et al., 2008). Además, también han demostrado propiedades beneficiosas en el tratamiento de modelos animales de isquemia, de aumento de presión intraocular y de desprendimiento de retina, entre otras patologías.

*b) Antioxidantes*

Muchos estudios han demostrado como el ojo es particularmente sensible al estrés oxidativo (Yu D.Y. et al., 2000, 2004; Shen J. et al., 2005; Komeima K. et al., 2006; Sanz M.M. et al., 2007; Miranda M. et al., 2010). Como hemos comentado anteriormente, los bastones son más numerosos que los conos y son metabólicamente más activos, por lo que consumen un alto contenido de oxígeno. Cuando los bastones mueren estas cantidades de oxígeno ya no se pueden metabolizar tan fácilmente, por lo que se produce un aumento del estrés oxidativo, siendo esto una posible explicación de por qué los conos mueren a posteriori (Komeima K. et al., 2006; Shen J. et al., 2005; Yu D.Y. et al., 2004). Se ha demostrado mediante diferentes estudios, como los niveles incrementados de oxígeno dan lugar a daño oxidativo progresivo de los conos en diferentes modelos animales como un modelo de cerdo transgénico (Martínez-Fernández de la Cámara C. et al., 2013, Shen J. et al., 2005) y un modelo de ratón de RP, los ratones rd1 (Komeima K. et al., 2006).

Los extensos datos de la literatura sobre el papel protector de los antioxidantes en la degeneración de fotorreceptores, así como la existencia de varios informes que demuestran el papel fundamental del estrés oxidativo en la patogénesis de la degeneración de los fotorreceptores en las enfermedades retinianas, (Zhang M. et al., 2011; Kowluru R.A. & Chan P.S., 2007; Panfoli I., 2012), convierten el uso de antioxidantes en una de las más prometedoras dianas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades. En concreto, diferentes estudios han demostrado como el uso de antioxidantes, tanto *in vitro* como *in vivo* actúan retrasando significativamente el proceso de degeneración de los fotorreceptores en diferentes modelos animales (Komeima K. et al., 2006; 2007; Sanz M.M. et al., 2007; Miranda M. et al., 2010; Berson E.L. et al., 2012; Drack A.V. et al., 2012).

Se ha demostrado como el uso de antioxidantes como la luteína reduce con éxito las ERO en las células nerviosas de la retina y tiene un efecto protector sobre la función visual (Sasaki M. et al., 2009; Muriach M. et al., 2009); o como la astaxantina (AST) puede mejorar también la función visual y ayuda a retrasar la progresión de la DMAE (Piermarocchi S. et al., 2012). Li y col. demuestran como la AST protege las células ARPE-19 del daño celular inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de su actividad antiapoptótica y posee efectos antioxidantes (Li Y. et al., 2013). En otro estudio experimental, se observa como el uso de ácido lipoico en animales diabéticos reduce los marcadores de estrés oxidativo, la activación NFκB y del factor de crecimiento endotelial vascular en la retina diabética (Lin X. et al., 2006; Gomes M.B. & Negrato C.A., 2014).

Se ha descrito en la literatura como el estrés oxidativo también puede actuar como un mediador de la degeneración de la retina en la RP, y de hecho, se cree que desempeña un papel importante en la muerte celular de los fotorreceptores (Baumgartner W.A., 2000; Krishnamoorthy R.R. et al., 1999).

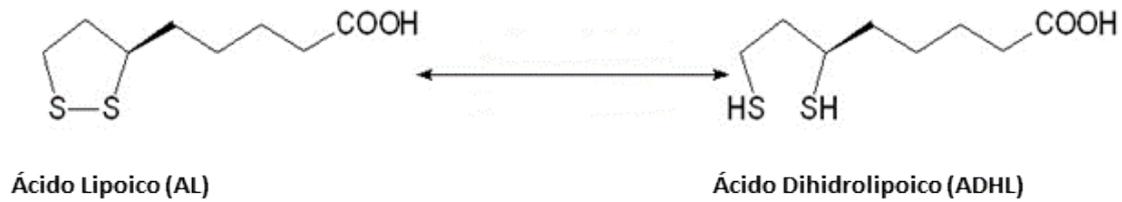
Berson E.L. y colaboradores (1993a, 1993b) demostraron como los suplementos de vitamina A ralentizaban el ritmo de degeneración de los fotorreceptores en animales con RP (Berson E.L. et al., 1993a, 1993b). Posteriormente, Li Y. et al., (1998) al estudiar el efecto de la suplementación de vitamina A en ratones transgénicos portadores de una mutación en la rodopsina, observó como este antioxidante puede tener un efecto estabilizador en la muerte de los fotorreceptores (Li Y. et al., 1998). El ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), otro antioxidante presente en el ácido biliar de los osos, preserva las funciones y el número de los fotorreceptores (Phillips M.J. et al., 2008; Oveson B.C. et al., 2011), disminuye el estrés oxidativo y la actividad caspasa en un modelo de rata con desprendimiento de retina (Mantopoulos D. et al., 2011). Además se ha demostrado como la administración del TUDCA en ratas P23H (mutación autosómica dominante en la rodopsina) exhibieron un menor número de células microgliales en todas las capas de la retina, además de una ausencia de células microgliales en el espacio subretiniano, demostrando su potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la RP (Noalles A. et al., 2014).

Por lo tanto, los antioxidantes pueden tener efectos beneficiosos para los pacientes con RP, aunque el éxito terapéutico parece estar altamente relacionado con el defecto genético del paciente, el antioxidante utilizado, y el momento en el que se administra el antioxidante.

Hoy en día un antioxidante que está cobrando una gran relevancia para el tratamiento de las retinopatías es el ácido lipoico por su gran capacidad como antioxidante (Akpınar D. et al., 2008) y como modulador de la transducción de varias vías la señalización como la insulina y el factor NFκB (Gomes M.B. & Negrato C.A., 2014; Golbidi S. et al., 2011; Packer, L., 1998).

#### b. 1.- El ácido lipoico

Tanto el ácido lipoico, también conocido como ácido tióctico (AT) o ácido 1,2 ditiolano -3-pentanoico, como su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (ADHL) (Figura 14), se consideran potentes agentes antioxidantes naturales (Shay K.P. et al., 2009, Scott B.C. et al., 1994; Packer L. et al., 1995), los cuales se encuentran comúnmente en los componentes de la dieta, tales como verduras (espinacas, brócoli, tomate) y carnes, principalmente vísceras y también en muchos suplementos dietéticos (Gomes M.B. & Negrato C.A., 2014)

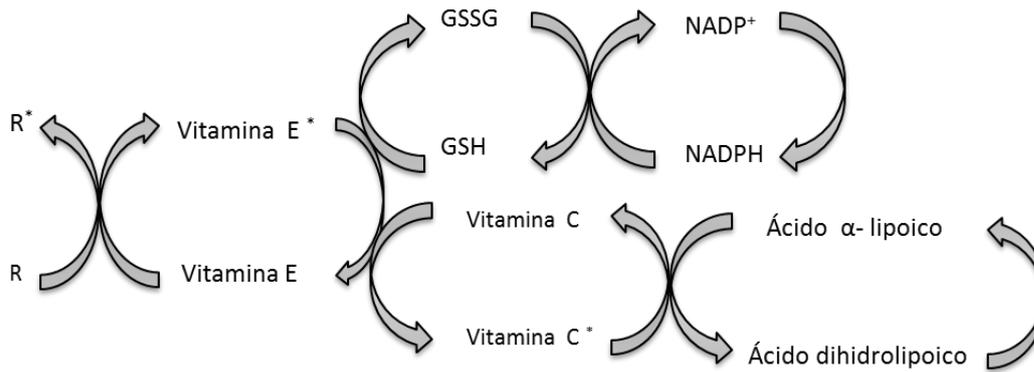


**Figura 14.- Estructura química del ácido lipoico y su forma reducida, el ácido dihidrolipoico.**

La presencia de dos radicales sulfhidrilo (-SH) en la estructura de un ácido graso de ocho carbonos corresponde a su forma reducida. Mediante un proceso de oxidación, el ácido lipoico cede dos electrones y dos protones ( $2e^- + 2 H^+$ ) para formar un puente disulfuro intramolecular. Este comportamiento lo convierte en un eficaz antioxidante (Ponts M., 2003). Imagen adaptada de <http://hemedicalbiochemistrypage.org/es/vitamins-sp.php>.

Hoy en día se cree que el ácido lipoico posee numerosas funciones bioquímicas: actúa como antioxidante biológico, como quelante de metales, reduciendo las formas oxidadas de otros agentes antioxidantes tales como la vitamina C y E y el glutatión (GSH) (Akpınar D. et al., 2007; Golbidi S. et al., 2011; Shay K.P. et al., 2009; Reed L.J., 1998) e incluso puede actuar como modulador de la transducción de varias vías de señalización (Gomes M.B. & Negrato C.A., 2014; Golbidi S. et al., 2011).

El ácido lipoico actúa como cofactor de complejos  $\alpha$ -dehidrogenasa y participa en reacciones de transferencia de grupos que contienen azufre (Packer L., 1994). Se encuentra en muy bajas concentraciones en los tejidos animales, unido habitualmente a complejos enzimáticos, por lo que no está disponible habitualmente como antioxidante (Packer L., 1994). No obstante, el ácido lipoico exógeno y libre (no unido a complejos enzimáticos) puede tener un papel importante como antioxidante y participa en el reciclaje del ascorbato (Kagan V.E. et al., 1992; Packer L., 1994). El ácido lipoico exógeno (mediante alimentos, suplementos alimentarios, etc...) se reduce a ácido dihidrolipoico, el cual es un potente antioxidante contra los radicales más importantes, además de participar en el reciclaje de la vitamina C, proceso por el que el ácido dihidrolipoico es convertido a ácido lipoico (Packer L., 1994) (Figura 15).



**Figura 15.- Engranaje de varios sistemas antioxidantes en colaboración para neutralizar los radicales libres.**

En una serie de estudios llevados a cabo en humanos y animales, se ha demostrado como el ácido lipoico protege contra las patologías oculares y del SNC (Zhao L. et al., 2014; Gilgun S. et al., 2001; Mérida S. et al., 2013). Estudios preliminares sugieren que puede ayudar en el tratamiento del glaucoma (Filina A.A. et al., 1995). En modelos animales con retinopatía diabética, se demostró como su administración a largo plazo, provoca una disminución de la apoptosis de las células de la retina y la reversión de la muerte celular de los fotorreceptores (Kowluru R.A. & Odenbach S., 2004; Kowluru R.A., 2005; Berkowitz B.A. et al., 2007; Dene B.A. et al., 2005; Yorek M.A. et al., 2004; Obrosova I.G. et al., 2000; Kowluru R.A. et al., 2014).

En consonancia con estos estudios, otras investigaciones, ponen de manifiesto como la administración temprana de ácido lipoico en ratas diabéticas, protege a la retina de apoptosis y de daño microvascular y por tanto, este antioxidante puede tener un efecto protector al retrasar la aparición y eventualmente ralentizando la progresión de la retinopatía diabética (Johnsen-Soriano S. et al., 2008). Mansoon B. et al., demostraron como el ácido lipoico podría revertir el daño oxidativo y mejorar la función mitocondrial en las células de Müller en animales con DMAE (Mansoon B. et al., 2013).

Recientemente, en un modelo *in vitro* llevado a cabo en células ARPE-19 se demostró que el ácido lipoico es capaz de proteger a las células del EPR tras la inducción de estrés oxidativo mediante diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (Li Y. et al., 2014).

Todos estos estudios hacen que la administración de ácido lipoico y sus derivados pueda ser considerada una estrategia eficaz para mejorar o retrasar enfermedades retinianas, tales como la RP. Sin embargo existen pocos estudios que se centren en el efecto del ácido lipoico sobre la

RP, de hecho los estudios actuales se basan en la combinación de este con otros antioxidantes naturales como la luteína, zeaxantina etc...

*b. 2.- Cócteles antioxidantes*

Muchos de los estudios actuales apuestan por la terapia combinada con distintos antioxidantes, cuya hipótesis parte del hecho de que la combinación de estos puede presentar resultados más beneficiosos que cada uno de ellos de estos por separado.

De esta forma la administración conjunta del ácido lipoico con otros antioxidantes ha revelado resultados prometedores en diferentes enfermedades neurodegenerativas. La administración conjunta de ácido lipoico y la vitamina C inhibe el estrés oxidativo en ratas expuestas a la toxicidad crónica inducida por arsénico (Liu C.B et al., 2010). El ácido lipoico administrado conjuntamente con vitamina E ha mostrado efectos protectores contra la peroxidación lipídica en varios modelos con una alteración de las funciones neurológicas, la reactividad glial y la remodelación neuronal en ratas (Gonzalez-Perez O. et al., 2002).

En cuanto a la retina, la administración de un cóctel de antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, Mn (III) tetrakis (ácido 4-benzoico) porfirina, y ácido lipoico) a tres modelos de ratón de RP (rd1, rd10 y Q344ter) redujo los niveles de marcadores de daño oxidativo en los conos y, como consecuencia, se produjo un aumento del número de conos conservados (Komeima K. et al., 2007; Komeima K. et al., 2006). Además, esta mezcla de antioxidantes desaceleró la muerte celular de los bastones, manteniendo así la función de los fotorreceptores, como se demostró mediante la realización de electroretinogramas en donde se hubo mayores amplitudes de las ondas a y b en los animales tratados en comparación con animales no tratados (Komeima K. et al., 2007; Komeima K. et al., 2006). También se observó como la inyección de vitamina E y el ácido lipoico reducía la muerte de los conos al prevenir el daño oxidativo tras la muerte de los bastones (Komeima K. et al., 2006). En diversos ensayos clínicos se ha demostrado como la vitamina A junto con la taurina y la vitamina E mejoraron, o al menos retrasaron, la pérdida visual en pacientes con RP (Berson E.L., 1993; Pasantes-Morales C. et al., 2002). En un estudio in vitro, se observó un aumento de la supervivencia de las células ganglionares de ratas con presión intraocular elevada tras el tratamiento de dichas células con antioxidantes (Ko M.L. et al., 2005).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado como la combinación de antioxidantes como la luteína, la zeaxantina, el ácido lipoico y el glutatión, además de un extracto de Wolfberry desaceleró la degeneración de los fotorreceptores en ratones rd1 (Miranda M., et al., 2010; Sanz M.M., et al., 2007).

### *c) Neuroesteroides*

El término "neuroesteroide" fue acuñado por Etienne Baulieu en la década de los 80 y hace referencia a una subclase de esteroides que pueden sintetizarse en el SNC de novo a partir del colesterol (Baulieu E.E., 1981; Mayo W., 2003). Estos neuroesteroides son unos potentes y eficaces moduladores de los dos sistemas de neurotransmisores principales que rigen la actividad del SNC: el glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio, y el ácido gamma aminobutírico (Gamma aminobutyric acid, GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio (Baulieu E.E., 1981, 1997).

En cambio, el término 'esteroide neuroactivo' se refiere a esteroides que, independientemente de su origen, son capaces de modificar actividades neurales (Dubrovsky B.O., 2005). Este término, que se utiliza regularmente en sentido más general, se propuso para todos los esteroides sintéticos y naturales que pudieran alterar rápidamente la excitabilidad de las neuronas mediante su unión al receptor de membrana de la misma manera cómo actúan los neurotransmisores excitadores o inhibidores (Paul S.M. & Purdy R.H, 1992; Martín-García E. et al., 2007).

Según sus diferencias en la actividad y estructura, los neuroesteroides pueden clasificarse en:

- Neuroesteroides inhibitorios: Ejercen acciones inhibitorias sobre la neurotransmisión. Actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor GABA, como son: Pregnanos, 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona (5 $\alpha$ -DHP), alopregnanolona (Allop, 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP), pregnanolona (3 $\alpha$ , 5 $\beta$ -THP) androsterona.... (Reddy D.S., 2009).
- Neuroesteroides excitatorios: Tienen efectos excitatorios sobre la neurotransmisión. Actúan como moduladores alostéricos negativos de los receptores GABA A, y también como moduladores alostéricos positivos del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), y/o agonistas de la  $\sigma$  1 receptor. Dentro de estos se encuentran: sulfato de pregnenolona (PS), dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de hidroepiandrosterona (DHEA-S), pregnanos, feromonas etc... (Christopher H. et al., 2009; Monti-Bloch L. et al., 1994; Liebowitz T. et al., 2014; Reddy R.S., 2010).

- Otros neuroesteroides: Engloba a otros esteroides endógenos, como la pregnenolona, (Marx C.E. et al., 2011), la progesterona (Baulieu E.E. & Schumacher M., 2000; Thomas P. & Pang Y., 2012), el estradiol (17- $\beta$ -Estradiol) (Srivastava A., et al., 2011). Estos neuroesteroides a diferencia de los anteriores no modulan la actividad de GABA A o los receptores de NMDA, sino que afectan a otros receptores de la superficie celular y objetivos no genómicos.

Durante la última década, cada vez existe más evidencias del papel neuroprotector que ejercen los neuroesteroides, tales como dehidroepiandrosterona, progesterona, testosterona y 17- $\beta$ -estradiol (Schumacher M., et al., 2000; Garcia-Segura L.M. et al., 2001; Stein D.G., 2001; Wise L.A. et al., 2001; McEwen B., 2002), en las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (Brinton R.D. & Wang J.M., 2006; Patchev V.K. et al., 1997).

La retina expresa diferentes enzimas necesarias para la conversión del colesterol en las diferentes hormonas esteroideas. Todas estas enzimas están presentes en la retina en cantidades bajas en comparación con las de las glándulas periféricas (testículos y glándulas suprarrenales), pero estos niveles son similares a los exhibidos por otras estructuras del SNC (Mellon S.H., 2011).

La síntesis de *novoo* de todas las hormonas esteroideas comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona por la enzima CYP11A1. Esta enzima, provoca la escisión de la cadena lateral del colesterol y cataliza la conversión de este, un compuesto C27, en la pregnenolona, el primer esteroide C21. La pregnenolona y progesterona son las moléculas de partida para los tres grupos de esteroides: los glucocorticoides y los mineralocorticoides, C21; los andrógenos, C19; y los estrógenos, C18 (Figura 16).

Una vez sintetizada la pregnenolona, ésta puede tomar dos rutas protagonizadas por enzimas diferentes: 1) La 3 $\beta$ hsd (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa), que la convierte en progesterona. 2) La 17 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP17A1), que la convierte en 17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona (DHEA). La mayor parte de la progesterona sintetizada pasa a la sangre; una pequeña parte es oxidada en C17 para convertirse en andrógenos y estrógenos.

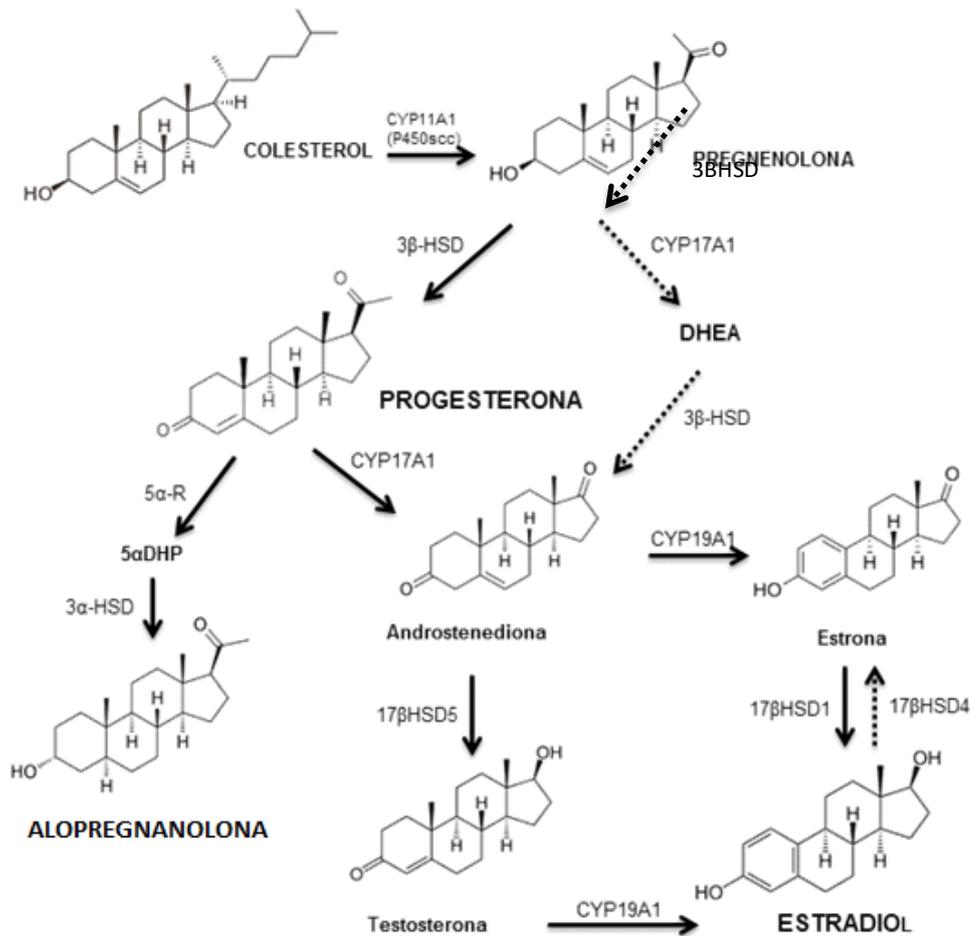
La pregnenolona se convierte en progesterona por dos actividades de una sola enzima, la 3 $\beta$ HSD: primero, se produce la oxidación del grupo hidroxilo en posición C3 de la pregnenolona; y, segundo, como consecuencia de la oxidación, se lleva a cabo la isomerización del doble enlace (Orizaba-Chávez B. et al., 2013).

La progesterona es convertida en metabolitos andrógenos, y luego en estrógenos (Guarneri P. et al., 1994; Guarneri P. 1996; Cascio C. 2007) por la acción de las aromatasas. Es rápidamente metabolizada en el cerebro a 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona (DHP) por la acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ R) y mas tarde tras la acción de la enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\alpha$ -HSD) es reducida a alopregnonolona (Guarneri P. et al., 1998; Mellon S.H. & Vaudry H., 2001; Stoffel-Wagner B., 2001; Belelli D. & Lambert J.J., 2005; Rone M.B. et al., 2009; Gunn B.G. et al., 2011; Wirth M. et al., 2011).

La testosterona se metaboliza a estradiol por la enzima aromatasa, o para la dihidrotestosterona (DHT) por la enzima reductasa 5- $\alpha$  (Arévalo M.A. et al., 2015). El estradiol, la progesterona y la testosterona son factores locales que ejercen acciones autocrina o paracrina en el tejido nervioso, que regulan la función de las neuronas y células gliales. Los niveles locales de estradiol, progesterona y testosterona en el cerebro dependen, no sólo de sus niveles periféricos, sino también de su síntesis local y su metabolismo (Caruso D. et al., 2013; Caruso D. et al., 2010).

La ruta de síntesis del 17- $\beta$ -estradiol al igual que la de los otros esteroides sexuales, parte del colesterol, y que tras varias reacciones se convierte en androstenediona. Este andrógeno es convertido en testosterona, que a través de una aromatización se transforma en 17- $\beta$ -estradiol. Alternativamente, la androstenediona puede ser aromatizada a estrona, que posteriormente es convertida en estradiol. La aromatasa (estradiol sintetasa, 17  $\beta$ HSD) es la enzima que cataliza dichas aromatizaciones y sintetiza diversos estrógenos utilizando como sustrato distintos andrógenos. Así, es capaz de metabolizar la testosterona en estradiol, la androstenediona en estrona y la dehidroepiandrosterona en estradiol (Casio C. et al., 2015; Simpson E.R et al., 1994).

En estas dos últimas décadas, el uso potencial de la terapia de hormonas sexuales en el tratamiento de varias enfermedades neurológicas y oculares, especialmente las enfermedades relacionadas con la edad, ha estimulado el interés de los investigadores (Cascio C. et al., 2015).



**Figura 16.- Metabolismo de la progesterona y sus derivados en la retina.** En la retina de los mamíferos, la progesterona, es sintetizada a partir de la pregnenolona, que a su vez deriva del colesterol. La progesterona es a su vez el precursor de la alopregnanolona, y la androstenediona. La androstenediona es convertida en testosterona y estrona que por acción de las aromatasas dará lugar a al 17-β-estradiol.

El interés de estos esteroides surge de su actividad potencial como anticonvulsivo, anestésica, agentes ansiolíticos o sedantes-hipnóticos útiles para el tratamiento de varios trastornos neurológicos y psiquiátricos (Akk G. et al., 2007; Gasior M. et al., 1999).

Se están investigando nuevas estrategias neuroprotectoras en el tratamiento y la prevención de las enfermedades retinianas (Vasilaki L., 2009). En términos de enfermedad de la retina, la evidencia confirma que la neurosterogénesis se produce en la retina, en particular la producción de *novo* de pregnenolona, el precursor para la síntesis de progesterona y todos los demás esteroides (Guarneri P. et al., 1994; Guarneri P. et al., 2003; Cascio C. et al., 2007).

La administración intravítrea del neuroesteroide dehidroepiandrosterona en un modelo *in vivo* de ratón, redujo el daño retiniano inducido por el aminoácido excitador ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), proporcionando así neuroprotección a la retina (Kokona et al., 2012). Por otra parte, la administración de 17- $\beta$ -estradiol también se ha visto que ejerce efectos protectores contra el daño isquémico generado en la retina de rata (Nonaka D. et al., 2000; Kaja S. et al., 2003). En este sentido, diferentes resultados muestran como el 17- $\beta$ -estradiol y el sulfato dehidroepiandrosterona pueden mejorar el estado metabólico de las neuronas y las células gliales después de la lesión isquémica (Bucolo C. & Drago F., 2004).

Varias líneas de evidencia han demostrado que el estrógeno humano más potente, es el 17- $\beta$ -estradiol (Guo L. et al., 2012; Spence R.D. & Voskuhl R.R., 2012). Como tal, el 17- $\beta$ -estradiol es capaz de proteger a las neuronas a través de una variedad de mecanismos; por ejemplo, al interferir con las cascadas de señalización de la muerte celular, la alteración de los niveles de neurotransmisores, eliminar los radicales libres, la promoción de la plasticidad sináptica, etc... (Prokai-Tatrai K. et al., 2013).

El 17- $\beta$ -estradiol proporciona una amplia neuroprotección en estructuras oculares (Biggsby R.M. et al., 1999; Nonaka A. et al., 2000; Yu X. et al., 2004). Estos resultados no son sorprendentes teniendo en cuenta que los receptores de estrógeno (ER  $\alpha$  y  $\beta$ ) se expresan abundantemente en todo el ojo, y en particular en la retina (Wickham L.A., et al., 2000; Kobayashi K. et al., 1998). En modelos animales con diversas enfermedades de la retina, tratamientos con 17- $\beta$ -estradiol, han demostrado protección de las células ganglionares de la retina (CGR), de las células fotorreceptoras, del nervio óptico y del epitelio pigmentario de la retina.

La administración de norgestrel (derivado sintético de la testosterona) en dos modelos de ratón diferentes con RP (degeneración inducida por la luz y ratones rd10) da lugar a una disminución de la apoptosis celular de los fotorreceptores, indicando un rescate parcial de las células de la retina, mejora el ERG y proponen que en su mecanismo neuroprotector se implica el factor de crecimiento bFGF y quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (Erk1/2), ya que se han observado aumentos en su expresión y activación. Con todo ello, concluyen que norgestrel conserva significativamente tanto el número de células de fotorreceptores como su morfología (Doonan F. et al., 2011).

## c. 1.- Progesterona

La progesterona, puede ser metabolizada en el cerebro en metabolitos neuroactivos que incluyen 5 $\alpha$ - dihidroprogesterona, 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ - tetrahidroprogesterone (alopregnanolona), y 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ - tetrahidroprogesterona (pregnenolona). Estos derivados de la progesterona se denominan colectivamente como tetrahidrocannabinol (THP) (Compagnone N.A. & Mellon S.H., 2000), y son moduladores positivos de los receptores GABA A (Callachan H. et al., 1987; Gee K.W. et al., 1987). Además, estos esteroides neuroactivos (neuroesteroides) (Baulieu E.E., 1998; Compagnone N.A. & Mellon S.H., 2000) también se pueden sintetizar de novo a partir del colesterol en cerebros de roedores. En los seres humanos, los niveles de la progesterona pueden estar correlacionados con la ansiedad y con trastornos en el estado de ánimo debido a los efectos hormonales sobre el SNC (Backstrom T., 1976, 2008; Wihlback A.C. et al., 2006)

Esta hormona, es ampliamente conocida por su papel en la reproducción sexual, pero también muestra propiedades neuroprotectoras en diferentes paradigmas de la lesión cerebral: reduce el edema cerebral, modera la inflamación y preserva las neuronas y células gliales (Guo L. et al., 2006; Cutler S.M. et al., 2007; Stein D.G., 2008, 2011).

La influencia del sistema endocrino en el procesamiento visual fue propuesta originalmente en la década de los 70, cuando se observó que la susceptibilidad de las células de la retina al daño provocado por la luz se produjo de manera concomitante con la maduración sexual tanto en animales machos y hembras (O'Steen W.K. et al., 1974).

En la retina, se ha observado como el contenido de colesterol es mayor que en las mitocondrias suprarrenales y el hígado (Heo G.Y. et al., 2012), siendo compatible con el alto grado de neurosteroidogenesis que se produce en la retina, en particular la producción de novo de pregnenolona, el precursor para la síntesis de progesterona y todos los demás esteroides (Guarneri P. et al., 1994; Guarneri P. et al., 2003; Cascio C. et al., 2007).

La progesterona ejerce efectos protectores en numerosos modelos experimentales que imitan una gran variedad de aspectos patogénicos de la disfunción cerebral, debidos a la edad avanzada o relacionada con las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se ha demostrado que concentraciones fisiológicamente relevantes de progesterona puede atenuar significativamente el estrés oxidativo y/o excitotoxicidad en lesiones resultantes del uso de glutamato (Nilsen J. & Brinton R.D., 2002a, Nilsen J. & Brinton R.D., 2002b, Nilsen J. & Brinton R.D., 2003; Kaur P. et al., 2007), o con supresión de glucosa. (Goodman Y. et al., 1996).

En un modelo de roedor con una lesión en la corteza frontal se vio como los marcadores de la inflamación tales como GFAP y NFkB se encontraban reducidos (Pettus et al., 2005).

La progesterona actúa sobre muchos de los mecanismos implicados en la lesión isquémica en el cerebro, la retina y el nervio óptico. Allen et al., recientemente demostraron cómo la administración de 8 mg/kg progesterona (vía intraperitoneal una hora después de la lesión isquémica en el cerebro y luego por vía subcutánea a las 6, 24 y 48 horas) en un modelo de ratón middle cerebral artery occlusion model (MCAO) que produce daño en la retina y déficits funcionales en conjunción con la isquemia cerebral (O'Steele E.C et al., 2008), proporcionó protección contra la isquemia retiniana (Allen R.S et al., 2015).

En este estudio, la administración de progesterona resultó en la reducción de las alteraciones del electroretinograma (ERG), una reducción de la expresión de GFAP y en la reducción de la muerte de las células ganglionares tras la isquemia retiniana (Allen R.S. et al., 2015). En este sentido, se ha visto como la progesterona ofrece protección a la retina contra la lesión isquemia-reperfusión en ratas mediante el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y disminución del contenido de malondialdehído (MDA) en la retina (Lu Y. et al., 2008).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado como la administración oral de 100 mg/kg de progesterona cada 2 días, a partir del día post natal 7 en ratones rd1, conserva significativamente el número de células fotorreceptoras y se produce una disminución de la muerte celular (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015).

En consonancia con la importancia que se le ha otorgado a lo largo de este trabajo a las combinaciones de las estrategias de neuroprotección, es importante resaltar diferentes estudios que ponen de manifiesto el papel de la progesterona en combinación con otras moléculas, antioxidantes.

En este sentido, Atif F. et al., evaluaron los efectos neuroprotectores de la combinación de la progesterona y 25-dihidroxitamina D (3) (VDH) (antioxidante) en las neuronas corticales primarias *in vitro* (se les sometió a privación de glucosa) (Atif F. et al., 2009) e *in vivo* (ratas con lesión isquémica). Los resultados obtenidos revelan como dicha combinación es capaz de proteger al cerebro del daño isquémico mejor que solo el tratamiento con progesterona (Atif F. et al., 2013).

Este hallazgo pone de manifiesto la eficacia neuroprotectora de la progesterona en combinación y también, como esta podría prevenir la cascada inflamatoria inicial y el edema, y luego gracias a la combinación con VDH estimular los eventos neurotróficos y regenerativos que tienen lugar más tarde en el proceso de reparación (Atif F. et al., 2009; Atif F. et al., 2013).

Recientemente, Tang H. et al., demostraron como la combinación de VDH y progesterona a las 24 horas después de una lesión cerebral traumática en ratas Sprague-Dawley, inducían una reducción significativamente mayor de la neuroinflamación en comparación con la administración de progesterona y VDH por separado (Tang H. et al., 2015).

### ***6.1.2.- Prevención del inicio y la ejecución de los mecanismos de muerte celular en los fotorreceptores.***

Si bien las estrategias convencionales para la neuroprotección, con factores neurotróficos, antioxidantes o neuroesteroides, se basan en el fortalecimiento del metabolismo celular para estar preparadas para resistir los factores de estrés, otros enfoques tienen el objetivo de prevenir la muerte celular.

Como hemos comentado anteriormente en el punto 3.1., el mecanismo por el cual la muerte gradual de los conos va seguida de la muerte de los bastones es hasta ahora desconocido, siendo este un punto clave para resolver los misterios de la RP. Una de las hipótesis que actualmente se está barajando, es el papel que adopta la acumulación de GMPc con la degeneración de los fotorreceptores, (ya que se sabe que es uno de los primeros acontecimientos detectables asociados). De hecho, en fotorreceptores adultos, GMPc es una molécula de señalización clave para la transducción de la luz (Pugh E.N. et al., 1.997).

El GMPc es un importante segundo mensajero el cual, media la acción de varios neurotransmisores y hormonas (Eigenthaler M. et al., 1999) regulando diferentes funciones fisiológicas incluyendo la neurotransmisión o agregación plaquetaria (Vaandrager A.B. et al., 1996). Hay una creciente evidencia de que puede desempeñar un papel importante en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Shimojo T. et al., 1999, Loweth A.C. et al., 1997, Chiche J.D. et al., 1998).

El GMPc es formado a partir de su precursor de guanosina trifosfato (GTP) a través de la actividad de la enzima guanilato ciclasa (GC). Hay dos formas distintas de GC: 1) una forma de partícula (PGC), que se encuentra unido a la membrana a través de un único dominio transmembrana y 2) una forma soluble que contiene hemo-guanilato ciclasa soluble (GCS) que se encuentra libre en el citosol (Rehmann H. et al., 2007).

El nivel intracelular de GMPc se regula a través de un equilibrio dinámico entre su tasa de síntesis por guanidil ciclasas (GCs) y la degradación por las fosfodiesterasas específicas (PDEs) (Stacey P. et al., 1998; Delyfer M.N. et al., 2004). Se sabe que el GMPc tiene varias dianas intracelulares: 1) se puede unir a fosfodiesterasas específicas (PDEs), estimulando así o inhibir sus actividades (Smolenski A. et al., 1998); 2) puede unirse y activar los canales iónicos CNG (cyclic nucleotide gated); 3) puede unirse y activar la proteína quinasa G (PKG) (Rehmann H. et al., 2007); y, bajo ciertas condiciones, puede unirse a y activar la proteína quinasa A (PKA) (Lincoln T.M. et al., 1993; Deguchi A. et al., 2004). Los niveles intracelulares de GMPc están controlados principalmente por la degradación a través de enzimas PDE, y se cree que no sólo es importante para mantener bajos los niveles de GMPc en reposo, sino también es importante controlar la amplitud y la duración de una señal de GMPc (Rehmann H. et al., 2007; Omori K. & Kotera J., 2002). La superfamilia PDE se compone de once familias de proteínas individuales y veintinueve genes distintos (Rehmann H. et al., 2007).

Muchas de las distrofias retinianas que se conocen como algunos tipos de RP (Bowes C. et al., 1990; McLaughlin M.E. et al., 1993), distrofia progresiva de los conos (Thiadens A.A. et al., 2009), distrofia de conos y bastones (Buch P.A. et al., 2011; Sokal I. et al., 2005; Tucker C.L. et al., 1999), la amaurosis congénita de Leber (Perrault I. et al., 2000, 1996)..., son debidas a la producción anormalmente alta de GMPc, debido a mutaciones en los genes implicados en la síntesis de GMPc (RetGCs y GCAPs) o la degradación de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa-6 (PDE6) (Dizhoor A.M., 2000; Piri N. et al., 2005; Hunt R.C. et al., 2010).

El metabolismo del GMPc está alterado en varios modelos animales de RP. La elevación drástica de GMPc se produce en las retinas de ratones en los que hay una mutación en el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa-6 (PDE6), como ocurre por ejemplo en los ratones rd1. (Bowes C. et al., 1990). La muerte de los bastones en este modelo de ratón se cree que se asocia con la apertura masiva de los canales de GNC y aumento subsecuente en los niveles de intracelulares de calcio (Frasson M. et al., 1999; Paquet-Durand F. et al., 2011), curiosamente también hay acumulación de GMPc en otros modelos animales que se caracterizan por mutaciones en otros genes (Mendes H.F. et al., 2005; Michalakis S. et al., 2010; Ramamurthy V. et al., 2004).

Estudios recientes ponen de manifiesto como la acumulación de GMPc induce estrés oxidativo y que probablemente induce la activación microglial, que a su vez se regula por el incremento de TNF- $\alpha$  para contribuir a la muerte celular. Por otra parte, la acumulación de GMPc conduce a la entrada de calcio y la activación de la calpaína. La inhibición de la PDE6 activa más de una

vía de apoptosis (caspasa-dependiente y caspasa-independiente) (Martínez-Fernández de la Cámara C. et al., 2013) como ocurre en otros modelos experimentales de la degeneración de la retina (Gómez V. et al., 2005; Kaur J. et al., 2011).

En los fotorreceptores, el GMPc tiene dos dianas típicas: los canales iónicos CNG (Hüttl S. et al., 2005), que permiten el flujo de calcio, y la proteína quinasa dependiente de GMPc (la proteína quinasa G o PKG) (Hofmann F. et al., 2009).

## **7.- MODELOS EXPERIMENTALES DE RETINOSIS PIGMENTARIA**

Existen varios modelos de animales para estudiar la RP, como son cerdos transgénicos (Ross J.W. et al., 2012), perros (Suber M.L. et al., 1993; Tuntivanich N. et al., 2009), gatos (May C.A. et al., 2005)..., pero los modelos animales más utilizados por su facilidad de mantenimiento y coste para estudiar los mecanismos que tienen lugar en la aparición y desarrollo de la RP son: las ratas (RCS, p23H...) y los ratones, en concreto los modelos de ratón rd ("retinal degeneration"): rd1 y rd10.

Durante más de 30 años, la retina de roedores ha proporcionado una valiosa herramienta para estudiar la dinámica y los mecanismos de la RP heredada, puesto que se demuestra que los fotorreceptores de ratón experimentan distrofias causadas por mutaciones espontáneas en el ADN, y estas están estrechamente relacionadas con las distrofias que se generan en la retina de los humanos (Gargini C. et al., 2007). La similitud entre especies se traduce en numerosas enfermedades homólogas que pueden ser investigadas en animales y dar soluciones para los humanos. En este aspecto, el ratón es un buen ejemplo, ya que comparte el 99% del ADN con el ser humano.

De hecho, existe una mutación en ratón que da lugar a una enfermedad degenerativa de la retina que es exactamente homóloga a la RP humana (McLaughlin M.E. et al., 1993, 1995). Se trata de la mutación ampliamente estudiada como mutación rd (rod degeneration) (Keeler C.E., 1966; Pittler S.J. et al., 1993). En concreto, los ratones homocigotos para la mutación rd tienen una degeneración de los bastones debida una mutación nonsense en el exón 7 del gen Pde6b que codifica para la subunidad  $\beta$  del complejo GMPc-PDE. Se ha descrito que la degeneración de los bastones en estos modelos animales va seguida de una degeneración de conos, aunque la razón de ésta es aun incomprendida (Provencio L. et al., 1998b). El resto de la retina parece conservar el número de células, aunque sufre grandes remodelaciones internas (Marc R.E. et al., 2003). La degeneración retiniana en los ratones rd es fácilmente evidenciable por técnicas estructurales o funcionales.

### 7.1.- Retinal degeneration 1

El ratón rd1 es el modelo murino más estudiado de degeneración de la retina (Farber D.B., 1995; Fletcher E.L. et al., 2011).

El ratón rd1 fue descrito por vez primera por Keeler C.E. en 1924 (Keeler C.E., 1924). Estos ratones sufren una mutación en la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa-6 (PDE6) de los bastones lo que provoca la no expresión de la proteína (Bowes C. et al., 1990, Yan Y. et al., 1998) y la acumulación de GMPc (Faber R. & Lolley S. 1974).

En el ratón rd1, la degeneración de los bastones comienza aproximadamente a día post-natal 10 (PN10) con la pérdida progresiva de la capa nuclear externa y quinesis celular evidente (Acosta M.L. et al, 2005; Carter-Dawson L.D. et al., 1978; Farber R. et al., 1994; Gibson R. et al., 2013; Greferath U. et al., 2015). En la segunda semana (dentro de los primeros 15-20 días de vida post-natal), comienza la pérdida de la mayoría de los fotorreceptores y los conos degeneran de manera mas evidente (Farber R. et al., 1994). En la etapa final, la retina de ratón rd1 se observa una degeneración casi completa de la capa nuclear externa (Farber R. & Lolley S., 1974; Bowes C. et al., 1990; Chang S. et al., 2002; Jones B.W. et al., 2003).

A pesar de la rápida degeneración de los fotorreceptores en este modelo de ratón, ha sido ampliamente usado para estudiar los mecanismos de degeneración de la retina subyacente (Doonan F. et al., 2003; Hart A.W. et al., 2005).

En la retina de los ratones rd1, los árboles dendríticos y los terminales axónicos de las células bipolares de los bastones se desarrollan de manera anormal (Strettoi E. & Pignatelli V., 2000; Strettoi E. et al., 2002; 2003). Además, se ha comprobado que el número de células bipolares disminuye notablemente (Strettoi E. & Pignatelli V., 2000). Por su parte, las dendritas de las células bipolares de los conos sufren un proceso de retracción progresiva, mientras que sus plexos en la capa plexiforme externa se vuelven cada vez más discontinuos (Strettoi E. et al., 2003).

En cuanto a las células gliales, sólo se ha descrito el incremento de inmunorreactividad a GFAP por parte de las células de Müller (Strettoi E. et al., 2003). En electrorretinograma, las principales diferencias observadas consisten en una reducción general de la amplitud asociada a cambios en la forma de las ondas (Strettoi E. et al., 2003).

El modelo de ratón rd1 se ha utilizado para probar enfoques terapéuticos que pueden inhibir el proceso de la apoptosis de los fotorreceptores y la degeneración de los mismos (Frasson M. et al, 1999a, b; Takano Y. et al, 2004; Komeima K. et al, 2006; MaLaren R.E. et al, 2006).



# HIPÓTESIS



Aunque las mutaciones genéticas son las responsables de la muerte progresiva de los fotorreceptores en la retinosis pigmentaria, la aparición de nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan las vías de supervivencia de los fotorreceptores o prevengan del inicio de los mecanismos de la muerte celular en los mismos, mediante el uso de antioxidantes, neuroesteroides y/u otros fármacos, está adquiriendo hoy en día mayor protagonismo.

Conocidos todos estos antecedentes, las hipótesis que se proponen son:

**Hipótesis 1.** El uso del ácido lipoico y la progesterona aplicados como tratamiento preventivo frente a la degeneración retiniana, es capaz de disminuir el estrés oxidativo y como consecuencia, aumentar la supervivencia de los fotorreceptores.

**Hipótesis 2.** La terapia combinada del ácido lipoico y progesterona puede fortalecer las vías de supervivencia ofreciendo mejores resultados y más beneficiosos que cada una de ellas por separado.



# **OBJETIVOS**



Por todo ello en este proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Estudiar el posible efecto terapéutico de la administración oral de ácido lipoico, progesterona y su combinación, en la retina de un modelo animal de retinosis pigmentaria, el ratón rd1, y sus correspondientes controles.

1.1.- Evaluar *in vivo* los efectos de la administración de un tratamiento con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ambas, mediante la utilización de la técnica TUNEL para la determinación de la muerte celular de los fotorreceptores.

1.2.- Estudiar *in vivo* el posible efecto antiinflamatorio del ácido lipoico, la progesterona y su combinación, mediante la determinación de la expresión de proteína fibrilar ácida en los animales control y rd1 con y sin tratamiento.

1.3.- Analizar *in vivo* el efecto del ácido lipoico y/o la progesterona en la retina de ratones control y rd1 a día post-natal 11, sobre la actividad de la enzima glutamato cisteína ligasa, en concreto de la actividad de su unidad catalítica.

2.- Estudiar *in vitro* el posible efecto protector del ácido lipoico y de la progesterona ante un daño oxidativo inducido en células ARPE-19.

2.1. Determinar la dosis óptima de peróxido de hidrógeno, que se utilizará para inducir un estrés oxidativo en un cultivo de células ARPE-19.

2.2 Estudiar el posible efecto tóxico del ácido lipoico y la progesterona sobre las células ARPE-19.

2.3. Evaluar el efecto del tratamiento preventivo de diferentes concentraciones de ácido lipoico y de progesterona ante un daño oxidativo inducido con peróxido de hidrogeno en células ARPE-19.

2.4. Evaluar el papel protector del ácido lipoico y la progesterona ante la inducción de un daño oxidativo en un cultivo de células ARPE-19, cuando el daño oxidativo se induce al mismo tiempo que la aplicación de ácido lipoico o progesterona.

3.- Determinar la capacidad antioxidante total del ácido lipoico y la progesterona, así como la de sus metabolitos más importantes (ácido dihidrolipoico; alopregnenola y estradiol respectivamente) mediante la medición de la absorbancia del cromóforo CUPRAC.

4.- Evaluar mediante topología molecular el poder antioxidante de cada una de las moléculas de estudio, el ácido lipoico y la progesterona, comparándolas con sus metabolitos, ácido dihidrolipoico; alopregnenola y estradiol respectivamente, basándose en una función discriminante que permite evaluar la actividad antioxidante de una molécula, teniendo en cuenta únicamente su estructura molecular.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- EXPERIMENTOS *IN VIVO***

### **1.1.- Tratamiento y manejo de los animales de experimentación**

La especie de experimentación empleada en el presente trabajo ha sido el ratón (*Mus musculus*, L.). En concreto, hemos empleado la línea de ratones rd1/rd1, los cuales poseen una mutación en el gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la fosforiesterasa 6 (PDE6 $\beta$ ) (Farber D.B. et al., 1994) y los ratones C3H (wild type, wt).

Los ratones que se han empleado para el desarrollo de este trabajo, han sido una donación del Dr. Theo Van Veen, de la Universidad de Lund (Suecia).

#### **1.1.1.- Condiciones de estabulación**

La estabulación se realizó en las instalaciones de la unidad de investigación del departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 horas en luz y de 20:00 a 08:00 horas en oscuridad. Durante su estabulación, los animales tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan Ibérica S.L. (Barcelona, España).

#### **1.1.2.- Manejo de los animales**

La manipulación y cuidado de los animales fue aprobada por el comité ético de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (referencia 11/013) y de acuerdo con la “Declaración para el uso de los animales en investigación oftalmológica y de la visión”, elaborado por la asociación para la investigación en oftalmología y la visión (ARVO; Association for research in vision and ophthalmology).

Se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. El número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales, se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora y que, por otra parte no influyera en las variables consideradas en cada experimento, siguiendo así la regla de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento. La regla de las 3R tiene como objetivo reducir el impacto de las actividades científicas en el bienestar de los animales (Russell W.M & Burch R.L., 1959).

De forma general, estudios previos han detectado que la degeneración de los bastones en la retina de los ratones rd1 se produce de forma drástica a partir del día post-natal 11 durante la morfogénesis de los fotorreceptores. Se ha observado como en estos ratones a día post-natal 21 los bastones están totalmente degenerados, al contrario que en los ratones control en los que a día post-natal 21 se produce el desarrollo completo de la morfología de los fotorreceptores en la retina (LaVail M.M. & Sidman R.L., 1974; Hauck S.M. et al., 2006; Paquet-Durand F. et al., 2006; Assaf F. et al., 2015).

Por lo tanto, la mayoría de las comparaciones en este estudio entre estos animales se llevaron a cabo a día post-natal 11 (PN11). El día del nacimiento fue considerado como día post-natal 0 (PN0), las crías fueron sacrificadas por decapitación para los ensayos en el día post-natal 11 (PN11).

## **1.2.- Diseño experimental**

### ***1.2.1.- Evaluación del papel neuroprotector del ácido lipoico, progesterona en la retina de ratones control y ratones rd1***

Para la evaluación del poder protector de los diferentes compuestos objeto de estudio, se realizó un total de 4 experimentos teniendo como base la administración por separado de ácido lipoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y de progesterona (Sigma-Aldrich, Madrid, España), así como su administración conjunta, en ratones control y rd1. La finalidad de dichos experimentos fue la de estudiar el efecto de estas moléculas sobre la muerte de los fotorreceptores y el daño oxidativo. Los grupos establecidos fueron los siguientes:

**Grupo 1:** ratones control y rd1 sin tratamiento: Estos ratones no fueron sometidos a ningún tratamiento con el fin de ser usados como control, sin embargo se les administró una dosis correspondiente de aceite de oliva vía oral en días alternos, siendo el primer día de tratamiento el día post-natal 7. Los ratones control y rd1 fueron sacrificados a día post-natal 11. A su vez, los animales se distribuyeron de diferente manera según el estudio a realizar: para el estudio de muerte celular (TUNEL) se utilizó un tamaño muestral (n) n=6. Además, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP (n=4) y GCLC (n=3) también a día post-natal 11

**Grupo 2:** ratones control y rd1 tratados con ácido lipoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España): A los ratones rd1 y control se les administró por vía oral una dosis de 100 mg de ácido lipoico/kg peso, diluida en aceite de oliva. El tratamiento se administró en días alternos, siendo el primer día de tratamiento el día post-natal 7. Los ratones control y rd1 fueron sacrificados el día post-

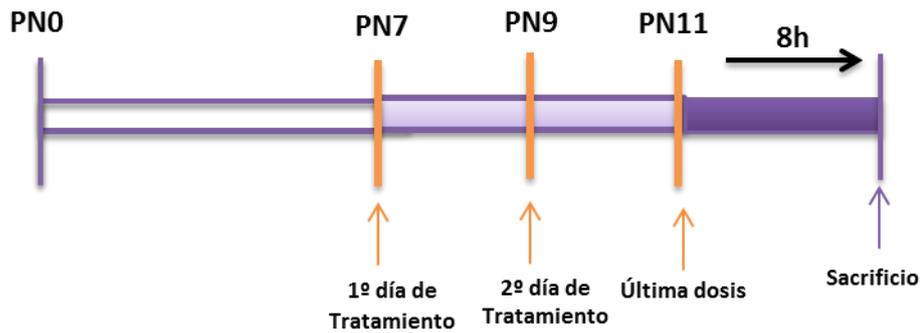
natal 11. Como en el grupo anterior los animales se distribuyeron según el estudio a realizar: para el estudio de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=6. Asimismo, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP (n=3) y GCLC (n=3) también a día post-natal 11.

**Grupo 3:** ratones control y rd1 tratados con progesterona: Se administró oralmente una dosis de progesterona (Sigma-Aldrich, Madrid, España) de 100 mg/kg peso diluida en aceite de oliva, a ratones control y rd1. El tratamiento se dio en días alternos, siendo el primer día de tratamiento el día post-natal 7, los ratones fueron sacrificados el día post-natal 11. Como en el grupo anterior los animales se distribuyeron según el estudio a realizar: para el estudio de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=6. En este grupo como en los anteriores también se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP (n=3) y GCLC (n=3) también a día post-natal 11.

**Grupo 4:** ratones control y rd1 tratados con ácido lipoico y progesterona: Se administró oralmente una dosis combinada de ácido lipoico 100 mg/kg y de progesterona 100 mg/kg diluida en aceite de oliva, a ratones rd1 y control. El tratamiento se dio en días alternos, siendo el primer día de tratamiento el día post-natal 7, los ratones fueron sacrificados el día post-natal 11. Como en el grupo anterior los animales se distribuyeron según el estudio a realizar: para el estudio de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=6. Además, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP (n=3) y GCLC (n=3) también a día post-natal 11.

#### ***1.2.2.- Tratamiento con ácido lipoico, progesterona y tratamiento combinado de ácido lipoico y progesterona***

El día del nacimiento fue considerado el día post-natal 0 (PN0). De este modo, se eligió el día post-natal 7 como el día de inicio para el tratamiento con ácido lipoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España), con progesterona (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con la combinación de ambos. El tratamiento fue suministrado por vía oral, tanto a los ratones control como a los rd1, a una dosis establecida de 100 mg/kg diluida en aceite de oliva. Esta misma dosis fue suministrada en los días posteriores, día post-natal 7, día post-natal 9 y a día post-natal 11, siendo el día post-natal 11 el último día de tratamiento, y procediéndose al sacrificio de los ratones al menos 8 horas después de la administración de la última dosis del tratamiento (Figura 17).



**Figura 17.-** Diseño experimental para el tratamiento con ácido lipoico, progesterona y/o la combinación de ambos, de los ratones control y rd1. Se indican con flechas los días a los que se da el tratamiento a los ratones, la última dosis de estos y el día de sacrificio de los animales.

### 1.3.- Obtención y procesado de muestras

Al final de cada experimento, los animales a día post-natal 11 fueron sacrificados mediante dislocación cervical. En función del tipo de determinación que se fuera a realizar las muestras se obtuvieron y se procesaron de formas diferentes.

#### 1.3.1.- Estudios inmunohistoquímicos

Los globos oculares fueron fijados, crioprottegidos y crioseccionados. Para ello, se realizó la extracción de los globos oculares a día post-natal 11 y se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% durante 2 horas, después se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino a 0,1 M pH 7,2 (phosphate buffer saline, PBS) durante 10 minutos cada lavado, y finalmente se crioprotgieron usando PBS-sacarosa en concentraciones crecientes de sacarosa (10-20-30%) a 4 °C.

Se realizaron secciones de 8  $\mu$ m en un criostato Leica CM 1850 UV Ag protect (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España), sobre portas Menzel-Gläser superfrost <sup>®</sup>plus (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

## 1.4.- Procedimientos y técnicas

### 1.4.1.- Detección mediante la técnica de marcaje con la técnica TUNEL

#### - Fundamento del método

Durante el proceso de apoptosis, en la célula sucede una fragmentación del ADN de doble hebra por parte de una endonucleasa interna. Como derivados de esta fragmentación aparecen fragmentos de ADN de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) así como roturas en la cadena sencilla de ADN que da lugar a fragmentos de ADN de alto peso molecular. Estas últimas, se pueden detectar gracias a la existencia del extremo 3'-OH terminal que queda libre y se puede marcar con nucleótidos modificados, todo ello sucede gracias a la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal, dicha enzima cataliza la polimerización de los nucleótidos marcados con fluoresceína que se unen a los extremos 3'-OH libres.

Aunque en un primer momento se creía que la técnica de TUNEL detectaba solo apoptosis (Gavrieli Y. et al., 1992), posteriormente se ha demostrado que también marca diversos tipos de muerte celular como la necrosis (Grasl-Kraupp B. et al., 1995).

#### - Soluciones y reactivos empleados:

- Tampón fosfato salino (Phosphate buffer saline) PBS 0,01 M pH 7, 2.
- PBS con seroalbúmina bovina al 1% (BSA; bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con Tritón<sup>TM</sup> X-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Solución de bloqueo: suero de cabra diluido al 5% (NGS; normal goat serum (Laboratorios Vector, Burlingame, EEUU) en PBS-BSA 1%-Tritón 0,3%.
- Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 4',6-diamidino-2phenylindole) (Laboratorio Vector, Burlingame, EEUU)

#### - Procedimiento experimental:

Primero se aatemperan los cortes a temperatura ambiente durante 15 minutos.

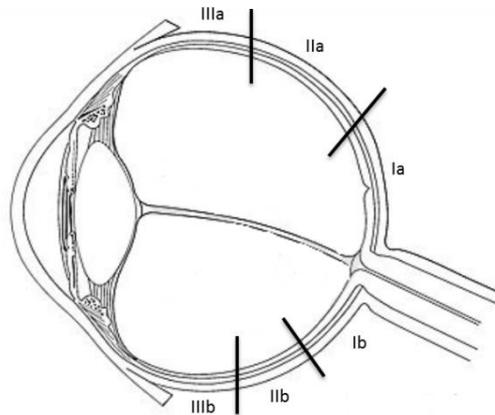
Tras esto, se rehidratan 3 veces durante 5 minutos por lavado con PBS 0,01 M PH 7,2. El bloqueo de uniones inespecíficas se realiza con la solución de bloqueo durante 1 hora. A continuación, se lavan los cortes 3 veces con PBS 0,01 M pH 7,2 durante 5 minutos por lavado, y posteriormente, se incuban con la solución TUNEL, la cual es una técnica de marcaje con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP (terminal

deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling, TUNEL), durante 1 hora a 37 °C (en estufa) y en oscuridad. Finalmente, tras 3 lavados de 5 minutos con PBS 0,01 M pH 7,2 se montan los cortes con medio de montaje Vectashield con DAPI para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

- Contaje celular al microscopio:

Para analizar el marcaje de células TUNEL positivas en los cortes de retina, se tomaron imágenes con la cámara Nikon DS-Fi1 unida a un microscopio Leica DM 2000, con el programa Leica application Suite versión 2.7.0 R1 (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España).

Para el estudio de la pérdida de los fotorreceptores, a lo largo del tiempo y entre diferentes tratamientos, se requiere de la observación y contaje del número de células TUNEL positivas en cada una de las zonas de la retina en al menos tres cortes de ojo por animal. Por ello, debido a que la desaparición de los fotorreceptores tiene lugar de manera distinta en función de la zona de la retina, para los contajes, esta se dividió en 6 secciones (Figura 18): 2 secciones centrales (I a y b) correspondientes a las zonas anejas al nervio óptico, 2 periferias centrales (II a y b) y 2 periferias lejanas (III a y b). El contaje se realizó manualmente a un aumento de 20 X. Las imágenes se procesaron con el programa informático Adobe Photoshop CS5.



**Figura 18.- Representación gráfica de las zonas de contaje para el estudio del número de filas de fotorreceptores.** Secciones: I a y b: zona centro; II a y b: periferia central; III a y b: periferia lejana.

Las células TUNEL positivas se contaron manualmente en la capa nuclear externa de las zonas de la retina ya descritas anteriormente; zonas centrales de la retina, periferias centrales y periferias lejanas. Se contaron las células TUNEL positivas de 3 cortes de retina por animal de cada grupo. Los contajes se realizaron a aumento de 20 X y el número de células se refirió al área de la capa nuclear externa en que se había realizado el contaje.

### **1.4.2.- Detecciones por inmunofluorescencia**

#### - Fundamento del método:

Esta técnica se basa en la detección de proteínas o péptidos, gracias a la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Tras el bloqueo de las posibles uniones inespecíficas en el tejido, se emplea un anticuerpo primario que se une a la diana proteica de interés, posteriormente se añade el anticuerpo secundario que reconocerá específicamente al anticuerpo primario. A su vez, el anticuerpo secundario lleva unido un fluoróforo que emite fluorescencia a una longitud de onda específica y que será detectado por el microscopio de fluorescencia.

#### - Soluciones y reactivos empleados:

- Tampón fosfato salino PBS 0,01 M pH 7,2.
- PBS con seroalbúmina bovina al 1% (BSA; bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con Tritón<sup>TM</sup> X-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Solución de bloqueo: suero de cabra diluido al 5% (NGS; normal goat serum) (Laboratorios Vector, Burlingame, EEUU.) en PBS-BSA 1%-Tritón 0,3%.
- Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole) (Laboratorios Vector, Burlingame, EE.UU).

#### - Procedimiento experimental:

Primero, se atemperan los cortes a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Seguidamente, se rehidratan 3 veces durante 10 minutos por lavado, con PBS-BSA 1%-Tritón 0,3%. El bloqueo de uniones inespecíficas se realiza con la solución de bloqueo durante 1 hora y se procede a la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 2), diluido en solución de bloqueo, la incubación tiene lugar durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se lavan los cortes 3 veces con PBS 0,01 M pH 7,2 durante 10 minutos por cada lavado, posteriormente, se incuba con el anticuerpo secundario diluido en PBS 0,01 M pH 7,2 durante 1 hora en oscuridad. Finalmente, tras 3 lavados de 10 minutos con PBS 0,01 M pH 7,2 se montan los cortes con medio de montaje Vectashield con DAPI para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

	Anticuerpo	Nombre	Descripción	Dilución	Casa comercial	Referencia
PRIMARIO	GFAP	Proteína acida fibrilar glial	Policlonal de conejo	1:500	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca	Z0334
	GCLC	Glutamato cisteínaligasa catalítica	Policlonal de conejo	1:200	Abcam, Cambridge, Inglaterra	ab53179
SECUNDARIO	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Cabra anticonejo IgG (H+L)	Policlonal de cabra	1:200	Invitrogen, Life technologies, Madrid, España	A11008

**Tabla 2.- Lista de anticuerpos utilizados para técnicas de inmunofluorescencia.** Se detallan su nombre comercial completo, la dilución a la que se ha usado, la descripción de la especie donde se ha producido, la casa comercial y su referencia en el catálogo.

- Contaje celular al microscopio:

Para analizar el marcaje de los anticuerpos en los cortes de retina, se tomaron imágenes con la cámara Nikon DS-Fi1 unida a un microscopio Leica DM 2000, con el programa Leica application Suite versión 2.7.0 R1 (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España).

Se tomaron imágenes representativas de las secciones centrales de la retina, de las periferias centrales así como de las periferias lejanas, todo ello a un aumento de 20 X. Posteriormente, para el análisis de la proteína acida fibrilar glial (GFAP) se midió en toda la retina el porcentaje de área ocupada por el marcaje correspondiente al anticuerpo. Para ello, se realizaron mediciones en 3 retinas por porta, en cada una de las 6 zonas de la retina citadas anteriormente. Para la de detección de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica (GCLC) (Abcam, Cambridge, Inglaterra) al igual que con GFAP, se midió en toda la retina el porcentaje de área ocupada por el marcaje correspondiente al anticuerpo. Para ello, se realizaron mediciones en 3 retinas por porta, pero en este caso solo se analizaron 3 zonas (I a, II a y III a) de la retina. Dichas medidas se realizaron con el programa de procesamiento de imágenes Image J 1.45s.

### 1.5.- Tratamiento estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se ha usado el paquete estadístico SPSS versión 15. Los resultados se muestran como las medias  $\pm$  el error estándar de la media en cada uno de los grupos. Se ha establecido un intervalo de confianza del 95% para el estudio de la significatividad, considerando significativos los datos cuando el p-valor era menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ) para todos los estudios del presente trabajo.

En el estudio de la muerte celular (TUNEL), la expresión de GFAP y de GCLC tras realizar la comprobación de la normalidad con el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la variabilidad de varianzas con la prueba de Levene, realizamos el test ANOVA de una vía con el post-hoc Fisher's LSD test o el de Games-Howell

## 2.- EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### 2.1.- Diseño experimental

#### 2.1.1.- *Inducción de estrés oxidativo a células ARPE-19 mediante peróxido de hidrógeno*

Una vez las células ARPE-19 adquieren la confluencia necesaria para la realización de los experimentos, les sometimos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (Sigma-Aldrich, Poole, UK) (0  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M) con el fin de determinar la viabilidad celular tras la inducción de estrés oxidativo.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue disuelto en agua bidestilada esterilizada (89,8  $\mu$ L de agua bidestilada + 10,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

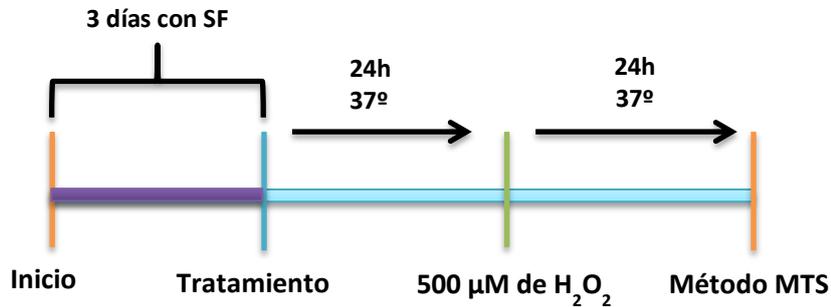
#### 2.1.2.- *Pre-tratamiento y co-incubación de células ARPE-19 con ácido lipoico y progesterona*

Al alcanzar la confluencia necesaria, a las células ARPE-19 se les administración diferentes concentraciones tanto de progesterona como de ácido lipoico. Ambos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Poole, UK) para su administración.

Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos para evaluar el poder protector del ácido lipoico (Sigma-Aldrich, Poole, UK) (n= 4) y de la progesterona (n= 6) (Sigma-Aldrich, Poole, UK):

**1) Pre-tratamiento:** 24 horas antes de la inducción de estrés oxidativo mediante la adición de 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se trató a las células con diferentes concentraciones de progesterona o ácido lipoico. La supervivencia celular se midió 24 horas después de la inducción del estrés oxidativo

mediante el método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) 2H tetrazolio (MTS) (Figura 19)



**Figura 19.- Diseño experimental del método de pre-tratamiento con ácido lipoico o progesterona.** Las células ARPE-19 24h antes de la inducción del daño oxidativo son tratadas con ácido lipoico o progesterona. Tras 24h de incubación de las células con el peróxido de hidrógeno, se mide la viabilidad celular de las mismas mediante el método MTS. SF: serum free; medio sin suero.

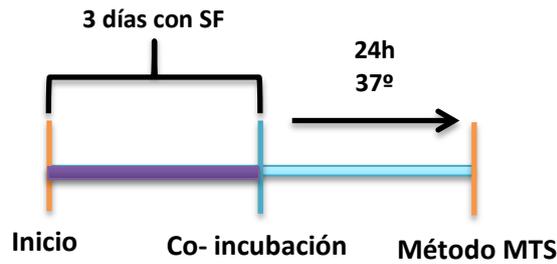
Inicio: Se retira el medio 10% FBS-Pen/Strep-Gln (fetal bovine serum, FBS), suero fetal bovino-penicilina/estreptomicina-glutamina) en el que las células han estado incubadas para crecimiento durante 3 días a 37°C.

Tratamiento: 24 horas después se retira el medio sin suero y se pre-tratan las células con diferentes concentraciones de ácido lipoico (0 μM, 500 μM, 1000 μM y 2000 μM) y progesterona (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM y 100 μM). En cada uno de los pocillos se añadió 150 μL de cada una de las concentraciones de ácido lipoico o progesterona y se dejó incubar durante 24 horas en una estufa a 37°C.

Inducción de estrés oxidativo: Tras 24 horas se retira el tratamiento y se añade 150 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada uno de los pocillos correspondiente. Se incuban durante 24 horas en una estufa a 37°C.

Medida de la viabilidad celular: Tras 24 horas se retira el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se procede a la medida de la viabilidad celular mediante el método MTS.

**2) Co-Incubación:** Para el estudio de la viabilidad celular de las células ARPE-19 después de 24 horas de la incubación conjunta de ácido lipoico o progesterona con 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La viabilidad celular fue medida 24 horas después de dicha co-incubación mediante el método MTS (figura 20).



**Figura 20.- Diseño experimental del método de co-incubación con ácido lipoico o progesterona.** A Las células ARPE-19 se les administra de manera conjunta ácido lipoico o progesterona con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tras 24h de incubación conjunta, se mide la viabilidad celular de las mismas mediante el método MTS.

Inicio: Se retira el medio 10% FBS-Pen/Strep-Gln, suero fetal bovino (penicilina/estreptomicina-glutamina) en el que las células han estado incubadas para crecimiento durante 3 días a 37°C.

Co-incubación: 24 horas después se retira el medio sin suero y se co-incuban las células con ácido lipoico o progesterona y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una proporción 1:100 (999  $\mu\text{L}$  de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 1  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de ácido lipoico (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  y 2000  $\mu\text{M}$ ) y progesterona (0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ). Se añade 150  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones a los pocillos correspondientes y se deja incubar durante 24 horas en una estufa a 37°C.

Medida de la viabilidad celular: Tras 24 horas se retira el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se procede a la medida de la viabilidad celular mediante el método MTS.

## 2.2.- Obtención y procesamiento de muestras

### 2.2.1.- Obtención de células ARPE-19

ARPE-19 es una línea celular de epitelio de pigmento retinal (RPE), la cual apareció de manera espontánea en 1986 derivada de unos ojos normales de un ser humano varón de 19 años de edad que murió de un trauma craneal en un accidente automovilístico. Las células ARPE-19 forman monocapas estables, las cuales exhiben polaridad morfológica y funcional.

Las células ARPE-19, donación del laboratorio de Julie Sanderson (University of East Anglia, Norwich), están almacenadas en nitrógeno líquido hasta su uso en viales. Para su descongelación se incubó en una estufa a 37°C. A continuación las células ARPE-19 se

cultivaron en medio de crecimiento completo con un ratio de 1:1 medio Dulbecco's eagle medium and Ham's F12 medium suplementado con 10% de FBS, 1% de Pen/Strep y 2mM de una solución de Gln, y se dejaron incubar en una estufa a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células crecieron en matraces de T75 (flask-T75) durante 3 días hasta que las células ocuparon toda la superficie disponible, es decir, cuando alcanzaron la confluencia.

Durante la confluencia, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que transplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase. Para subcultivar, se eliminó el medio gastado, y las células ARPE-19 se lavaron con una solución de tripsina al 0,05%, y se eliminó la tripsina. Se añade uno o dos ml de solución de tripsina adicional hasta que las células ARPE-19 se desenganchen completamente.

A la vez que se realizaban los pases, se realizaba un recuento celular para determinar el número de células que había en cada flask mediante la cámara de Neubauer. Los cultivos de células diferenciadas se mantuvieron hasta 8-10 pases. En el momento en que se obtuvo la densidad celular requerida, se establecieron las condiciones óptimas de cultivo para el experimento. Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000 células/pocillo con un medio suplementado con FBS al 10%, Pen/Strep al 1% y Gln a 2 mM durante 24 horas.

## **2.3.- Procedimientos y técnicas**

### **2.3.1.- Cultivo de células ARPE-19**

#### - Fundamento del método:

Se realiza el cultivo de las células ARPE-19 que son una línea celular diploide del epitelio pigmentario de la retina (EPR) no transformada (Dunn K.C. et al., 1996), e inducimos un estrés oxidativo a las células mediante la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones.

#### - Soluciones y reactivos empleados:

- Serum-free Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)/HamF12 (Gibco Invitrogen, Paisley, UK)
- Suero fetal bovino (FBS; fetal bovine serum) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK)
- Glutamina (Gln) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK)

- Penicilina-estreptomicina (Pen/Strep) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK).
- Tripsina 0,05% (Gibco Invitrogen, Paisley, UK)
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Poole, UK).

- Procedimiento experimental:

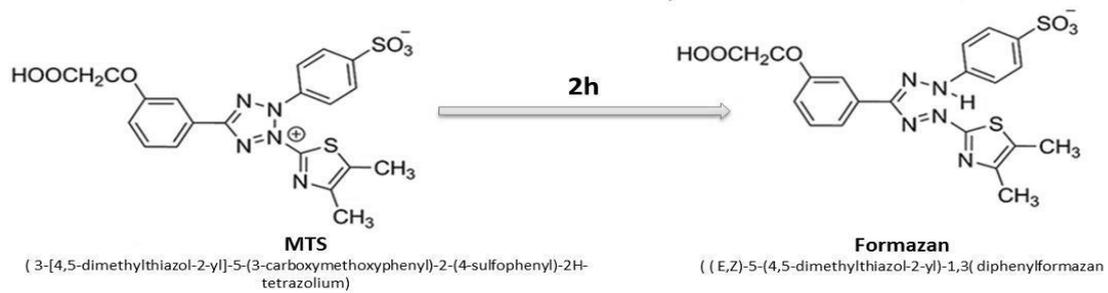
Las células ARPE-19, se cultivaron a una densidad alta (alrededor de 200.000-582.500 células/cm<sup>2</sup>) en flask T75 y se mantuvieron en cultivo a temperatura de 37°C y a una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>; se tripsinizan cuando están confluentes en la placa y para los cultivos de células diferenciadas se mantienen hasta 8-10 pases. En el momento en que se obtiene la densidad celular requerida, se establecen las condiciones óptimas de cultivo para el experimento. Para que las células se adhieran, se cultivan las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000 células/pocillo con un medio suplementado con FBS al 10%, Pen/Strep al 1% y Gln a 2 mM durante 24 horas.

**2.3.2.- Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTS**

- Fundamento del método

Muchos ensayos biológicos requieren medir la supervivencia y/o la proliferación de las células de mamífero, esto puede lograrse por varios métodos. El ensayo de proliferación celular es un método colorimétrico que se utiliza para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad, en concreto en este trabajo utilizamos el método MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).

El compuesto de tetrazolio MTS es biorreducido por las células a un producto llamado formazan, el cual es coloreado y soluble en medio de cultivo tisular, dicho producto tiene un máximo de absorbancia a 490-500 nm en solución salina tamponada con fosfato. Esta conversión se lleva a cabo presumiblemente por NADPH o NADH producido por enzimas deshidrogenasa en células metabólicamente activas (Figura 21). El ensayo MTS se describe a menudo como un ensayo MTT "de un solo paso", que ofrece la oportunidad de añadir el reactivo directamente al cultivo celular sin los pasos necesarios intermitentes en el ensayo de MTT. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y puede cuantificarse por espectrofotometría (Park D. et al., 2010).



**Figura 21.- Estructuras de MTS tetrazolio y su derivado formazán.** El componente MTS es bio-reducido por las células dando lugar a un producto soluble coloreado denominado formazán que es soluble en el medio. Imagen adaptada de <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/>.

#### 2.4.- Tratamiento estadístico de los resultados

Al igual que para los experimentos in vivo para el análisis estadístico de estos experimentos, se ha usado el paquete estadístico SPSS versión 15. Los resultados se muestran como las medias  $\pm$  el error estándar de la media en cada uno de los grupos. Se ha establecido un intervalo de confianza del 95% para el estudio de la significatividad, considerando significativos los datos cuando el p-valor era menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ) para todos los estudios del presente trabajo.

Para el estudio de la viabilidad celular del cultivo de las células ARPE -19 se ha utilizado el análisis de varianza ANOVA. En donde, el primer factor ha sido la concentración de  $H_2O_2$  (0  $\mu M$ , 500  $\mu M$  y 750  $\mu M$ ) / ácido lipoico (0  $\mu M$ , 500  $\mu M$ , 1000  $\mu M$  y 2000  $\mu M$  / Laboratorios Vector, Burlingame, EEUU) progesterona (0  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$  y 200  $\mu M$ ) y la variable dependiente ha sido los datos obtenidos del método MTS (% de viabilidad celular respecto a el control). Al igual que anteriormente, se estudió la normalidad y la homogeneidad de varianza mediante los test correspondientes. Los test post-hoc elegidos dependieron del resultado de la prueba de Levene.

### 3.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A NIVEL MOLECULAR

El sistema amortiguador antioxidante puede ser evaluado indirectamente como capacidad antioxidante total. Este parámetro puede ofrecer una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo en cada sistema. Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante total de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador.

Para evaluar la capacidad antioxidante de nuestras moléculas, determinamos la capacidad antioxidante total mediante el método modificado de CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity). Además, se realizó un análisis topográfico de cada una de las moléculas de estudio y sus metabolitos, basándonos en la función lineal discriminante obtenida de la tesis doctoral del Dr. Carlos Casanova.

#### a) Evaluación de la capacidad antioxidante total. Método CUPRAC

El método CUPRAC se basa en la medición de la absorbancia del cromóforo CUPRAC. Este ensayo mide la capacidad antioxidante reductora de los antioxidantes de la muestra. Se utiliza la neocuproína y se basa en una reducción cúprica de Cu (II) a Cu (I) por la acción del agente oxidante cromogénico.

#### b) Topografía Molecular

El presente estudio se realiza a partir de las investigaciones realizadas por el Dr. Carlos Casanova. En cuya tesis estudió un grupo de compuestos con sin actividad antioxidante y otro grupo de compuestos con una clara actividad antioxidante reconocida y contrastada con el fin de seleccionar a través del análisis lineal discriminante, aquellas características que le permitieran clasificar a los compuestos según presenten o no dicha actividad. Determinando mediante una función discriminante si esa molécula de estudio poseía actividad antioxidante *per se* o no.

Para ello, realizó una búsqueda guiada, basada en el modelo, de nuevas moléculas con esta actividad antioxidante, en una librería o base de datos molecular. A continuación, buscó en los

principios activos comercializados en España en enero de 2013, lo que le permitió encontrar una nueva actividad biológica de la principal o inicialmente descrita en algunas moléculas.

A posteriori, utilizó la herramienta en internet ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest), diccionario gratuito de entidades moleculares centrado en compuestos químicos “pequeños”. ChEBI forma parte de The European Bioinformatics Institute (EBI), que depende de The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), una organización intergubernamental sin fines lucrativos fundada en 1980 con sede actual en Wellcome Trust Genome Campus en Hixton, Cambridge (Reino Unido).

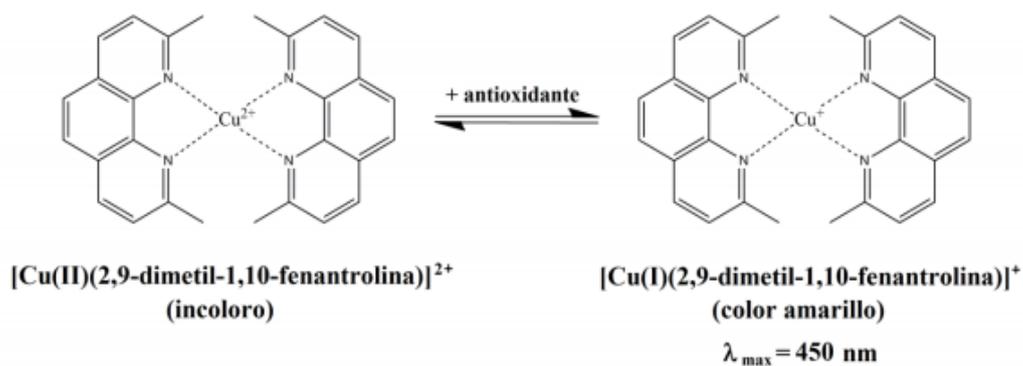
Esta herramienta dispone también de la posibilidad de agrupar conjuntos de moléculas según patrones de actividad. Por tanto, permite de una forma sencilla y eficaz acceder a un gran número de moléculas con la actividad antioxidante deseada. Seleccionó un número amplio de compuestos y descartó aquellos compuestos que eran estructuralmente similares, y otros compuestos que se utilizan como principios activos en la terapéutica, y se les haya descrito actividad antioxidante recientemente.

Con todo ello, obtuvo una función discriminante a partir de la estructura química de cada una de las moléculas estudiadas. De dicho trabajo se dedujo que aquellas moléculas que en la función discriminante presentaran un valor superior a +1 se les consideran que poseen actividad antioxidante reconocida, mientras que aquellas moléculas cuyo rango es -1 se consideran sin actividad antioxidante reconocida. Mediante este método podremos comprobar si nuestras moléculas de estudio *per se* presentan capacidad antioxidante o no en función de su estructura molecular.

### **3.1.- Evaluación de la capacidad antioxidante total mediante el método de medición de la capacidad antioxidante-reductor de ion cúprico**

#### -Fundamento del método

Este método tiene como fundamento el análisis de la intensidad de corriente obtenida al oxidar al complejo cobre (I)-neocuproina, Cu (II), obteniendo de esta manera datos relacionados con la concentración de los antioxidantes como hemosexplicado anteriormente (Harris J., 2004) (Figura 22) .



**Figura 22.- Principio químico del método la evaluación de la capacidad antioxidante reductor de ion cúprico** (adaptado de Huang C. et al., 2005).

La medida de la capacidad antioxidante de las muestras a través del método CUPRAC se basó en una versión modificada del procedimiento experimental propuesto por Apak R. et al., (2004).

- Soluciones y reactivos empleados:

- Cloruro de cobre (II) (Panreac, Barcelona, España),
- Neocuprina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Acetato amónico 1 M (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido gálico (Panreac, Barcelona, España)
- DMSO (Scharlau Chemic S.L, Barcelona, España)

Los reactivos utilizados en el método CUPRAC se prepararon el mismo día del análisis a partir de volúmenes equivalentes (1:1:1) de una disolución acuosa de Cu (II) 10 mM, de una solución de neocuproína 7.5 mM en EtOH 96% y de tampón acetato de amonio (1 M, pH 7). A partir de una concentración conocida de 5 mM de cada una de las moléculas de estudio, ácido lipoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España), progesterona (Sigma-Aldrich, Madrid, España), sus correspondientes metabolitos activos (debido a su gran importancia biológica), el ácido dihidrolipoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España), alopregnanolona (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y 17- $\beta$ -estradiol (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Además utilizamos el ácido ascórbico (Vitamina C) (Cofares, Madrid, España) como control positivo. La recta patrón se realizó a diferentes concentraciones conocidas de ácido gálico.

Medimos la capacidad antioxidante de todos ellos, a diferentes concentraciones: 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM. Tras una incubación a 25 °C durante 1 hora, se leyó la

absorbancia mediante espectrofotómetro, Genesys™ 20 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) a 450 nm.

Por motivos de solubilidad de los compuestos, el disolvente elegido para preparar los patrones y las muestras ha sido el dimetilsulfóxido (DMSO) (Scharlau Chemic S.L, Barcelona, España)

### 3.2.- Índices topológicos

Un índice topológico o descriptor molecular es el resultado final de un cálculo lógico y matemático que transforma la información química codificada en una simbólica representación de la molécula, en un número útil o en un resultado de algún experimento normalizado (Todeschini et al., 2000).

Por lo tanto, la finalidad de los índices topológicos es codificar información topológica sobre las moléculas de forma puramente numérica. Este formato facilita enormemente la búsqueda automatizada de moléculas con propiedades estructurales comunes y, por tanto, posibles candidatos a compartir propiedades químicas o farmacológicas deseadas. La relación entre grafos e índices topológicos no es unívoca, de manera que dado un índice topológico o un conjunto de ellos, en general no es posible identificar el grafo molecular correspondiente; esto es lo que se llama el problema de degeneración. Es esta degeneración, justamente, la que permite identificar grupos de moléculas con propiedades comunes mediante índices topológicos. El adjetivo 'topológico' hace referencia a que la información contenida en los índices es invariante respecto a propiedades 'no esenciales', como pueden ser la numeración de los nodos, las distancias reales entre átomos o todas aquellas distorsiones de la molécula que no modifiquen el grafo subyacente.

La topología molecular se utiliza para encontrar relaciones cuantitativas entre una propiedad física, química o biológica y estructuras moleculares, basándose en la caracterización numérica de las mismas a través de unos índices o descriptores topológicos (Gálvez et al., 1995). Una vez calculados estos descriptores topológicos para los compuestos con la determinada actividad farmacológica se obtienen las funciones de predicción para cada uno de los compuestos activos, y las de clasificación que permiten discriminar entre compuestos activos e inactivos. A continuación se diseñan los modelos de actividad farmacológica, haciendo uso de las funciones seleccionadas, y se aplican a bases de datos moleculares para la selección de sustancias potencialmente activas. Los resultados obtenidos con las funciones de predicción informan que teóricamente presentan un buen perfil farmacológico, lo que nos induce a considerar a estas moléculas como posibles cabezas de serie para el diseño de nuevos fármacos (Mérida S.

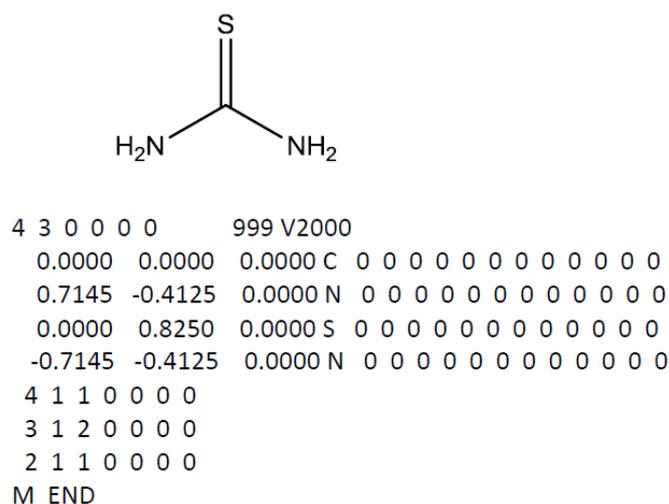
et al., 2013; tesis doctoral Carlos Casanova). La obtención de los ficheros .mol así como los pasos consiguientes hasta la obtención de la función discriminante fue realizada con anterioridad en la tesis doctoral del Dr. Carlos Casanova. En el presente trabajo, se utilizó dicha función discriminante para determinar la capacidad antioxidante de nuestras moléculas de estudio.

#### a) Obtención de los archivos .mol

Los índices topológicos se obtuvieron a partir de los ficheros o archivos .mol que proporciona la organización ChEBI de cada una de las moléculas de su base de datos.

Los archivos formato .mol o MDL Molfile se utilizan para almacenar toda la información de la estructura molecular y ser utilizada en los sistemas software informático. Aparte de formato .mol, MDL Molfile también utiliza la extensión SDF. Se guardan todos los archivos .mol de las moléculas seleccionadas para posteriormente ser procesadas informáticamente.

Como ejemplo, se presenta la estructura de la tiourea junto a su fichero Molfile (figura 23).



**Figura 23.- Estructura química y fichero molfile de la tiourea**

#### b) PaDEL-Descriptor

Para el cálculo de los índices topológicos se utilizó el programa PaDEL-Descriptor, el cual calcula actualmente 1875 índices, de ellos, 1444 son índices uni- y bidimensionales y 431 tridimensionales. Se calculan a partir de la CDK (Chemistry Development Kit), una librería científica que utiliza el lenguaje de programación Java.

PaDEL-Descriptor es un software de acceso libre y gratuito y forma parte del Pharmaceutical Data Exploration Laboratory (PaDEL). PaDEL fue iniciado en 2008 en el Departamento de Farmacia de la National University of Singapore (Yap C.W., 2011).

### **3.3.- Procesamiento de datos**

Cuando se obtuvieron los índices topográficos a través del programa PaDEL-Descriptor que describen la estructura de una molécula, el siguiente paso fue establecer una relación entre éstos y la actividad o propiedad estudiada de las moléculas.

Se estudió esta relación a través del análisis lineal discriminante. Para realizar el análisis discriminante se trabajó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19.

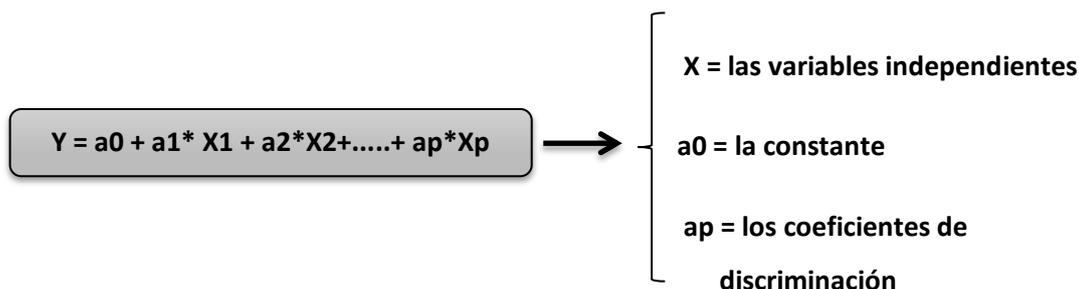
#### a) Análisis lineal discriminante

El análisis lineal discriminante tiene sus orígenes en las formulaciones del cálculo de distancias entre grupos, primero por Karl Pearson (Karl P., 1920), quien propuso el término de “coeficiente de parecido racial” y más tarde por Mahalanobis (Mahalanobis L., 1930), cuyo nombre ha mantenido la medida de distancia entre grupos. A partir de estos trabajos, R.A. Fisher (Fisher R.A., 1936) introduce el término discriminación y da forma a la idea de combinación lineal de variables independientes para la discriminación de grupos. Desde ese momento, esta técnica se aplica a múltiples ámbitos disciplinares (Torrado-Fonseca M. & Berlanga-Silvente, V., 2013).

El análisis discriminante se puede considerar como un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica y tiene como categorías la etiqueta de cada uno de los grupos, y las variables independientes son continuas y determinan a qué grupos pertenecen los objetos. Se pretende encontrar relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen en los grupos dados a los objetos.

Es una técnica multivariante orientada fundamentalmente a lograr dos objetivos básicos:

- a) Explicar la influencia de un conjunto de variables cuantitativas sobre una variable cualitativa.
- b) Predecir la pertenencia de los sujetos u objetos a una de las categorías de la variable de agrupación a partir de los valores registrados en las variables predictivas. Se utiliza una ecuación denominada ‘función discriminante’ que expresa la combinación lineal de las variables predictivas (denominadas variables canónicas) (figura 24).



**Figura 24.- Función discriminante.** La función discriminante para el análisis de los resultados, expresa la combinación lineal de las variables predictivas.

#### b) Procedimiento en SPSS

SPSS permite realizar análisis lineal discriminante a pesar de no cumplir alguna de los supuestos anteriormente citados.

Se introdujo como variable de agrupación la variable dependiente, esto es, la actividad antioxidante. Esta variable sólo puede tomar valores enteros, de tal manera que se indicó el valor máximo y el valor mínimo. Se introdujo la variable denominada "ANTIOX ACT" y se definieron los rangos como mínimo, el 0 (sin actividad antioxidante reconocida), y como máximo, el 1 (actividad antioxidante reconocida).

El criterio para la selección de la mejor función discriminante esta basada en tres parámetros:

- Comparación de los valores de autovalor, correlación canónica,  $\lambda$  de Wilks y chi-cuadrado.
- Determinación del porcentaje de moléculas correctamente clasificadas en el grupo de entrenamiento (activo y no activo).
- Predicción de la clasificación de las moléculas del grupo test (activos y no activos).

El programa SPSS realiza múltiples correlaciones y se selecciona aquella que presenta la mejor relación entre los tres parámetros anteriormente citados.

Fueron seleccionados 657 índices topológicos de 21 tipos distintos del programa PaDEL-Descriptor para obtener la función lineal discriminante.

Para realizar en análisis discriminante se trabajó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19 con el fin de conseguir unos resultados más completos.

En la tesis del Dr. Casanova se utilizaron 91 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 98 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo de entrenamiento) para obtener, mediante numerosos entrenamientos, la función lineal discriminante. Asimismo, se utilizaron 21 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 25 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo test) para validar la función lineal discriminante.

Como criterio de clasificación se eligieron como potenciales antioxidantes aquellas moléculas con valor de la función discriminante superior a cero.

La función discriminante resultante obtenida fue:

$$\text{FD} = 28,545 + 0,196\text{C3SP2} + 0,402\text{nHBd} + 0,136\text{nHdsCH} + 0,115\text{nsCH3} + 5,589\text{nssSe} + 2,706\text{minHsOH} - 2,891\text{minHssNH} + 5,784\text{mindS} - 58,288\text{ETA\_EPSILON\_3} - 10,584\text{ETA\_Psi\_1} - 0,202 \text{ nHBacc} + 1,364\text{topoShape}$$

Los parámetros estadísticos (Autovalor: 4,082, Correlación canónica: 0,896,  $\lambda$  de Wilks: 0,197 y Chi-cuadrado de  $\lambda$  de Wilks: 293,45), junto a la concordancia de las predicciones, permiten validar la función discriminante lineal.

Con la función discriminante que se obtuvo, se permitió con 12 variables, realizar una correcta clasificación de los compuestos en el grupo de entrenamiento, con porcentajes de acierto del 94,5% en las moléculas del grupo de entrenamiento activo y del 94,9% en las moléculas del grupo de entrenamiento no activo. La validación cruzada global fue del 93,64%.

La descripción de los índices que conforman la función discriminante que se obtuvieron fueron:

- **C3SP2**: átomos de carbono con un doble enlace unidos a otros tres átomos de carbono.
- **nHBd**: recuento de E-estados para los átomos donantes de enlaces de hidrógeno.
- **nHdsCH**: recuento de E-estados de tipo de átomos =CH–.
- **nsCH3**: recuento de E-estados de tipo de átomos –CH3.
- **nssSe**: recuento de E-estados de tipo de átomo –Se –.
- **minHsOH**: mínimo E-estado de tipo de átomos –OH–.
- **MinHssNH**: mínimo E-estado de tipo de átomos –NH–.
- **MindS**: mínimo E-estado de tipo de átomo =S.

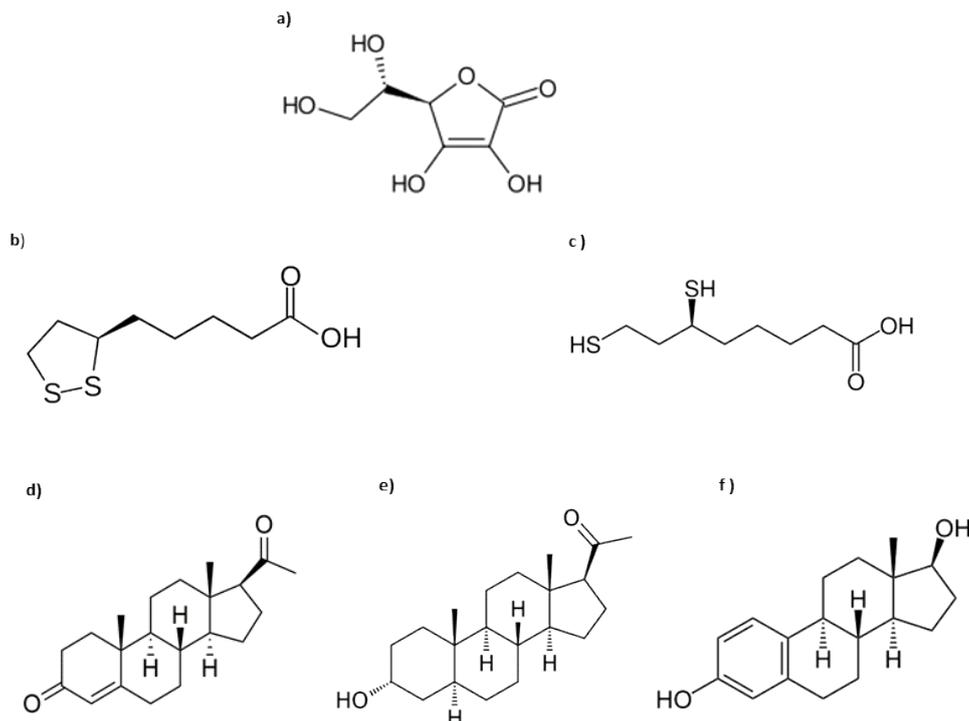
- **ETA\_Epsilon\_3**: medida de la electronegatividad de los átomos.
- **ETA\_Psi\_1**: medida de la predisposición a formar enlaces de hidrógeno de las moléculas y/o el área de superficie polar.
- **nHBAcc**: recuento de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno.
- **topoShape**: medida de la forma molecular.

De los que se dedujo que los índices C3SP2, nHBd, nHdsCH, nsCH3, nssSe, minHsOH, mindS y toposhape contribuyeron de forma positiva en las moléculas a presentar actividad antioxidante, mientras que los índices minHssNH, ETA\_epsilon\_3, ETA\_Psi\_1 y nHBAcc contribuyeron de forma negativa.

### **3.4.- Evaluación de la actividad antioxidante**

En función de la función discriminante obtenida y los descriptores establecidos con anterioridad por el Dr. Carlos Casanova, evaluamos en base a lo explicado anteriormente si nuestras moléculas de estudio: el ácido lipoico, el dihidrolipoico, la progesterona, la alopregnanolona, y el estradiol tienen actividad antioxidante *per se* a nivel molecular. Además analizamos el ácido ascórbico (Vitamina C) como control, debido a su gran capacidad antioxidante conocida. Para ello, los pasos que hemos seguido fueron los siguientes:

- 1) Dibujamos nuestra molécula mediante el programa ChemDraw. Este programa permite dibujar estructuras biológicas y de compuestos químicos de un modo rápido y sencillo (figura 25).



**Figura 25.- Estructura molecular de cada una de las moléculas de estudio realizado con el programa ChemDraw. a) ácido ascórbico, b) ácido lipoico, c) ácido dihidrolipoico, c) progesterona, d) alopregnanolona, f) 17-β-estradiol**

2) Una vez realizados los dibujos de las moléculas se guardan en el fichero .mol. De esta manera quedará almacenada toda la información de la estructura molecular y puede ser utilizada en los sistemas software informático. Las moléculas se dibujan una a una en el ChemDraw y se guarda cada una en un fichero .mol.

3) Para el cálculo de índices topológicos se utiliza el programa PaDEL-Descriptor (software de Java que puede calcular descriptores moleculares y huellas digitales). Introducimos nuestras moléculas guardadas anteriormente en fichero .mol en este programa.

4) Para estudiar la actividad antioxidante de nuestras moléculas, introducimos la función discriminante en SPSS y los datos obtenidos en PaDEL-Descriptor. Como resultado de esto se abre un Excel en donde aparecen los 12 índices que conforman la función discriminante que hemos seleccionado anteriormente: C3SP2, minHsOH, nHBacc etc... y los valores correspondientes a cada una de las moléculas estudiadas y se sabrá si por la función discriminante, dicha molécula presenta capacidad antioxidante (valor superior a +1) o no (valor inferior a -1).

### **3.5.- Tratamiento estadístico de los resultados**

Para el estudio de la capacidad antioxidante mediante el método de CUPRAC, se ha realizado comparaciones de los valores obtenidos de cada una de las moléculas de estudio (ácido áscórbico, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, progesterona, alopregnanolona y 17-beta estradiol a las diferentes concentraciones (5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM). Para ello se realizó el test ANOVA de dos vías. La variable dependiente fue el dato de la CAT y la variable independiente "las moléculas" de estudio y la "Fisher concentración" de cada una de ellas. Como test de normalidad de los datos, se escogió el test de Kolmogorov-Smirnov debido a que el tamaño muestral era inferior a 30, y además se comprobó la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene.



# **RESULTADOS**



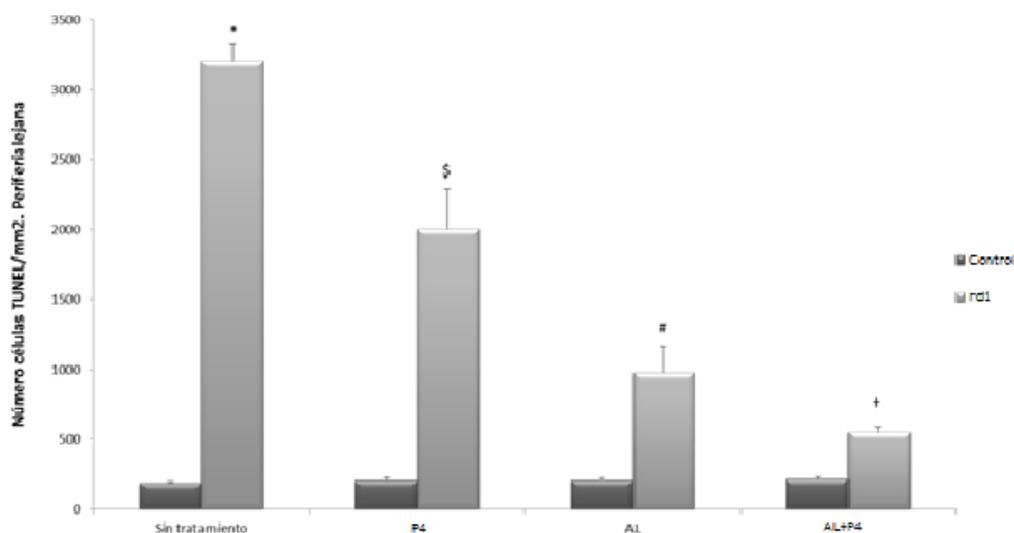
## 1.- CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR EN LOS RATONES CONTROL Y RD1 A DÍA POST-NATAL 11

### 1.1.- Efecto del ácido lipoico, progesterona y su combinación sobre la muerte de los fotorreceptores en la retina de los ratones control y rd1

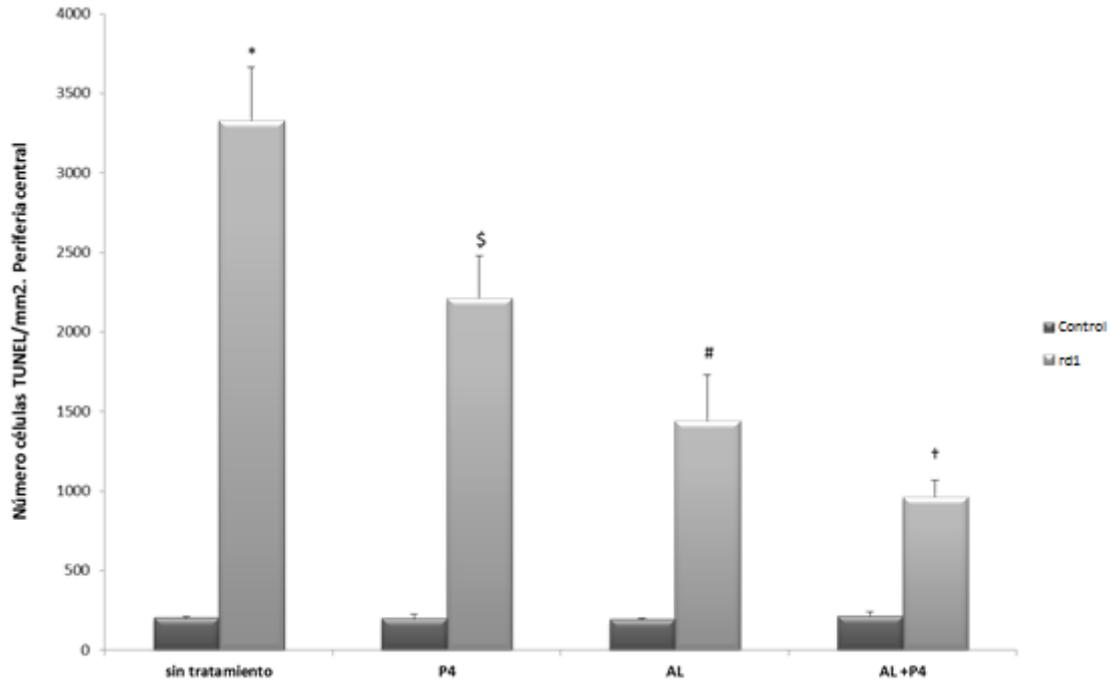
Con la finalidad de medir la muerte celular en la retina de los ratones control y rd1 así como el efecto del tratamiento con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ambos, utilizamos la técnica de marcaje con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP (TUNEL; terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling). Debido a que la degeneración de los fotorreceptores en el modelo de ratón rd1 se produce de forma distinta en las diferentes zonas de la retina, mostrando un gradiente del centro a la periferia (Chang S. et al., 2007, Gargini C. et al., 2007), los resultados se presentan también por zonas: periferia lejana, periferia central y centro de la retina (la más cercana al nervio óptico).

La figura 26 muestra el porcentaje de células TUNEL positivas de la retina de los ratones control y rd1 no tratados y tratados (ácido lipoico, progesterona, ácido lipoico y progesterona) en las diferentes partes de la retina (A) la periferia lejana, (B) periferia central y (C) centro retina. Al realizar el estudio estadístico de las diferentes partes de la retina se comparó los animales control con sus rd1 correspondientes, y se observó la evidencia de una mayor muerte celular en los animales rd1 respecto a los control tanto tratados como sin tratar. Por lo tanto, como cabría de esperar, el número de células TUNEL positivas es mayor en la retina de los animales rd1 que la retina de los ratones control en las diferentes partes de la retina (\* $p < 0,05$  vs control sin tratamiento,  $^{\$}p < 0,05$  vs control progesterona,  $^{\#}p < 0,05$  vs control ácido lipoico,  $^{\dagger}p < 0,05$  vs control ácido lipoico y progesterona).

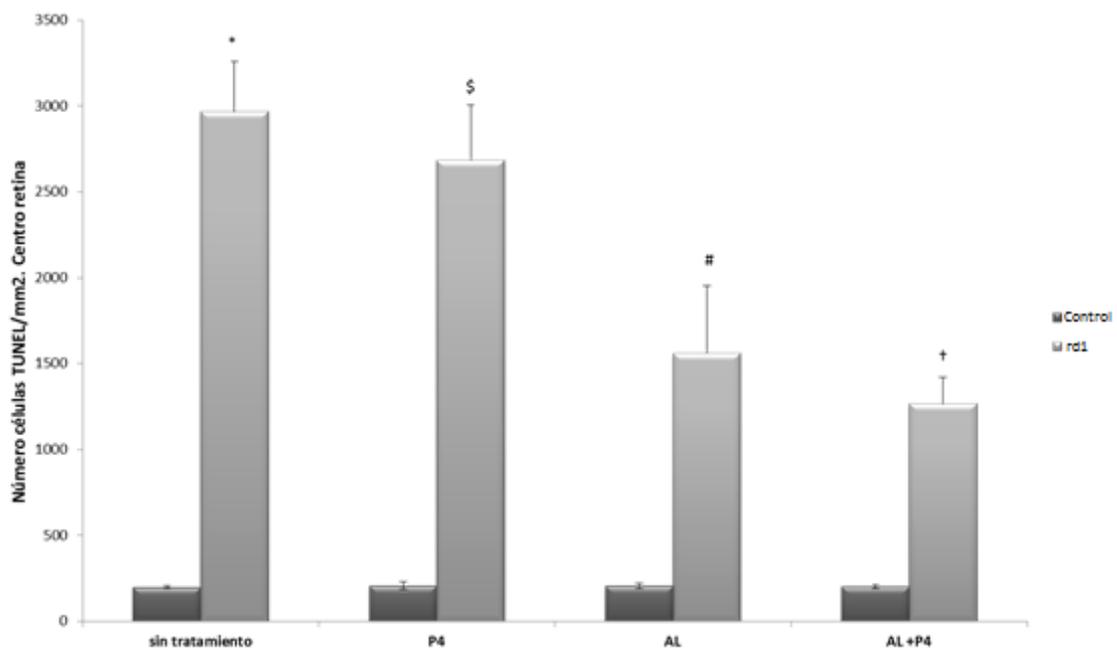
A)



B)



C)



**Figura 26.- Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones control y rd1, a día post-natal 11.** Las barras del gráfico representan el número de células positivas TUNEL en las diferentes zonas de la retina (A) periferia lejana, (B) periferia central y (C) centro retina. Las barras del gráfico representan el número de células TUNEL positivas en las diferentes zonas de la retina (al menos n=6 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar

de la media (\* $p < 0,05$  vs control sin tratamiento, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs control, progesterona, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico, <sup>†</sup> $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico y progesterona).

La figura 27 A, muestra el número de células TUNEL positivas en la retina de los ratones rd1 sin tratamiento (n=6) y los ratones rd1 tratados con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona a día post-natal 11 (n=6). Las imágenes muestran como en la capa nuclear externa de la periferia central de la retina de los animales rd1 sin tratamiento, se observa un mayor número de células TUNEL positivas que en aquellos animales a los que se les administró cualquier tipo de tratamiento. A su vez, las imágenes demuestran como ese número de células es mayor en aquellos a los que se le administró progesterona en comparación a aquellos a los que se trataron ácido lipoico y progesterona.

La figura 27 B muestra un aumento significativo de las células TUNEL positivas en el centro de retina en comparación con las células de la periferia lejana (\* $p < 0,05$  vs centro retina) tanto de los animales no tratados como los tratados. Por otro lado, en esta misma gráfica, se observa una disminución significativa de las células TUNEL positivas en aquellos animales a los que les administró tratamiento, respecto a los animales a los que se les administró únicamente aceite de oliva (<sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs todos los grupos).

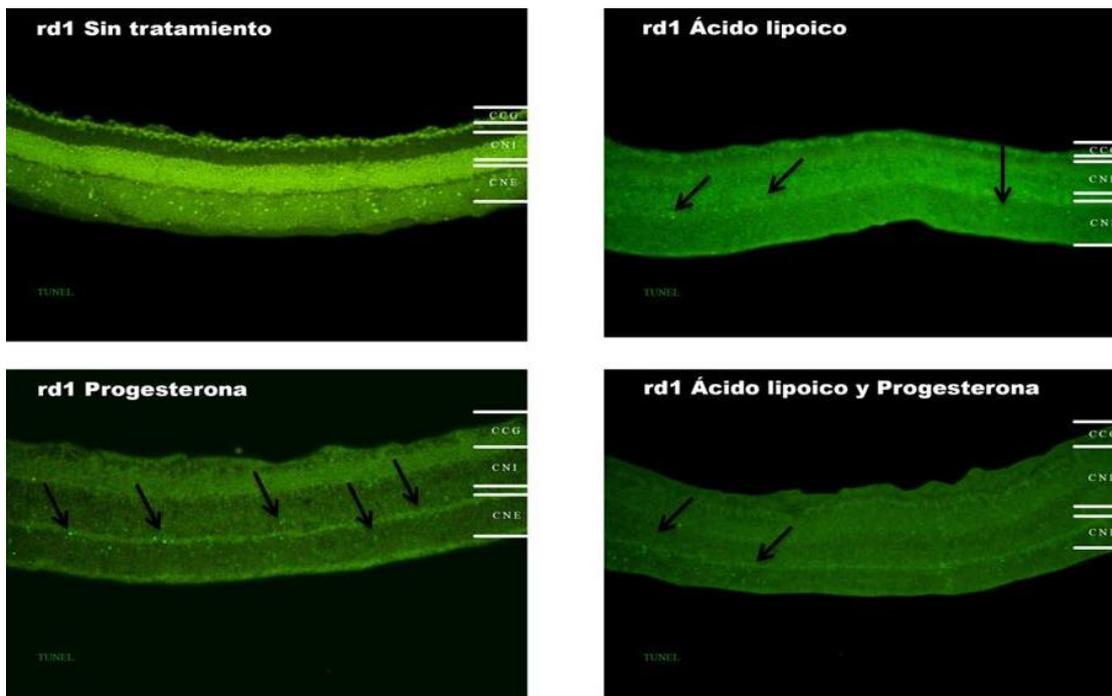
Además, cabe destacar que aunque si que se observa una disminución significativa del número de células TUNEL positivas en aquellos animales a los que se les administró vía oral únicamente progesterona, esta es significativamente menor que aquellos animales rd1 a los que se les administró ácido lipoico y ácido lipoico con progesterona como tratamiento (<sup>§</sup> $p < 0,05$  vs ácido lipoico, ácido lipoico y progesterona).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la retina de los ratones rd1 a los que se les administró ácido lipoico y la combinación de ácido lipoico y progesterona. A pesar de ello, si denota una ligera tendencia a la disminución de la muerte de los fotorreceptores en aquellos ratones rd1 a los que se les administró la combinación de ácido lipoico y progesterona en las diferentes partes de la retina aunque esta no sea significativa con respecto al tratamiento con ácido lipoico (Figura 27 B).

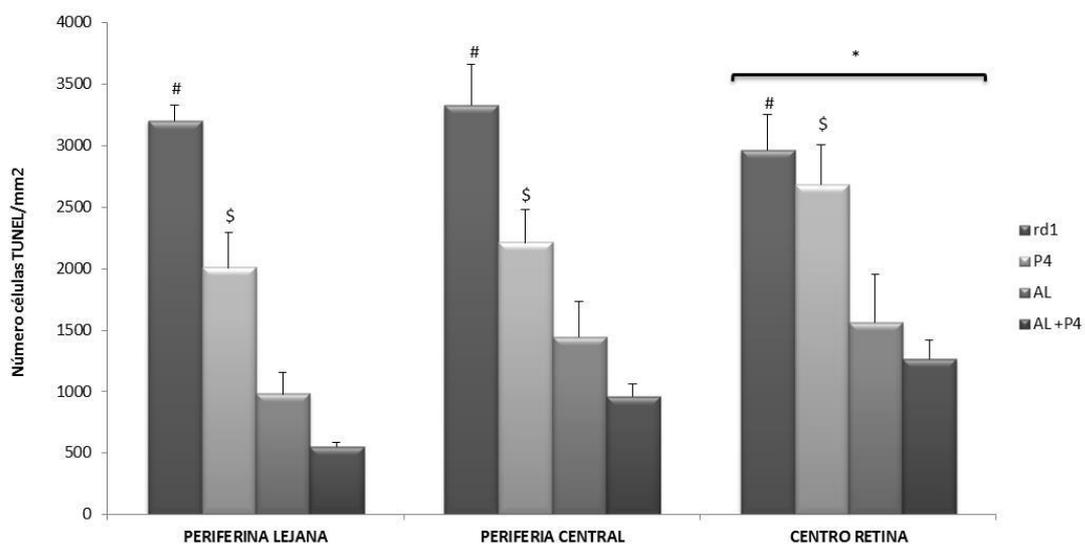
En la figura 27 C (tabla) se muestra el porcentaje de reducción en el número de células TUNEL en las diferentes zonas de la retina en la retina de los ratones rd1 sin tratar y rd1 tratados. Además, se observa que la mayor reducción del número de células TUNEL positivas tiene lugar en la zona de la periferia lejana con alrededor de un 40% de reducción en aquellos animales rd1 a los que se les administró progesterona, un 70 % en aquellos a los que se les administró

ácido lipoico y alrededor de un 80% en aquellos que recibieron una dosis conjunta de ácido lipoico y progesterona. No obstante, en la periferia central y en el centro de la retina también se observa una disminución de dichas células de alrededor de entre un 40% a un 70% de reducción del número de células TUNEL positivas dependiendo del tratamiento administrado. Siendo el porcentaje de reducción mayor en las diferentes partes de la retina de aquellos animales a los que se les trató con ácido lipoico y progesterona de manera combinada (Figura 27C).

A)



B)



C)

Media nº céls. TUNEL /mm <sup>2</sup>	PERIFERIA LEJANA			PERIFERIA CENTRAL			CENTRO RETINA		
	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% reducción TUNEL rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% reducción TUNEL rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% reducción TUNEL rd1 tratado vs rd1
	3204,27	2008,10	37,33	3327,89	2212,71	33,51	2966,35	2684,68	9,50
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL	
	3204,27	980,65	69,40	3327,89	1442,71	56,65	2966,35	1562,28	47,33
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4	
	3204,27	551,92	82,78	3327,89	961,66	71,10	2966,35	1266,53	57,30

**Figura 27.- Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1, a día post- natal 11.** A) Marcaje de células TUNEL positivas en la CNE de la periferia lejana en la retina de ratones rd1 sin tratamiento y rd1 tratados (ácido lipoico, progesterona, la combinación de ácido lipoico y progesterona) a día post-natal 11. Escala 20 µm. B) Las barras del gráfico representan el número de células TUNEL/mm<sup>2</sup> positivas en la CNE de las diferentes zonas de la retina para los citados grupos (al menos n=5 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media (\*p< 0,05 vs periferia lejana; #p< 0,05 vs todos los grupos; § p< 0,05 vs ácido lipoico, ácido lipoico y progesterona). C) Valores medios y porcentaje de mejora entre los grupos rd1 y rd1 tratados (ácido lipoico, progesterona, ácido lipoico y progesterona).

Por tanto, en vista de los resultados, el tratamiento via oral con ácido lipoico, progesterona o con su combinación, es capaz de actuar como neuroprotector frente a la muerte celular de los fotorreceptores a día post-natal 11 en un modelo del ratón rd1, reduciendo el número de células TUNEL positivas en las diferentes partes de la retina hasta casi un 80%, observándose una mayor reducción de la muerte celular al administrar ácido lipoico y progesterona, siendo este tratamiento el que desempeña el mejor poder como neuroprotector en un modelo de ratón con RP.

## 2.- LA GLIOSIS REACTIVA DISMINUYE TRAS EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y LA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LIPOICO Y PROGESTERONA

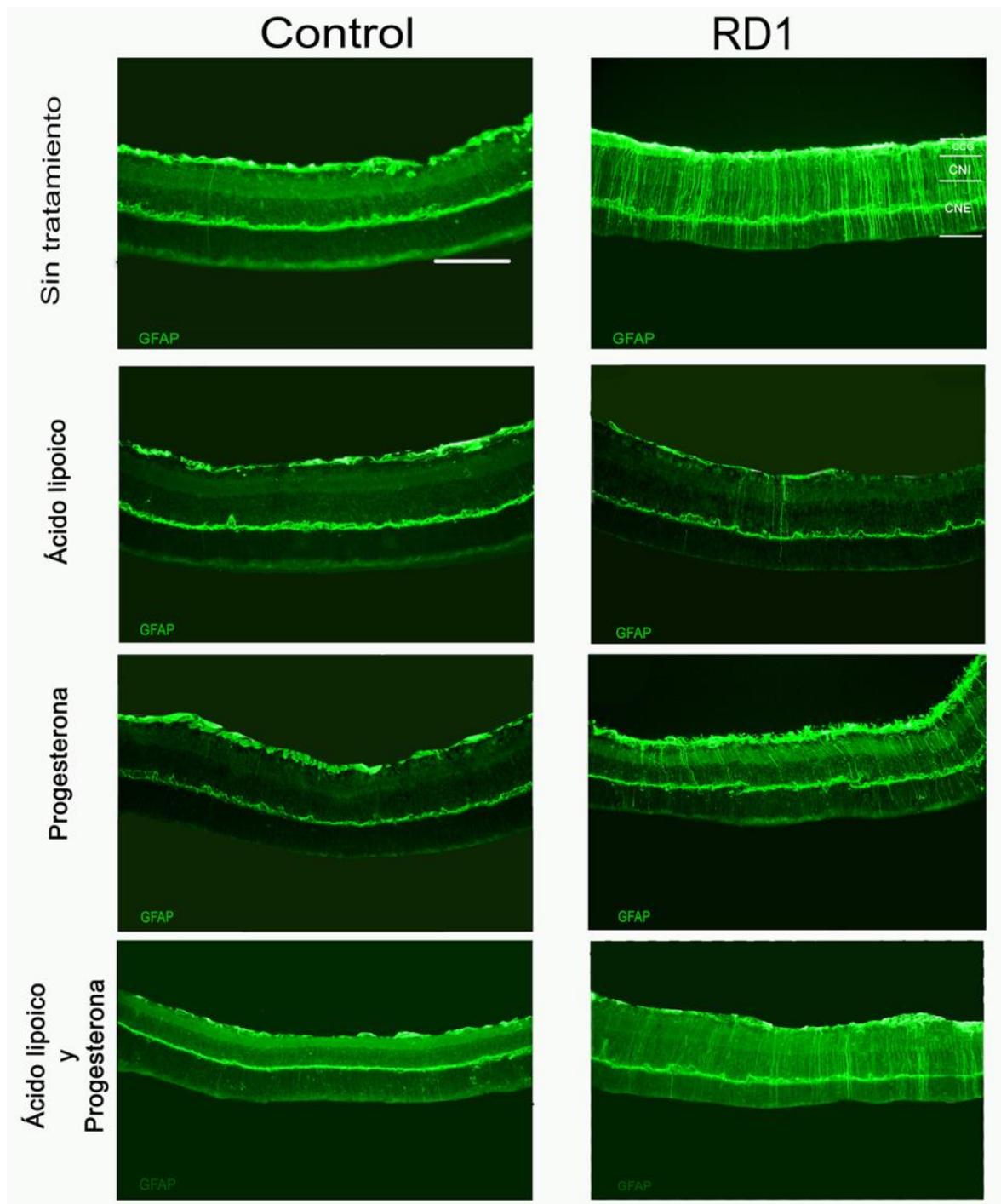
### 2.1.- Efecto del ácido lipoico, la progesterona, y la combinación de ambos sobre la gliosis en la retina de los ratones control y rd1

Las células gliales de Müller (se las considera células astrocitarias especializadas), son uno de los reguladores más importantes de la función fisiológica de la retina (Deeg C.A. et al., 2016).

Prácticamente todas las enfermedades de la retina están asociados con la gliosis de las células de Müller (de Hoz R. et al., 2016), además se ha descrito como existe un incremento de inmunorreactividad a GFAP “glial fibrillary acidic protein” por parte de las células de Müller (Strettoi E. et al., 2003).

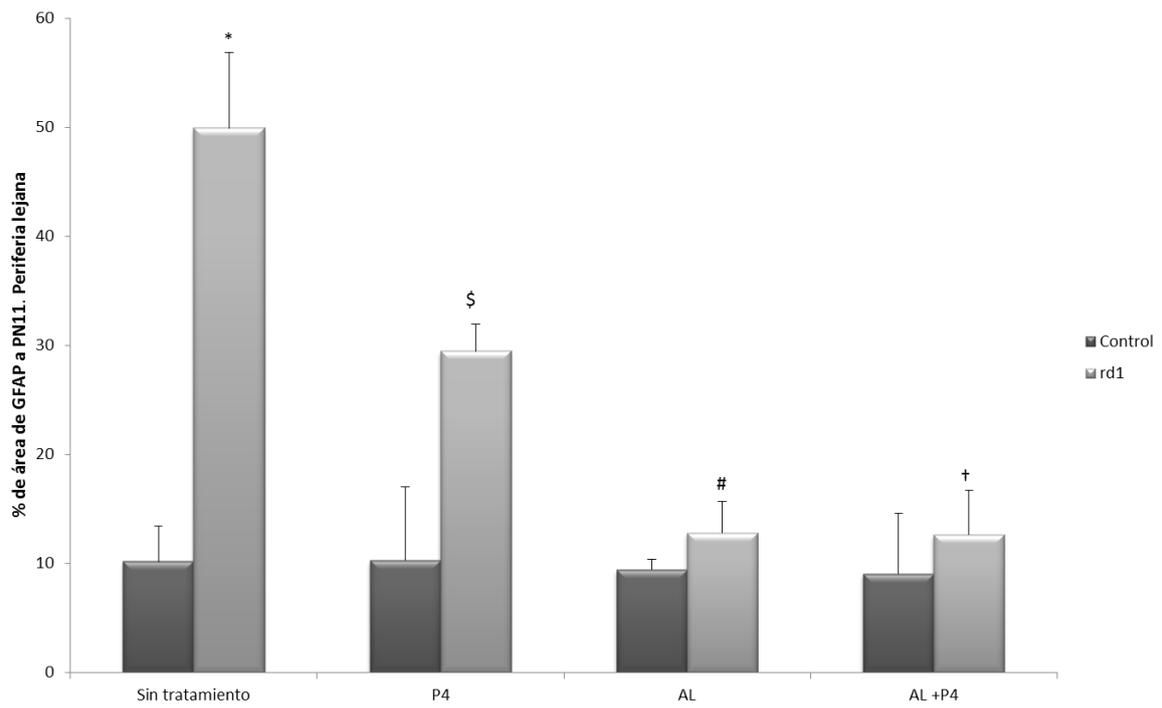
Con la finalidad de evaluar si el tratamiento con ácido lipoico, progesterona y/o la combinación de ácido lipoico y progesterona juega un papel en la disminución o el aumento de la gliosis en las células de Müller, se ha realizado la comparación del marcaje de la proteína GFAP en las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de la retina) de ratones que habían recibido los distintos tratamientos a día post-natal 11.

La figura 28 muestra la expresión de la proteína fibrilar ácida (GFAP) en la retina de los diferentes grupos estudiados (control, no tratados y tratados oralmente con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona; y rd1 no tratados y tratados oralmente con ácido lipoico, progesterona y la combinación conjunta de ácido lipoico y progesterona) a día post-natal 11. Las imágenes se muestran a modo de ejemplo y todas corresponden a la periferia central. Se observó en primer lugar, que la expresión de GFAP es casi nula en los animales control a los que solo se les administró aceite de oliva. En segundo lugar, se observó como en aquellos animales rd1 tratados con ácido lipoico, progesterona y ácido lipoico con progesterona, la expresión de GFAP es menor en comparación con ratones rd1 a los que no se les administró tratamiento, siendo esta disminución de la gliosis más cercana a la retina de los ratones control; lo que sugiere que la administración oral de estas sustancias a día post-natal 11 disminuye la gliosis en la RP en las diferentes partes de la retina (figura 29).

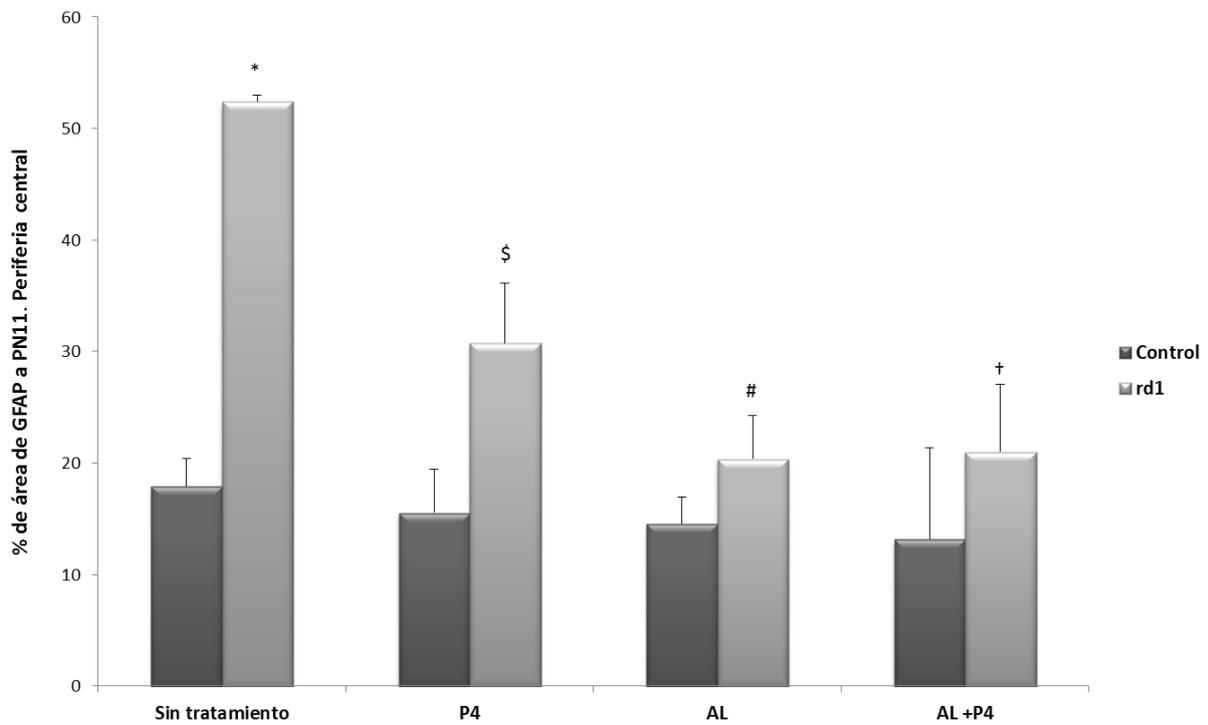


**Figura 28.-** Inmunofluorescencia para la proteína ácida glial fibrilar en la periferia lejana, periferia central y centro de retina de la retina de los ratones control y rd1, sin tratar y tratados (ácido lipoico, progesterona y ácido lipoico con progesterona) a día post-natal 11. Marcaje de GFAP en la periferia central de la retina de los ratones control y rd1. Escala 20  $\mu$ m. La gliosis está reducida en la retina de los ratones rd1 tratados con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona, en comparación con la retina de los ratones rd1 sin tratamiento

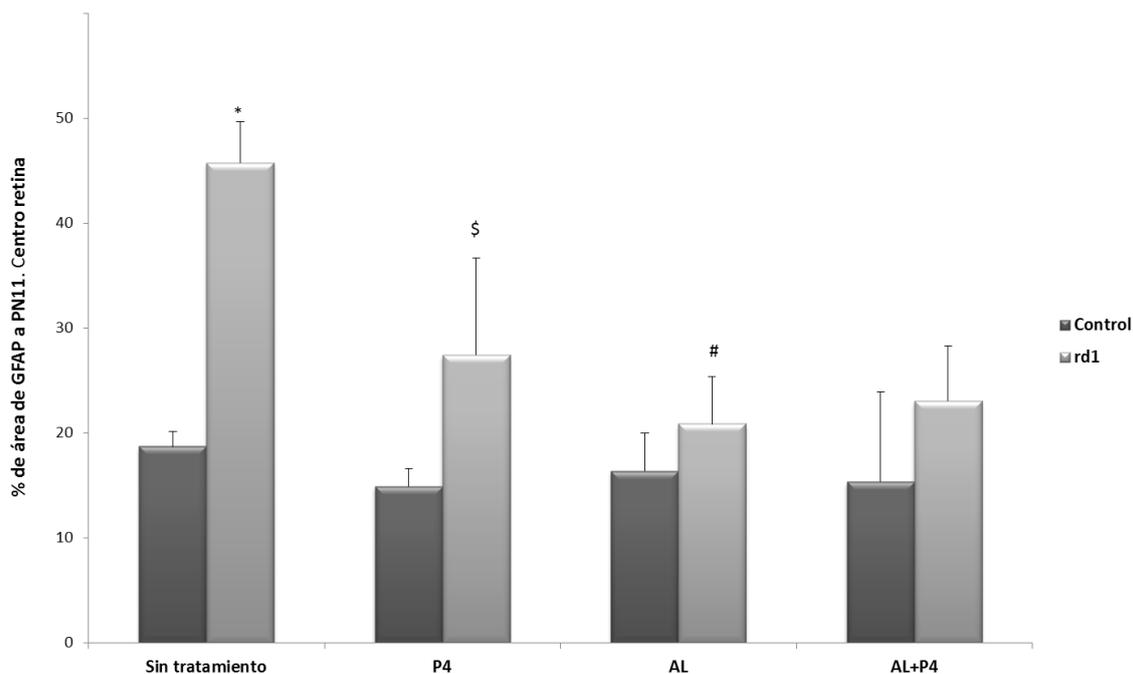
A)



B)



C)



**Figura 29.- Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones control (sin y con tratamiento) y rd1 (sin y con tratamiento).**

Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas en las diferentes zonas de la retina de los animales control y rd1. A) periferia lejana, B) periferia centro, C) centro retina. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs control sin tratamiento, § $p < 0,05$  vs control, progesterona, # $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico, † $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico y progesterona).

Analizando cuantitativamente cada una de las partes de la retina, la figura 29 muestra la cuantificación del área ocupada del GFAP a día post-natal 11 para los diferentes grupos a estudio (control, control tratados vs rd1 y rd1 tratados) en cada una de las zonas de la retina.

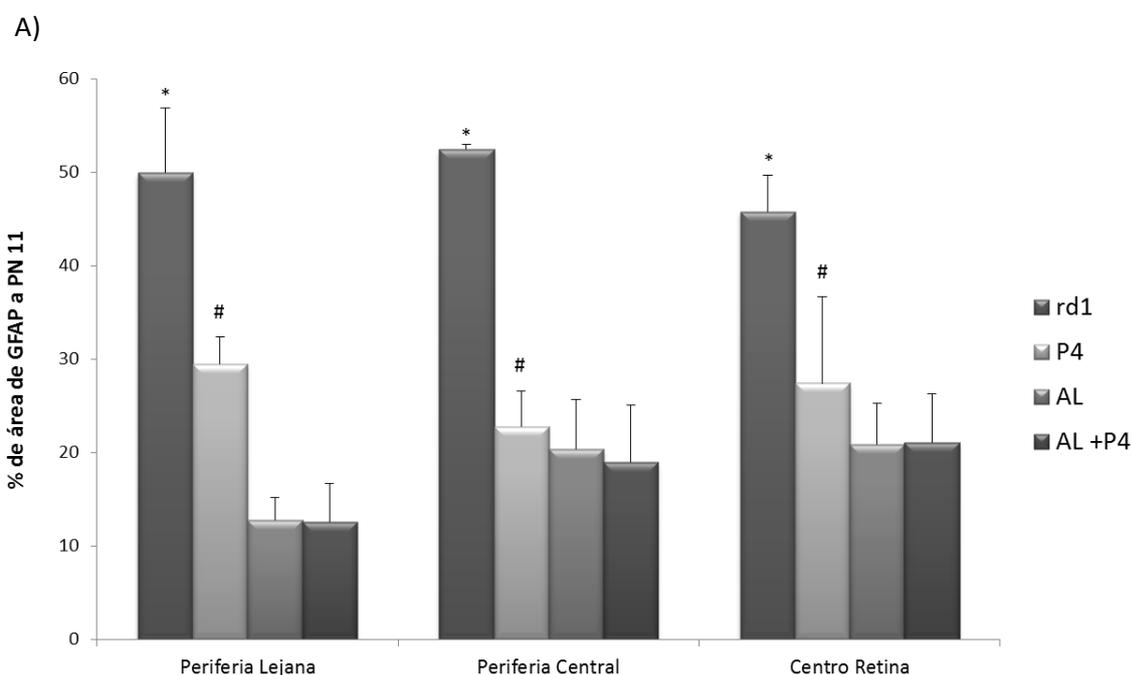
En concreto, se observa en primer lugar, como existe una diferencia significativa de la expresión de GFAP entre la retina de los animales controles y de rd1 tanto sin tratar como tratados, siendo más notable dichas diferencias entre los animales control y rd1 no tratados en las diferentes partes de la retina (\* $p < 0,05$  vs control sin tratamiento, § $p < 0,05$  vs control, progesterona, # $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico, † $p < 0,05$  vs control, ácido lipoico y progesterona). Por otro lado, observamos como en la periferia lejana, periferia central y centro de la retina, la expresión de GFAP en los ratones rd1 tratados con la combinación de ácido lipoico y progesterona disminuye siendo esta parecida a los valores obtenidos en los animales control. De hecho, la figura 29 C muestra como en el centro retina no existen diferencias

significativas de la expresión de GFAP entre los animales control y rd1 tratados con el tratamiento combinado.

La figura 30 muestra la evidencia de la presencia de gliosis reactiva típica en la retina de los ratones rd1 en comparación con aquellos ratones rd1 a los que se les administró cualquier tratamiento (\*p< 0,05 vs todos los tratamientos) (figura 30 A). Dicha disminución es estadísticamente significativa y tiene un valor de entre un 40% a un 75% de reducción del marcaje de GFAP en las diferentes partes de la retina según el tratamiento administrado (figura 30 B).

En esta misma figura, se observa como aquellos animales rd1 a los que se les administró progesterona presentan un mayor marcaje de GFAP que aquellos a las que se les administró ácido lipoico o ácido lipoico y progesterona (#p<0,05 vs ácido lipoico, ácido lipoico y progesterona), con un 32% a un 40% de reducción del marcaje de GFAP dependiendo la zona de la retina, siendo la mayor disminución del marcaje de GFAP, en la periferia lejana.

No observamos que haya una disminución de la gliosis reactiva significativa de la gliosis en los animales a los que se trató con la combinación de ácido lipoico y progesterona cuando se comparan con aquellos a los que se trató sólo con ácido lipoico. Sin embargo, al cuantificar el porcentaje de reducción del marcaje de la expresión de GFAP en las diferentes partes de la retina, se observa una disminución del marcaje ligeramente mayor (aunque no significativa) en aquellos animales a los que se les administró la combinación de ácido lipoico y progesterona, sobretodo en el centro de la retina con una reducción del 63% frente al 56% que se observa en los animales en los que se les administró ácido lipoico únicamente (Figura 30 B).



B)

Media % de área de GFAP	PERIFERIA LEJANA			PERIFERIA CENTRAL			CENTRO RETINA		
	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GFAP rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GFAP rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GFAP rd1 tratado vs rd1
	49,93	29,46	40,99	52,43	30,36	42,10	45,74	30,86	32,53
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL	
	49,93	12,78	74,41	52,43	22,75	56,62	45,74	27,41	40,07
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4	
	49,93	12,61	74,74	52,43	19,01	63,75	45,74	25,07	45,19

**Figura 30.- Inmunofluorescencia para la proteína acídica glial fibrilar en la periferia lejana, periferia central y centro de la retina de los ratones rd1 sin tratar y rd1 tratados (ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona), a día post-natal 11.**

A) Representación gráfica del porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas en cada una de las secciones de la retina estudiada. Las barras de error representan el error estándar de la media (\*p< 0,05 vs rd1 tratados, #p< 0,05 vs ácido lipoico y progesterona. B) Valores medios del porcentaje de área ocupada por el marcaje GFAP. También se muestra el porcentaje de reducción del marcaje de GFAP en función del área en las diferentes partes de la retina en función del tratamiento administrado.

Como hemos dicho anteriormente, en estos resultados se observa la evidencia de la gliosis reactiva típica de esta degeneración retiniana en los ratones rd1; sin embargo esta gliosis se encuentra disminuida entre un 35% a un 75% en las diferentes partes de la retina, cuando administramos ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona, siendo el más efectivo la combinación de ambas sustancias. Se demuestra el papel que juegan estas sustancias como neuroprotectores frente a la gliosis reactiva generada por un daño en la retina de ratón con RP.

### 3.- CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA CATALÍTICA

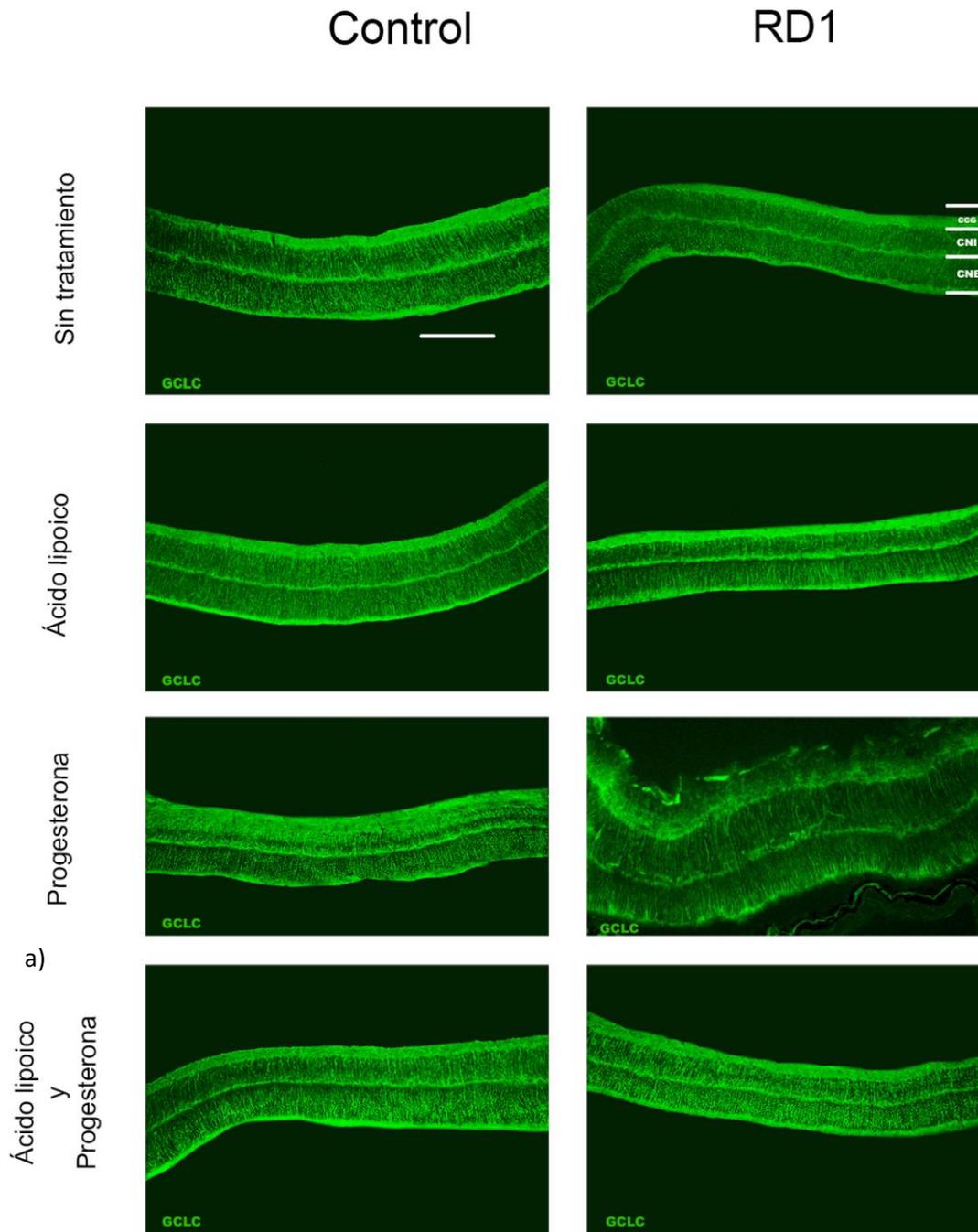
El GSH es esencial para la supervivencia celular y su depleción ha sido asociada a muerte celular por apoptosis y activación de caspasa-3, que a su vez puede cortar la subunidad catalítica de la GCL, reduciendo más la síntesis de GSH. Como hemos dicho anteriormente, la primera etapa limitante de la biosíntesis del GSH, está catalizada por la gamma-glutamyl-cistein ligasa. Algunos autores han sugerido que bajo condiciones de estrés, puede convertirse en un paso crítico.

Por todo ello, se han estudiado los niveles de expresión de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica, enzima clave en la síntesis de novo del GSH, con la finalidad de evaluar si el ácido lipoico, la progesterona y/o la combinación de ambos, en la retina de ratones rd1 y control, provoca alguna alteración en esta enzima.

En la figura 31 se exponen imágenes representativas de la periferia central de la retina de los ratones control (sin y con tratamiento) y rd1 (sin y con tratamiento), en dichas imágenes se puede observar que no se aprecian apenas diferencias en la expresión de GCLC entre los grupos, en consonancia con los resultados obtenidos.

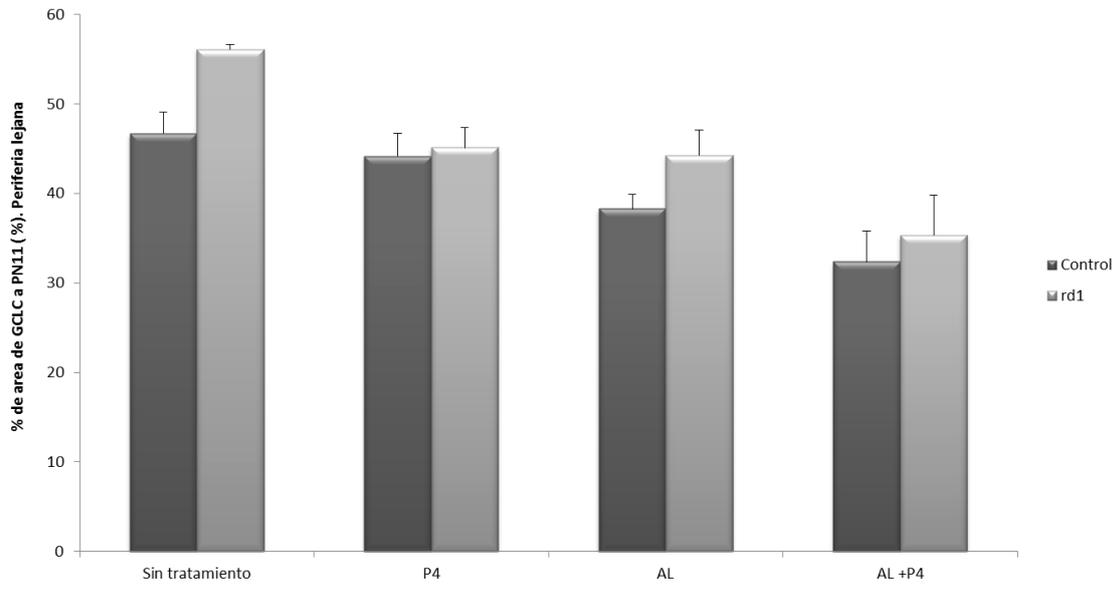
En ninguna de las tres partes de la retina de los animales estudiados se han encontrado diferencias significativas entre los animales control y rd1 (figura 32).

A continuación, analizamos la actividad de la enzima GCLC en las diferentes partes de la retina de los ratones rd1, comparando dicha actividad en la retina de los ratones rd1 sin tratar con los animales rd1 tratados oralmente a día post-natal 7, día post-natal 9 y día post-natal 11 con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ambos. Los resultados se observan en la figura 33, en donde se refleja que solamente existen diferencias significativas en la periferia lejana de la retina de ratón rd1 entre los rd1 sin tratar y los tratados con la combinación de ácido lipoico y progesterona (\* $p < 0,05$ ) en los que hay una reducción del 37,18% (figura 33 B). Aunque no se observan diferencias significativas en la expresión de GCLC entre los animales rd1 sin tratar y los tratados, si que existe una cierta reducción en su expresión que oscila entre un 6% a un 37%.

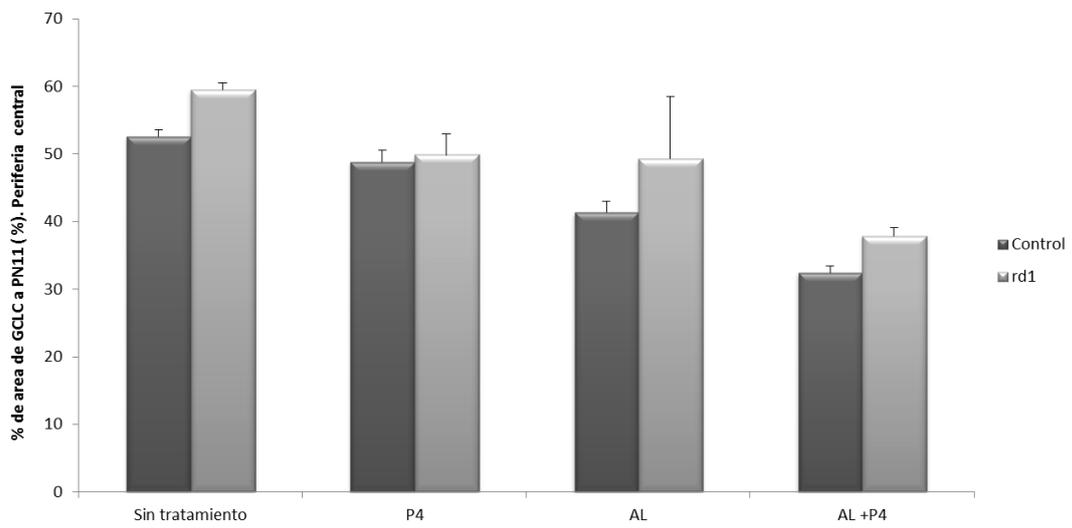


**Figura 31.-** Inmunofluorescencia para la expresión de glutamato cisteína ligasa catalítica en las diferentes zonas de la retina de los ratones control y rd1, sin tratar y tratados (ácido lipoico, progesterona, y la combinación de ácido lipoico y progesterona), a día post natal 11. Imagen representativa de la periferia central de la retina de los ratones control y rd1 sin tratamiento y con los diferentes tratamientos. Escala 20  $\mu$ M.

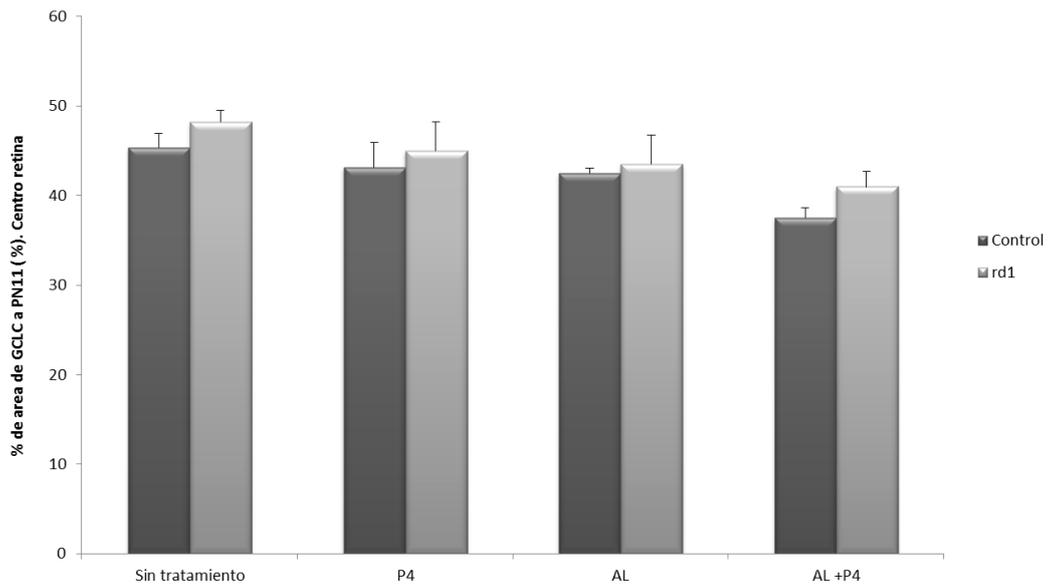
A)



B)

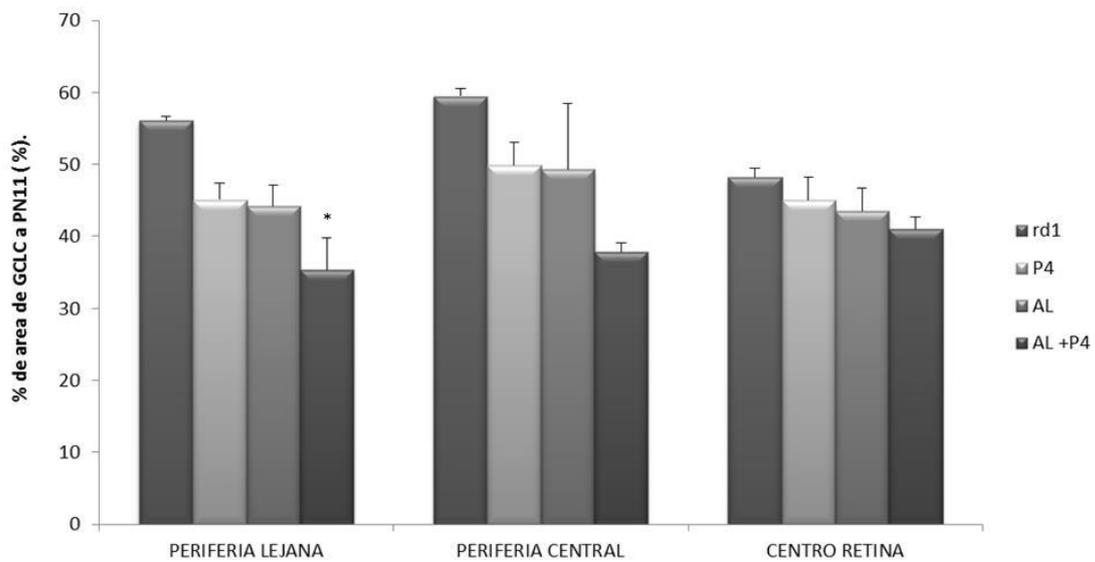


C)



**Figura 32.- Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por la expresión de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica en la retina de ratones control (sin y con tratamiento) y rd1 (sin y con tratamiento).** Las barras de error representan el error estándar de la media. No se muestra diferencias en actividad de la entre los ratones control y rd1 en las diferentes partes de la retina, A) periferia lejana; B) periferia lejana y C) centro retina.

A)



B)

Media % de área de GCLC	PERIFERIA LEJANA			PERIFERIA CENTRAL			CENTRO RETINA		
	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GCLC rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GCLC rd1 tratado vs rd1	rd1 Sin tratamiento	rd1 P4	% de reducción de GCLC rd1 tratado vs rd1
	56,13	45,13	19,60	59,51	49,86	16,22	48,18	45,01	6,57
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL	
	56,13	44,28	21,12	59,51	49,34	17,10	48,18	43,51	9,69
	rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4		rd1 Sin tratamiento	rd1 AL+ P4	
	56,13	35,31	37,10	59,51	37,83	36,43	48,18	40,98	14,94

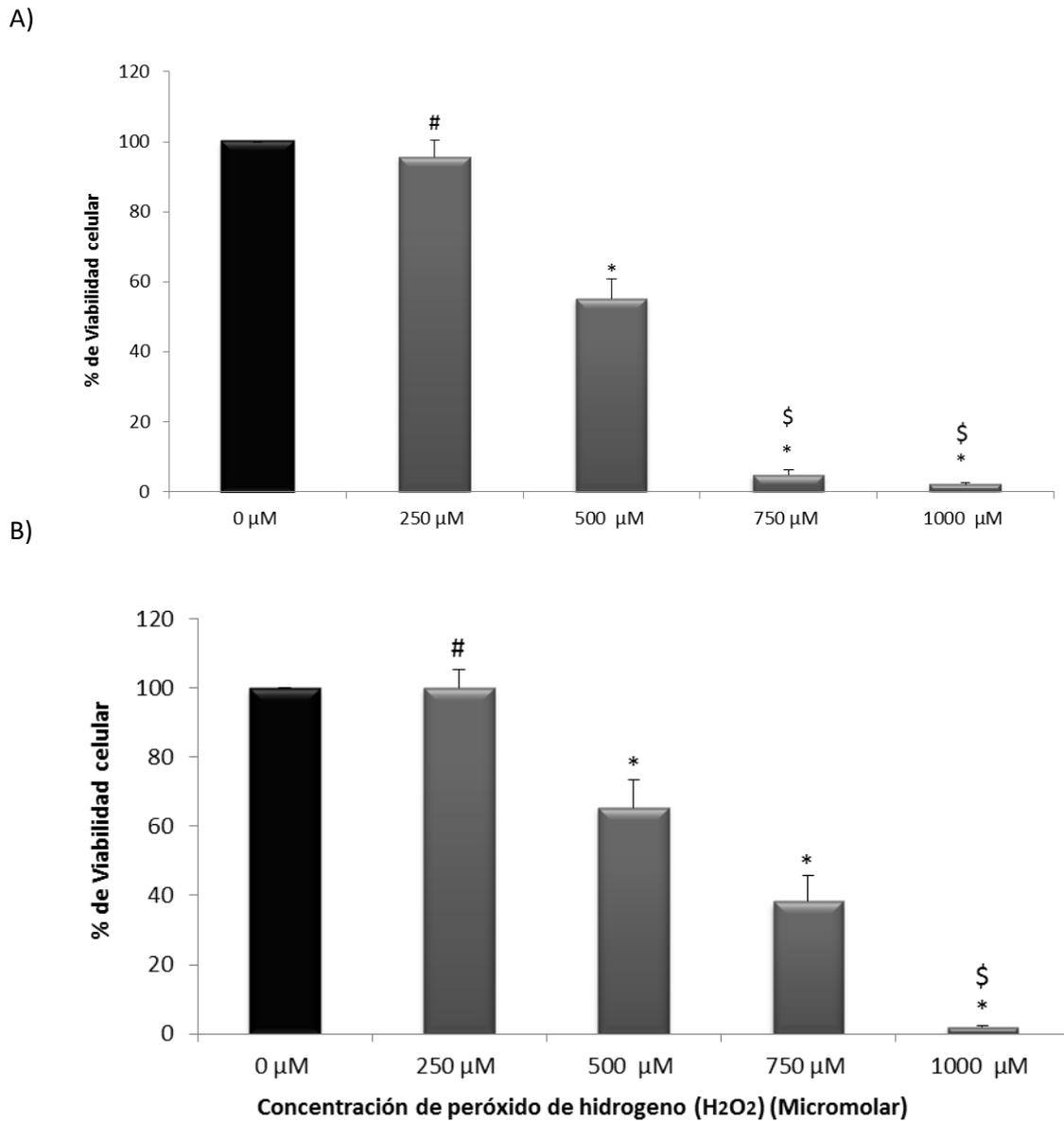
**Figura 33.- Representación gráfica de la expresión de la actividad de glutamato cisteína ligasa catalítica según el porcentaje de área en las diferentes partes de la retina a día postnatal 11 de ratones rd1.** A) La expresión de GCLC se encuentra disminuida de manera significativa en la periferia lejana de la retina de los ratones rd1 tratados con ácido lipoico y progesterona respecto al control (\*p< 0,05). B) Valores medios del porcentaje de área ocupada por la expresión de GCLC. También se muestra el porcentaje de reducción del marcaje de GCLC en función del área en las diferentes partes de la retina en función del tratamiento administrado.

#### 4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS ARPE-19 SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

##### 4.1.- Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células ARPE-19.

Con el objetivo de escoger la concentración idónea de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a la cual debemos someter a las células ARPE-19 para nuestros siguientes experimentos, se ha realizado un estudio de la viabilidad celular en dichas células. A las células ARPE-19 se les ha inducido un estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintas concentraciones (0 μM, 250 μM, 500 μM y 1000 μM).

La figura 34, muestra como a medida que aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\*p< 0,05 vs 0 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la viabilidad celular disminuye estadísticamente, tanto en aquellas células a las que se les ha sometido a pre-tratamiento, como a co-incubación (figura 34 A y B) (explicado anteriormente en el apartado 2.2.2 de material y métodos).



**Figura 34 .- Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras la inducción de un estrés oxidativo con diferentes dosis de  $H_2O_2$  (0  $\mu M$ , 250  $\mu M$ , 500  $\mu M$  y 750  $\mu M$ ). A) Células sometidas a pre-tratamiento con  $H_2O_2$ . B) Células sometidas a co-incubación con  $H_2O_2$ . Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs contra todos los grupos; #  $p < 0,05$  vs 500  $\mu M$ , 750  $\mu M$ , 1000  $\mu M$  de  $H_2O_2$ ; \$  $p < 0,05$  vs 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$ ).**

Los resultados muestran como a una concentración de 250  $\mu M$  no se existen diferencias significativas respecto al control, pero sí a concentraciones mayores de  $H_2O_2$  (\* $p < 0,05$  vs 0  $\mu M$  de  $H_2O_2$ ; #  $p < 0,05$  vs 250  $\mu M$  de  $H_2O_2$ ).

A su vez, se aprecian diferencias significativas en la viabilidad celular de aquellas células que han sido sometidas a una dosis de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto a las concentraciones más altas ( $^{\$}p < 0,05$  vs 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en aquellas que han sufrido pre-tratamiento, mientras que no se observa dicha significación en la co-incubación celular con una concentración de 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

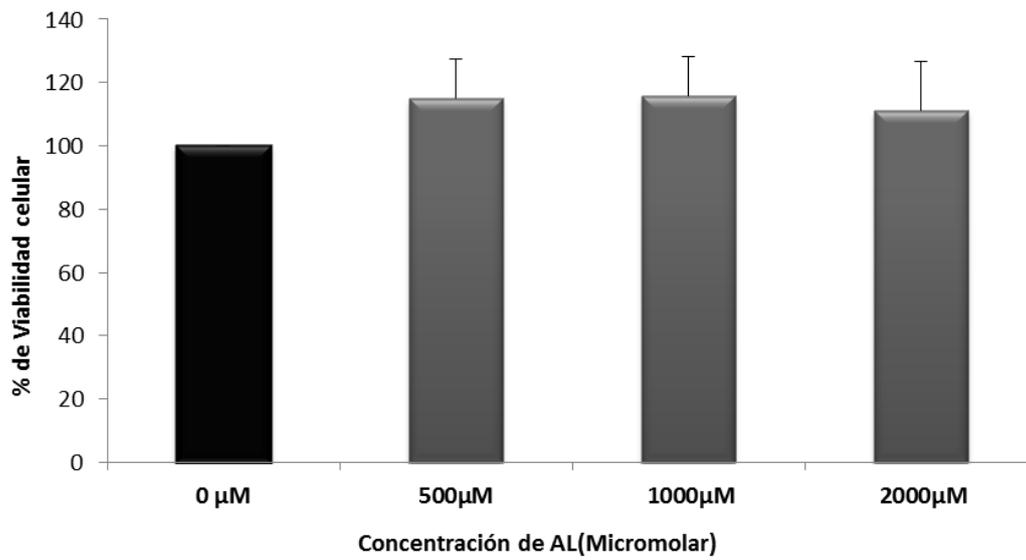
En vista de los resultados obtenidos, para los experimentos que se iban a realizar posteriormente, escogimos la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la inducción del daño oxidativo en las células ARPE-19.

#### **4.2.- Efecto del ácido lipoico y la progesterona a diferentes concentraciones en un cultivo de células ARPE-19.**

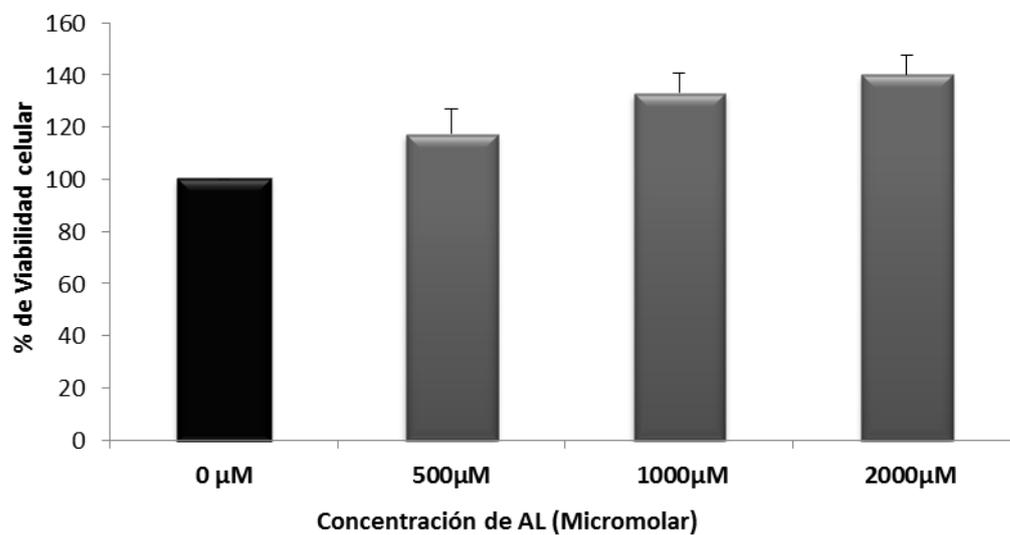
Aunque no se encontraron datos bibliográficos sobre la posible toxicidad de ácido lipoico y/o la progesterona para las células ARPE- 19, para continuar con nuestros estudios, se procedió a valorar el efecto de estas sustancias tras su administración sobre las células siguiendo tanto la técnica de pre-tratamiento como la de incubación conjunta, mediante el ensayo MTS. La figura 35, muestra como no existen diferencias significativas en la viabilidad celular de las células ARPE-19 tras haber sido sometidas a diferentes concentraciones ácido lipoico (500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  y 2000  $\mu\text{M}$ ).

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que, independientemente de cual sea la concentración de ácido lipoico administrado, no se produce una disminución de la viabilidad de la células ARPE-19, y por lo tanto este tratamiento no es tóxico por si mismo. Incluso, se puede observar como en el caso de las células sometidas a co-incubación, los resultados reflejan una tendencia a un aumento creciente aunque no significativo de la viabilidad celular a medida que aumentamos la dosis de ácido lipoico (figura 35 B).

A)



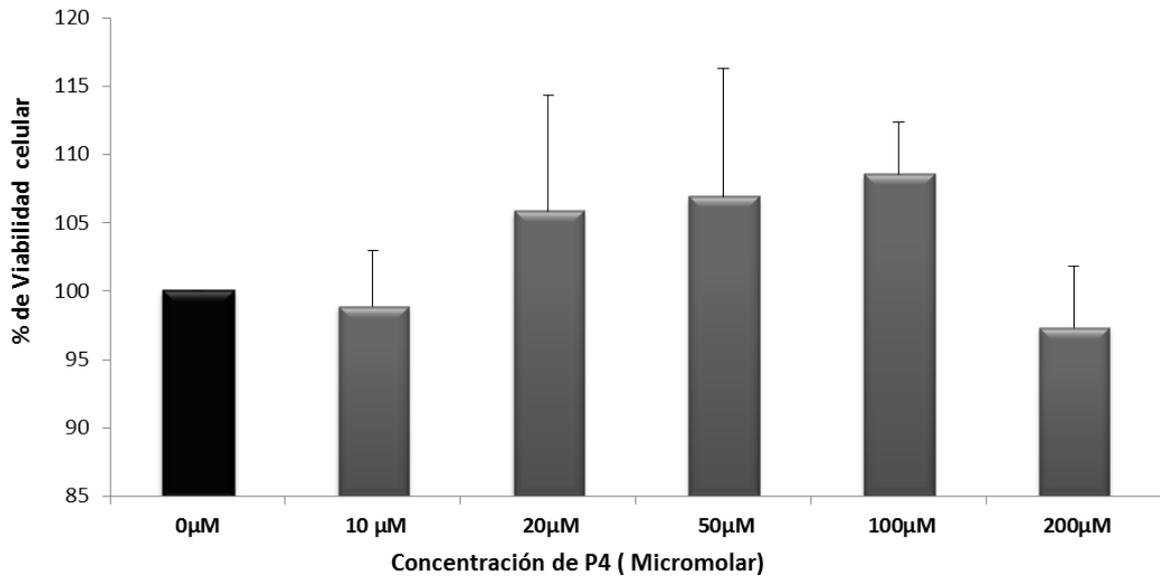
B)



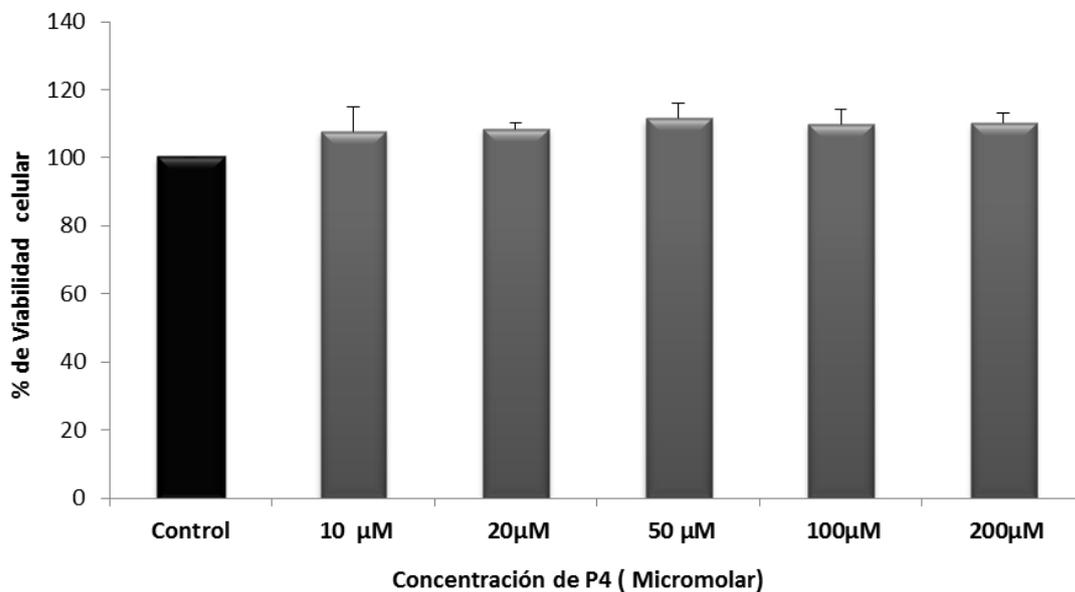
**Figura 35.-** Representación gráfica de la viabilidad celular de las células ARPE-19 a diferentes concentraciones de ácido lipoico (500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  y 2000  $\mu\text{M}$ ). A) Células sometidas a pre-tratamiento. B) Células sometidas a co-incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Siguiendo las mismas pautas, sometimos a las células ARPE-19 a diferentes concentraciones de progesterona (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ). La figura 36 muestra como no se manifiesta ninguna diferencia significativa en cuanto a la viabilidad celular respecto al control, en ninguno de los procedimientos.

A)



B)



**Figura 36.- Representación gráfica de la viabilidad celular de las células ARPE-19 a diferentes concentraciones de progesterona (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ). A) Células sometidas a pre-tratamiento. B) Células sometidas a co-incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media.**

En vista de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que ni el ácido lipoico ni la progesterona a las diferentes concentraciones establecidas, resultan tóxicos para las células ARPE-19.

#### **4.3.- Determinación de la viabilidad celular en un cultivo de células ARPE-19 sometidas a un estrés oxidativo tras el tratamiento con ácido lipoico y progesterona**

Una vez determinado que ni el ácido lipoico ni la progesterona resultan tóxicos para las células ARPE-19, hemos estudiado el posible efecto protector del el ácido lipoico y la progesterona frente a un estrés oxidativo inducido. Para ello, como se explicó en el apartado de material y métodos, en primer lugar, se pre-trataron las células ARPE-19 con diferentes concentraciones de ácido lipoico (500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M) y progesterona (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M), para posteriormente inducirles un estrés oxidativo con una concentración de 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración idónea establecida en el apartado 4.1 de resultados).

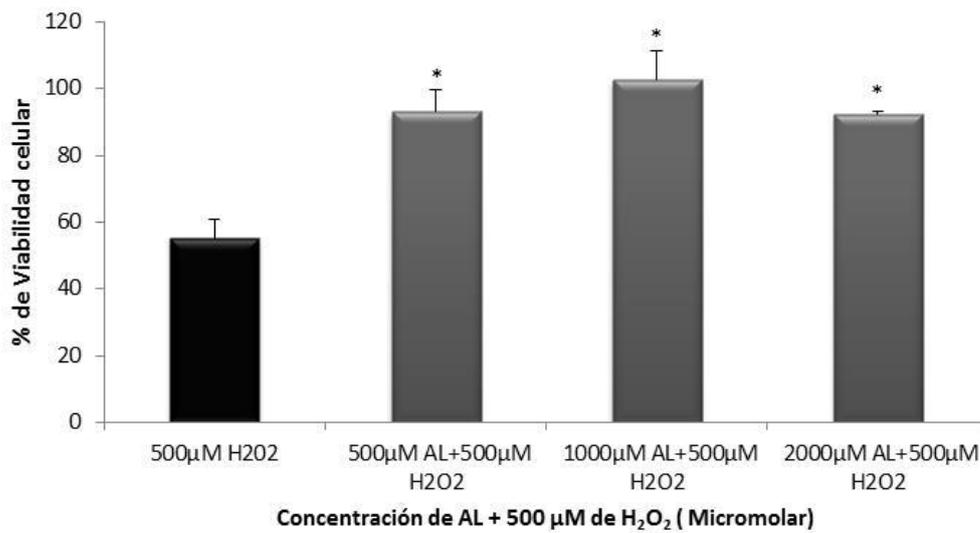
##### ***4.3.1.- Efecto del ácido lipoico como pre-tratamiento en las células ARPE-19 ante la inducción de estrés oxidativo con 500 $\mu$ M de peróxido de hidrógeno***

Se ha realizado un estudio de viabilidad celular en células ARPE-19 pre-tratadas a concentraciones distintas de ácido lipoico (500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M), a las que posteriormente se les indujo un estrés oxidativo mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 500  $\mu$ M.

En la figura 37 se observa un aumento significativo de la supervivencia de las células tratadas con diferentes concentraciones de ácido lipoico respecto a las no tratadas (\*p< 0,05 vs 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (figura 37 A). En concreto, se produjo un aumento de la viabilidad de un 37,97% en aquellas células pre-tratadas con 500 $\mu$ M de ácido lipoico, un aumento del 47,42% en aquellas que fueron pre-tratadas con una dosis de 1000 $\mu$ M y por último de un 37,06% a una dosis de 2000  $\mu$ M de ácido lipoico (figura 37 B).

Aunque no se ha observado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes concentraciones, la viabilidad celular fue mayor (47,42%) en aquellas células que fueron pre-tratadas a una dosis de 1000  $\mu$ M, por lo que esta podría ser la idónea para tratar las células ARPE-19 ante la inducción de estrés oxidativo con ácido lipoico.

A)



B)

		% de aumento de la viabilidad celular	
Media del % de viabilidad celular	500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 μM AL+ 500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	93,08	37,97
	500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 μM AL+500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	102,53	47,42
	500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2000 μM AL+500 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	92,17	37,06

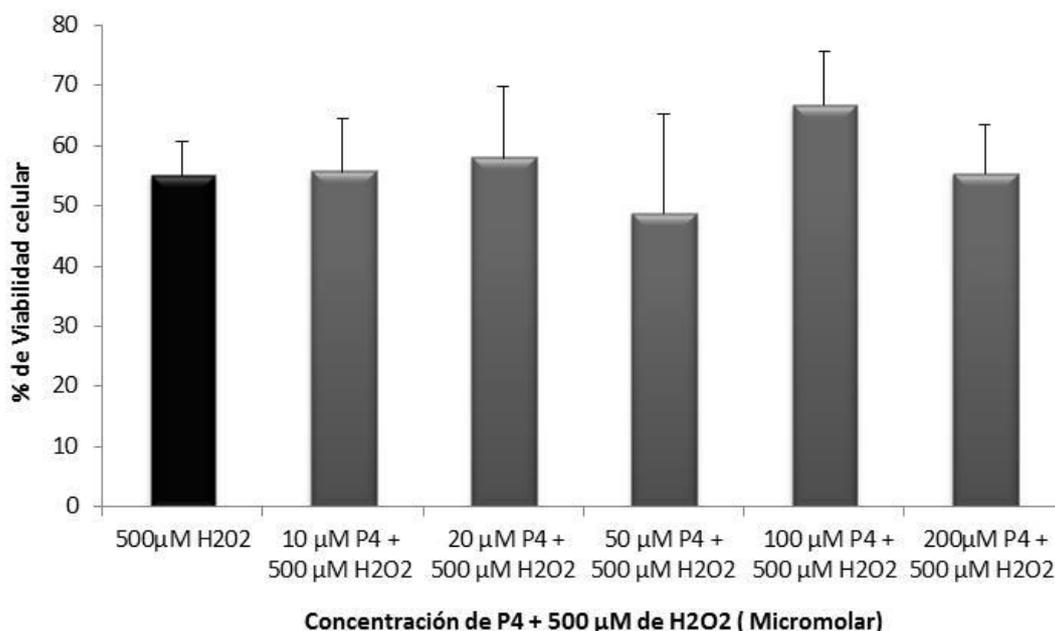
**Figura 37.-Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con ácido lipoico a diferentes concentraciones (500 μM, 1000 μM y 2000 μM) y la posterior inducción de estrés oxidativo con una dosis de 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A) Las barras de error representan el error estándar de la media, (\*p< 0,05 vs 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). B) Valores medios del porcentaje de la supervivencia celular. También se muestra el porcentaje del aumento de la supervivencia celular de las células ARPE -19 pre-tratadas con ácido lipoico.**

#### 4.3.2.- Efecto de la progesterona como pre-tratamiento en las células ARPE-19 ante la inducción de estrés oxidativo con 500 $\mu\text{M}$ de peróxido de hidrógeno

Para analizar el posible efecto protector frente a un estrés oxidativo de la progesterona *in vitro*, se ha realizado un estudio de viabilidad celular en células ARPE-19 pre-tratadas a distintas concentraciones de progesterona (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ) y a continuación se les ha inducido un estrés oxidativo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ .

La figura 38 A, muestra como a las diferentes dosis de progesterona, no existe un aumento significativo de la viabilidad celular en comparación con las células sometidas a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La figura 38 B muestra un ligero aumento del 11,62% de viabilidad celular respecto a las células tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una dosis de 100  $\mu\text{M}$  de progesterona. Por tanto y pese a que no hubo diferencias significativas entre grupos, se estableció dicha concentración de progesterona como la dosis óptima para el tratamiento de las células ARPE-19 frente la inducción de estrés oxidativo con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 38).

A)



B)

		% de aumento de la viabilidad celular	
Media del % de viabilidad celular	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	55,77	0,66
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM P4 + 500 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	58,04	2,94
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	48,71	-6,39
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	66,73	11,63
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	55,11	55,31	0,20

**Figura 38.- Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con progesterona a diferentes concentraciones (10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM), previo a la inducción de un estrés oxidativo con una dosis de 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** A) Representación gráfica del porcentaje viabilidad celular en las células ARPE-19. Las barras de error representan el error estándar de la media. B). Valores medios del porcentaje de la supervivencia celular. También se muestra el porcentaje del aumento de la supervivencia celular de las células ARPE-19 pre-tratadas con progesterona.

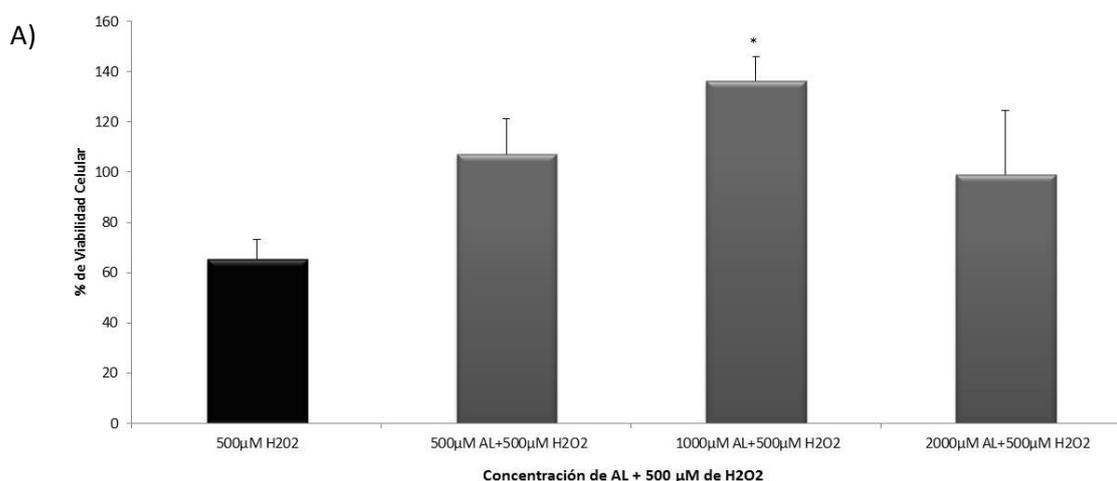
#### **4.4.- Determinación de la viabilidad celular en un cultivo de células ARPE-19 co-incubadas con ácido lipoico y progesterona, y 500 µM de peróxido de hidrógeno**

Tras la evaluación de la viabilidad celular de las células ARPE-19 pre-tratadas con ácido lipoico y con progesterona durante 24 horas antes de la inducción de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sometimos a las células a una incubación de ácido lipoico y progesterona con 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El objetivo de este experimento fue estudiar si estas moléculas puede proteger a las células de un daño oxidativo en el momento que se produce el daño o es necesario que sean previamente metabolizadas por las células ARPE-19 para ejercer su poder protector.

**4.4.1.- Evaluación de la viabilidad celular de células ARPE-19 tras la incubación conjunta con ácido lipoico y 500  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno.**

Con la finalidad de evaluar el papel protector del ácido lipoico, se sometió a las células ARPE-19 a la incubación conjunta de ácido lipoico y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las células se trataron de manera conjunta con diferentes concentraciones de ácido lipoico y con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24 horas.

Como se muestra en la figura 39, el ácido lipoico produjo un aumento en la viabilidad celular aunque no de manera significativa a todas las concentraciones. A una concentración de 500  $\mu\text{M}$  se produjo un aumento del 41,90% de viabilidad celular y un aumento del 33,61% en aquellas co-incubadas con 2000  $\mu\text{M}$  de ácido lipoico. No obstante se aprecia un aumento significativo (\* $p < 0,05$  vs 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a una dosis de 1000  $\mu\text{M}$  de ácido lipoico, con un aumento de la viabilidad celular del 70,84% respecto a las células que fueron tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



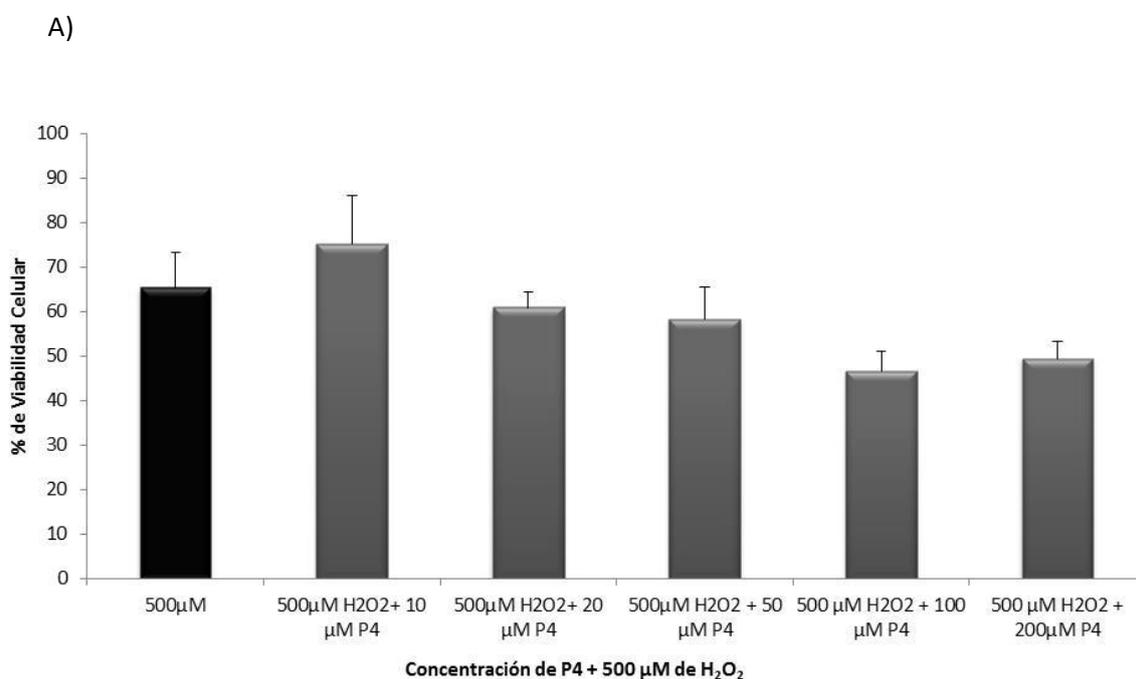
B)

		% de aumento de la viabilidad celular	
Media del % de viabilidad celular	500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$		
	500 $\mu\text{M}$ AL+ 500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$		
	65,43	107,32	41,89
	500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	1000 $\mu\text{M}$ AL+500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	
65,43	136,27	70,84	
500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	2000 $\mu\text{M}$ AL+500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$		
65,43	99,04	33,61	

**Figura 39.- Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras la incubación conjunta con ácido lipoico (500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  y 2000  $\mu\text{M}$ ) y 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .** A) Representación gráfica del porcentaje viabilidad celular en las células ARPE-19. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs 500 $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). B) Valores medios del porcentaje de la supervivencia celular. También se muestra el porcentaje del aumento de la supervivencia celular de las células ARPE-19 incubadas con ácido lipoico y 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**4.4.2.-Evaluación de la viabilidad celular de células ARPE-19 tras la incubación conjunta con progesterona y 500  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno**

Al analizar los datos *in vitro* después de 24 horas de incubación conjunta de progesterona y 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  observamos que no existen diferencias significativas entre las diferentes dosis de progesterona (Figura 40 A). Únicamente observamos, como muestra la figura 40, un ligero aumento de la viabilidad celular (9,78%) en aquellas células co-incubadas a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de progesterona. Incluso, se aprecia una discreta tendencia a disminuir la viabilidad celular a medida que aumentamos la concentración de progesterona (figura 40 B).



B)

		RESULTADOS	
		% de aumento de la viabilidad celular	
Media del % de viabilidad celular	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	65,43	75,21	9,78
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	65,43	60,97	-4,46
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	65,43	58,29	-7,14
	500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	65,43	46,57	-28,64
500µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200µM P4 + 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
65,43	49,43	-11,54	

**Figura 40.- Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 co-incubadas con progesterona a diferentes concentraciones (10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM), y 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las barras de error representan el error estándar de la media. A) Representación gráfica del porcentaje viabilidad celular en las células ARPE-19. Las barras de error representan el error estándar de la media. B) Valores medios del porcentaje de la supervivencia celular. También se muestra el porcentaje del aumento de la supervivencia celular de las células ARPE-19 incubadas con progesterona y 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

## 5.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados.

En el presente trabajo se han considerado dos técnicas para la evaluación de la capacidad antioxidante de las moléculas de estudio: el análisis mediante la técnica espectrofotométrica CUPRAC y un modelo topológico-matemático.

### 5.1.- Capacidad antioxidante total

Como ya se apuntó anteriormente, para conocer si nuestras moléculas poseían poder antioxidante, se midió su capacidad antioxidante total (CAT) mediante el método CUPRAC. La capacidad antioxidante de una molécula se debe a su estructura molecular y a la presencia de grupos funcionales que pueden fácilmente donar electrones. Para este ensayo, se realizó una recta patrón de ácido gálico a diferentes concentraciones conocidas.

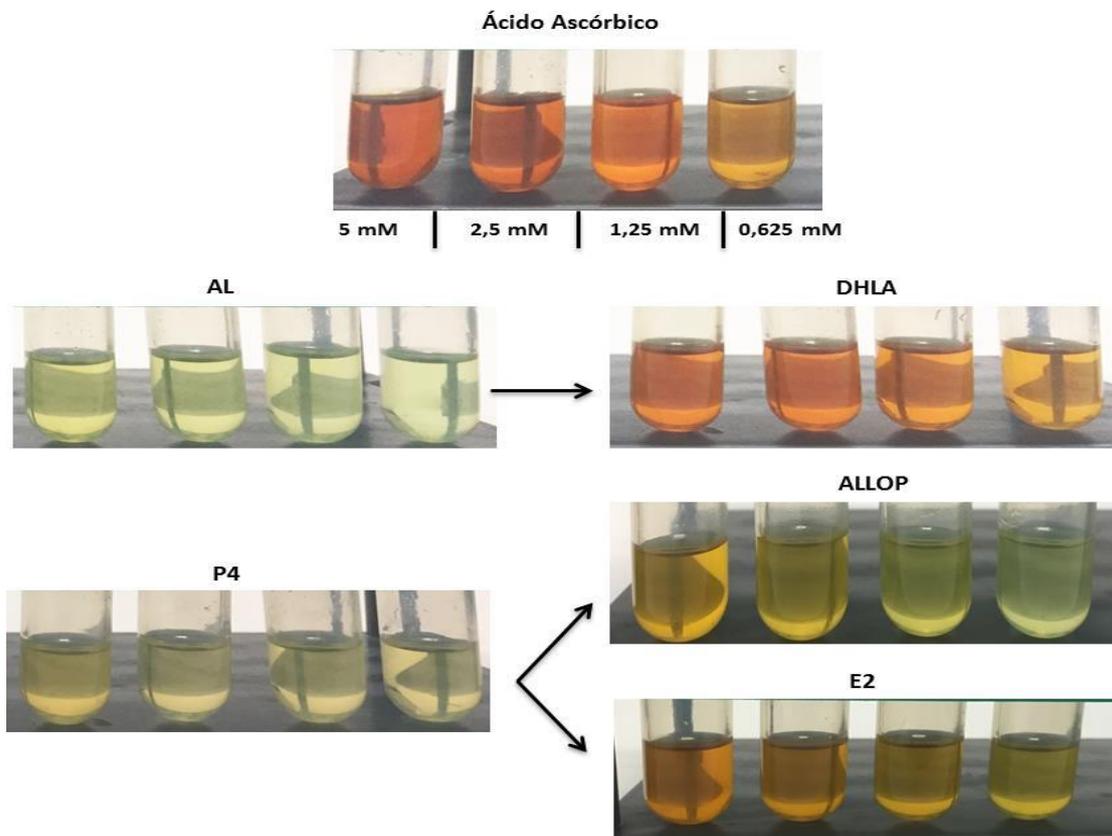
La medida de absorbancia de la muestra antioxidante analizada es convertida a equivalentes de ácido úrico mediante una curva de dilución generada por los estándares del mismo. El cobre tiene un potencial redox más bajo que el hierro, lo que se traduce en reacciones más selectivas: azúcares y ácidos cítricos, no son oxidados en el ensayo CUPRAC. No obstante, es conveniente tener en cuenta que para potenciales redox bajos se incrementa el ciclo redox, así que la reducción de cobre puede ser, incluso, un indicador más sensible del potencial de la actividad prooxidante de los antioxidantes (Prior R. et al., 2005).

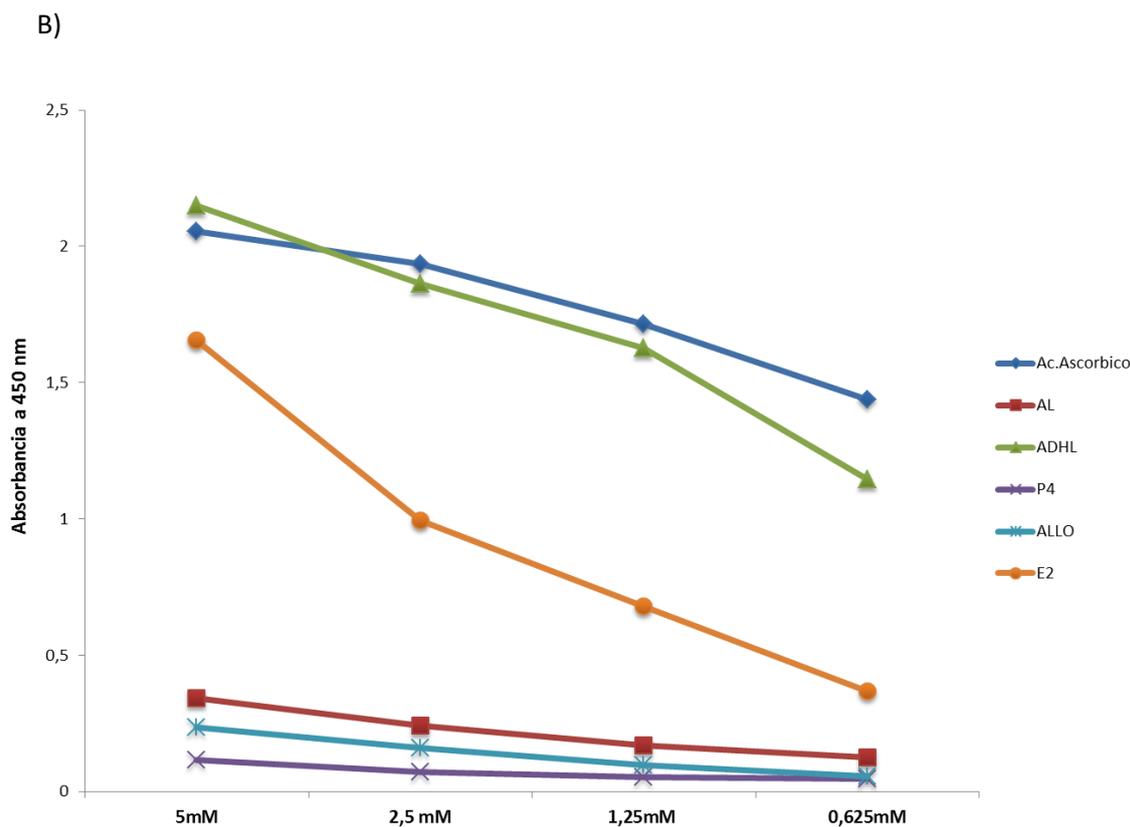
La Figura 41, muestra los resultados de la capacidad antioxidante total de cada una de las moléculas de estudio (ácido ascórbico, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol) a las diferentes concentraciones estudiadas (5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM) en función de su absorbancia medida a 450 mM. Tal y como cabría esperar, a medida que la concentración de producto es menor, la intensidad de su color disminuye, y por tanto su capacidad antioxidante total es menor.

Mediante este método colorimétrico, se puso de manifiesto como el ácido ascórbico (usado como control positivo) y el ácido dihidrolipoico, presentan un color naranja mas intenso que el resto de moléculas de estudio. Incluso, como demuestra el gráfico lineal (figura 41 B) el ácido dihidrolipoico a una concentración de 5 mM tiene mayor absorbancia que el ácido ascórbico. A concentraciones menores, el ácido dihidrolipoico va perdiendo su capacidad antioxidante

siendo menor esta capacidad, que el ácido ascórbico. En esta misma figura, se observa como el color naranja que se obtiene si hay reacción de reducción de cobre con el antioxidante, es muy débil cuando se analiza el ácido lipoico y progesterona en comparación con sus metabolitos correspondientes ácido dihidrolipoico, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol (Figura 41 A). Esto mismo se corrobora con el gráfico lineal (figura 41B) en el que la absorbancia de ácido lipoico y progesterona son más bajas en las diferentes concentraciones que sus metabolitos. Por otro lado, cabe destacar como el 17- $\beta$ -estradiol presenta una alta capacidad antioxidante total a una concentración de 5 mM, que disminuye bruscamente a medida que la concentración del mismo es menor.

A)



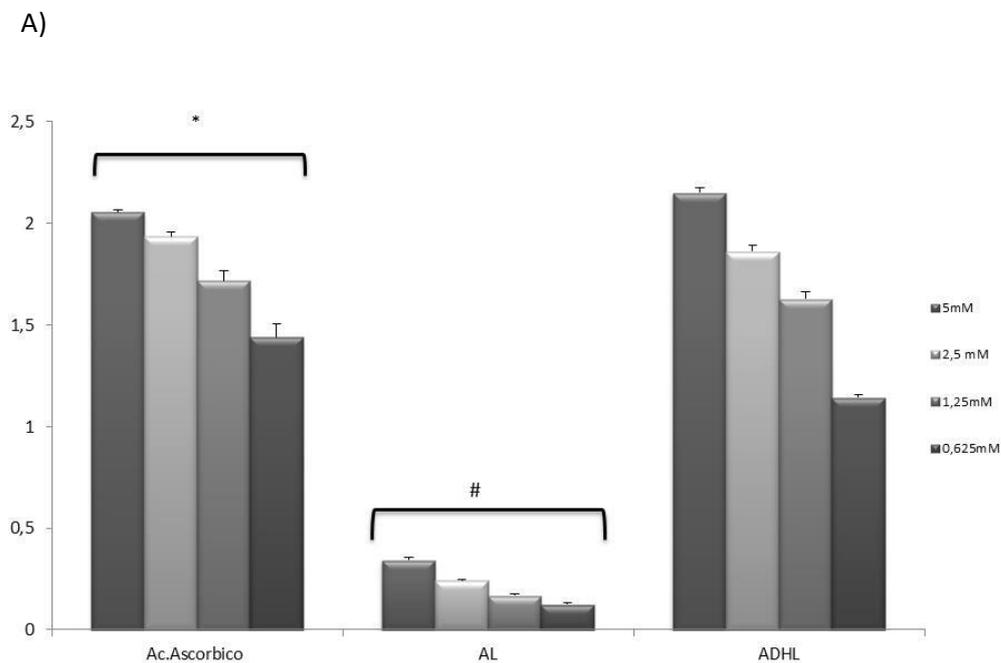


**Figura 41.- Determinación de la capacidad antioxidante total mediante el método CUPRAC.** A) Reacción de óxido-reducción de cobre utilizando la neocuproína por acción de la adición de ácido ascórbico (control positivo), ácido dihidrolipoico, ácido lipoico, progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol, a diferentes concentraciones (5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM). El color naranja debido a la oxidación del complejo cobre (I)-neocuproína, cobre (II), es más intenso en los metabolitos del ácido lipoico y de la progesterona, por lo tanto ya a simple vista se observa que tienen mayor capacidad antioxidante total. B) Grafico líneal de la absorbancia de cada uno de los compuestos en función de la concentración estudiada.

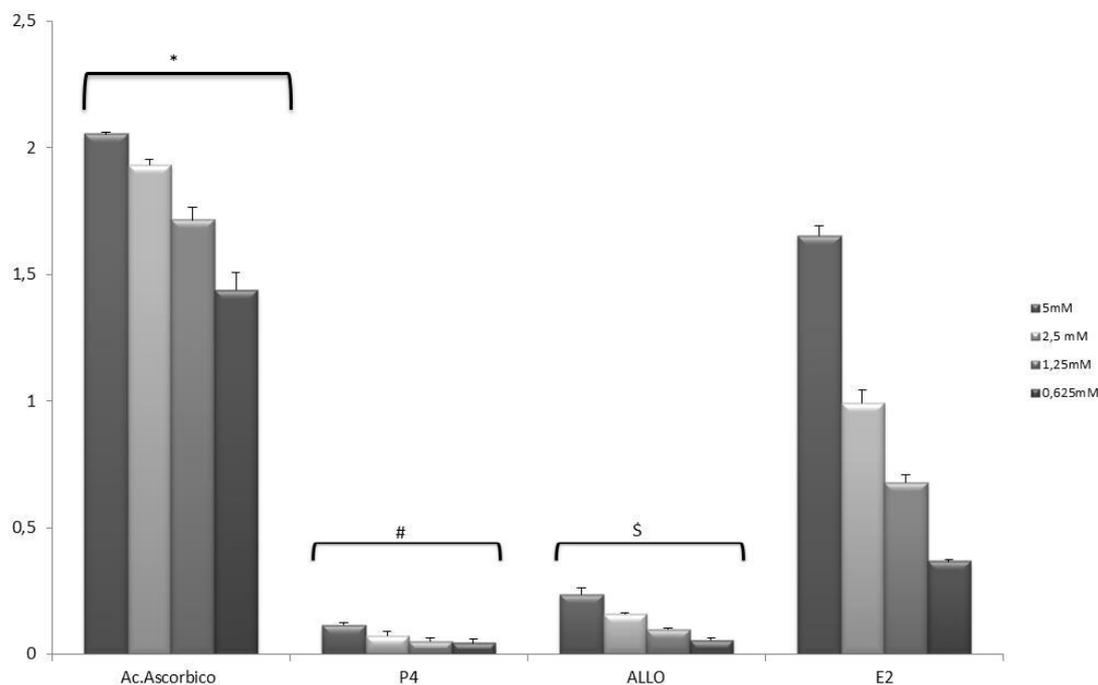
Al realizar el estudio estadístico, reflejado en la figura 42, en el apartado A) se comparó a las diferentes concentraciones establecidas (5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM), la capacidad antioxidante total del ácido ascórbico, el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico, observando que existen diferencias significativas entre el ácido ascórbico, que hemos usado como control positivo, y el resto de grupos de estudio (\* $p < 0,05$  ácido lipoico, ácido dihidrolipoico). De la misma manera se refleja que la capacidad antioxidante total obtenida del ácido lipoico es significativamente menor que la de su metabolito, el ácido dihidrolipoico ( $^{\#}p < 0,05$  vs ácido dihidrolipoico).

Repetimos el estudio anterior, pero comparando el control positivo, con las moléculas: progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ estradiol. La figura 42 B nos muestra cómo, el ácido ascórbico en todas las concentraciones de estudio, presenta una capacidad antioxidante total significativamente mayor que el resto de las moléculas estudiadas (\* $p < 0,05$  vs progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ estradiol). Además observamos como la progesterona tiene una capacidad antioxidante total significativamente menor que sus metabolitos, alopregnanolona y 17- $\beta$ estradiol ( $\#p < 0,05$  vs alopregnanolona y 17- $\beta$ estradiol).

Por otra parte comparando la capacidad antioxidante total de los metabolitos de la progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ estradiol, observamos como la alopregnanolona presenta una capacidad antioxidante total notablemente inferior a la capacidad antioxidante del 17- $\beta$ estradiol ( $\S p < 0,05$  vs 17- $\beta$ estradiol). Por lo que es este derivado de la progesterona, el 17- $\beta$ estradiol, el que mayor capacidad antioxidante total posee de las moléculas esteroideas que hemos estudiado. Posiblemente, este aumento de capacidad antioxidante sea debido a que posee más grupos hidroxilos y menos número de carbono en su estructura molecular, y por tanto sea más fácilmente oxidable



B)



**Figura 42.- Representación gráfica de la capacidad antioxidante total mediante el método CUPRAC.** A) Las barras representan la capacidad antioxidante total del ácido ascórbico, ácido lipoico y ácido dihidrolipoico, a diferentes concentraciones de 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs ácido ascórbico; # $p < 0,05$  vs ácido dihidrolipoico). B) Las barras representan la capacidad antioxidante total del ácido ascórbico, progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol, a diferentes concentraciones de 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,625 mM. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs ácido ascórbico; # $p < 0,05$  vs alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol; \$  $p < 0,05$  vs 17- $\beta$ -estradiol).

Estos resultados sugieren que son los metabolitos biológicos del ácido lipoico y la progesterona, en concreto el ácido dihidrolipoico y el 17- $\beta$ -estradiol respectivamente, los que poseen de manera intrínseca la capacidad antioxidante (figura 42).

## 5.2.- Evaluación de la actividad antioxidante

Para esta parte del estudio se utilizó un modelo topológico-matemático en búsqueda del potencial activo de nuestras moléculas de estudio a partir de una función lineal discriminante (FD). Los resultados obtenidos con la aplicación del método de diseño topográfico, ponen de manifiesto la capacidad antioxidante *per se* de las moléculas de estudio ácido lipoico, progesterona y sus metabolitos más conocidos, ácido dihidrolipoico y alopregnanolona y 17- $\beta$ -

estradiol, respectivamente. Además, como en el método CUPRAC, el ácido ascórbico se utilizó como control debido a su conocida capacidad antioxidante.

Aquellas moléculas cuyo resultado en la función lineal discriminante presenten un valor superior a +1, se considera que poseen una actividad antioxidante reconocida, y por lo tanto son consideradas moléculas antioxidantes activas, mientras que aquellas moléculas cuyo rango sea -1, se consideran moléculas sin actividad antioxidante reconocida y por lo tanto no activa.

En la siguiente tabla se expone los resultados de los diferentes coeficientes de nuestros compuestos:

	Ácido ascorbico	AL	ADHL	P4	ALLOP	E2
<b>C3SP2</b>	0	0	0	1	0	2
<b>nHBd</b>	4	1	3	0	1	2
<b>nHdsCH</b>	0	0	0	1	0	0
<b>nsCH3</b>	0	0	0	3	3	1
<b>nssSe</b>	0	0	0	0	0	0
<b>minHsOH</b>	0,63	0,72	0,72	0	0,30	0,26
<b>minHssNH</b>	0	0	0	0	0	0
<b>mindS</b>	0	0	0	0	0	0
<b>ETA_Epsilon_3</b>	0,43	0,43	0,43	0,45	0,45	0,45
<b>ETA_Psi_1</b>	0,39	0,60	0,60	0,63	0,63	0,62
<b>nHBacc</b>	6	2	2	2	2	1
<b>topoShape</b>	1	1	0,8	0,83	0,83	1
<b>FD</b>	<b>2,68</b>	<b>0,20</b>	<b>1,14</b>	<b>-2,75</b>	<b>-1,86</b>	<b>-0,99</b>

**Tabla 3.- Resultados de la evaluación antioxidante del ácido ascórbico, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, progesterona, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol en SPSS.** En donde, **C3SP2**: átomos de carbono con un doble enlace unidos a otros tres átomos de carbono; **nHBd**: recuento de E-estados para los átomos donantes de enlaces de hidrógeno; **nHdsCH**: recuento de E-estados de tipo de átomos =CH-. ; **nsCH3**: recuento de E-estados de tipo de átomos -CH3. ; **nssSe**: recuento de E-estados de tipo de átomo -Se -; **minHsOH**: mínimo E-estado de tipo de átomos -OH-; **MinHssNH**: mínimo E-estado de tipo de átomos -NH-. ; **MindS**: mínimo E-estado de tipo de átomo =S.; **ETA\_Epsilon\_3**: medida de la electronegatividad de los átomos. ; **ETA\_Psi\_1**: medida de la predisposición a formar enlaces de hidrógeno de las moléculas y/o el área de superficie polar; **nHBacc**: recuento de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno; **topoShape**: medida de la forma molecular; **FD**: función discriminante.

Nuestros resultados muestran cómo en un modelo topográfico, el ácido ascórbico posee una mayor capacidad antioxidante que ninguna de las otras moléculas de estudio (FD= 2,68), esto puede ser debido a que el valor de los descriptores nHBd y nHBacc son los más altos que se observan en la tabla. Por otra parte, los resultados muestran que el ácido lipoico (FD= 0,20) tiene un valor inferior a +1 y la progesterona (FD= -2,75) tiene un valor inferior a -1, considerándose moléculas no activas, y por lo tanto moléculas sin capacidad antioxidante.

Por otro lado, observamos que el metabolito del ácido lipoico, el ácido dihidrolipoico presenta una gran capacidad antioxidante con una FD= 1,14, en consonancia con los resultados obtenidos con el método CUPRAC. Esto es debido a que el valor de sus descriptores minHsOH, ETA\_Epsilon\_3, ETA\_Psi\_1, nHBacc y topoShape dan unos valores altos confiriéndole una FD mayor a +1, considerándose como una molécula con una actividad antioxidante reconocida, y por lo tanto una molécula antioxidante activa (tabla 3).

En el caso de los metabolitos de la progesterona, en consonancia con los datos obtenidos con el método CUPRAC, la alopregnanolona y el 17- $\beta$ -estradiol, aunque tienen una FD menor que 1, (FD= -1,86, FD= -0,99, respectivamente), es mayor a la presentada por la progesterona. Entre ellos el 17- $\beta$ -estradiol tiene un valor cercano a 1, posiblemente debido a los dos grupos -OH que contiene, por lo que se le podría considerar una molécula ligeramente activa (tabla 3).

# DISCUSIÓN



La RP es un trastorno complejo en el que, la imposibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas efectivas parece surgir del escaso conocimiento de los factores patogénicos desencadenantes y del elevado grado de especialización y de la vulnerabilidad intrínseca de las células afectadas, principalmente, de los fotorreceptores (Thompson G. et al., 2015; Daiger S.P. et al., 2007; Guadagni V. et al., 2015).

Actualmente las estrategias de clonación e identificación de mutaciones, parece ser, que han hecho de la terapia génica la primera cura disponible para la RP. Sin embargo, las posibilidades de éxito de esta terapia están seriamente comprometidas por dos factores importantes: 1) la terapia génica es más eficaz cuando se inicia el tratamiento antes de la aparición de la muerte celular de fotorreceptores (Shu X. et al., 2015; Colella P. et al., 2012), 2) la alta heterogeneidad genética de esta enfermedad requiere correcciones para cada mutación y en la práctica el número de pacientes con una misma mutación es muy pequeño. Esto significa que las terapias génicas deben ser individualizadas para cada paciente (Zheng A. et al., 2015; Petrs-Silva H. & Linden R., 2013).

Se ha visto como las terapias de neuroprotección por medio de factores antioxidantes (Cingolani et al., 2006; Komeima K. et al., 2006; 2007; Valter K. et al., 1998 y Yu X. et al., 2004; Shen J. et al., 2005; Miranda M. et al., 2007; 2010) o mediante la administración de neuroesteroides (Sánchez-Vallejo V. et., 2015; Kokona D. et al., 2012; Corrochano S. et al., 2008), dirigidas a tratar de disminuir los efectos producidos por las múltiples mutaciones que dan lugar a la RP, pueden resultar beneficiosas en diferentes modelos de ratones con RP. Esto hace suponer que el daño oxidativo contribuye a la muerte de los fotorreceptores, independientemente de la causa genética subyacente, preparando el terreno para el uso de estos compuestos para proteger contra el daño oxidativo como estrategia en el tratamiento de la RP.

El modelo animal mejor caracterizado para el estudio de la RP es el ratón rd1 o Pde6brd1 (Pittler S.J. & Baehr W., 1991). Una mutación en el mismo gen se ha encontrado en las formas humanas de RP autosómica recesiva haciendo del ratón rd1 un modelo ideal de RP (Miranda M. et al., 2010). El ratón rd1 lleva una mutación espontánea *nonsense* en el gen de la subunidad  $\beta$  de la PDE6 que causa la muerte masiva de los bastones en las primeras semanas de vida. Con el tiempo también mueren los conos como en la RP de los humanos (LaVail M.M. et al., 1997).

Por todo ello, con el objetivo de estudiar la efectividad del ácido lipoico y la progesterona, así como su combinación, para el tratamiento de la retinosis pigmentaria se ha utilizado en este

proyecto dos modelos de ratón: ratones control y rd1. Además hemos estudiado si la administración conjunta de ácido lipoico y progesterona resulta más beneficiosa que la administración de cada una de ellas por separado, sobre la muerte progresiva de los fotorreceptores que tiene lugar en la RP. En otro sentido, hemos estudiado la capacidad antioxidante *per se* de las moléculas de estudio, ácido lipoico y progesterona y de sus metabolitos, ácido lipoico, alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol respectivamente, para elucidar las posibles rutas metabólicas y mecanismos de acción, por los cuales estas moléculas ejercen finalmente su papel como neuroprotector

### **1.- LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA Y ÁCIDO LIPOICO DISMINUYE LA MUERTE CELULAR DE LOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINA DE LOS RATONES RD1.**

Enfermedades neurodegenerativas de la retina, como la RP, disminuyen su funcionalidad, lo que conduce a la deficiencia visual severa y generalmente incurable (Hanus J. et al., 2015; Klassen H., 2016; Murakami Y. et al., 2013). Aunque los mecanismos subyacentes de la enfermedad relacionados con este trastorno pueden variar, los eventos neurodegenerativos se caracterizan generalmente por la degeneración y pérdida de los fotorreceptores, la remodelación de las neuronas postsinápticas de segundo orden y la activación de células gliales, todo lo cual conduce a una alteración de la morfología de la retina y la considerable pérdida de capacidad funcional (Cuenca N. et al., 2014 ; Jones B.W & Marc R.E., 2005; Soto F. & Kerschensteiner D., 2015 ).

Se han propuesto varios mecanismos de muerte celular durante la progresión de la RP. De hecho, es sabido que la muerte progresiva de los bastones en la RP se produce a través de apoptosis (Chang G.Q. et al., 1993; Cottet S. & Schorderet D.F., 2009). Sin embargo, el modo por el que se produce la muerte de los conos ha sido menos caracterizado. La muerte celular programada o apoptosis es un proceso celular esencial para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas, evitando así desencadenar una reacción inflamatoria (Cascales-Angosto M., 2003).

Para la detección de la muerte celular se han desarrollado varios métodos bioquímicos. En nuestro estudio utilizamos la técnica TUNEL. Esta técnica detecta entre otras cosas las células apoptóticas (Grasl-Kraupp B. et al., 1995), de manera que la efectividad del tratamiento se correlaciona con una disminución del número de células TUNEL positivas.

A pesar de su etiología múltiple, la apoptosis es el destino final común de la RP así como de otras distrofias retinianas severas. No obstante, actualmente no hay un tratamiento que directamente esté dirigido a prevenir que las células de la retina se vean sometidas a la apoptosis (Chang G.Q. et al., 1993; Cottet S. & Schorderet D.F., 2009).

Se ha demostrado que el tejido de la retina es particularmente susceptible al daño oxidativo. De hecho, es uno de los tejidos metabólicamente más activo del cuerpo, contiene un número abundante de mitocondrias y se somete a un estrés fotoquímico constante (Jarrett S. G et al., 2008). Para contrarrestar este daño oxidativo, el cuerpo tiene a su disposición una serie de antioxidantes que, incluso en concentraciones muy bajas, son capaces de retrasar o inhibir la oxidación del sustrato, como por ejemplo el GSH (Halliwell B. et al., 1989). Pero también, una segunda línea de defensa está formada por compuestos antioxidantes endógenos, como es el ácido lipoico (Reed L. J. et al., 1951). Sin embargo, los humanos sólo pueden sintetizar pequeñas cantidades de ácido lipoico, de ácidos grasos y cisteína, por lo que es necesario su administración exógena (Packer L. et al., 2001; Wollin S.D & Jones P.J., 2003; Nebbioso M. et al., 2013).

Se cree que el estrés oxidativo juega un papel importante en la degeneración observada en la retina de varios modelos animales de RP. Varios estudios muestran como el ácido lipoico, ya sea solo, o en combinación con otros antioxidantes, puede disminuir el estrés oxidativo y la muerte de los fotorreceptores en estos modelos (Komeima K. et al., 2007; Komeima K. et al., 2006; Sanz M.M. et al., 2007). En este sentido, Zhao y colaboradores investigaron si la administración de ácido lipoico via intraperitoneal en ratones Balb/c, suponía una prevención eficaz de la degeneración retiniana inducida por la luz (*light damage*, LD), como fuente de producción de estrés oxidativo. Los resultados demostraron como el ácido lipoico redujo el número de fotorreceptores TUNEL-positivos inducidos por luz 7 días después de la administración del ácido lipoico (Zhao L. et al., 2014). Un estudio similar pero *in vitro* sobre un cultivo células ganglionares (*retinal ganglion cells* (RGC-5 cells)) mostró una disminución de las células TUNEL positivas en aquellas células que fueron tratadas con ácido lipoico. Además, numerosos estudios han demostrado los efectos neuroprotectores del ácido lipoico a través de su actividad antioxidante (Block F. et al., 1997). Las hormonas esteroideas juegan un papel regulador en una gran variedad de procesos como es la reproducción, el crecimiento, diferenciación, apoptosis y funciones del cerebro (Tsai S.K. & O'Malley B.W., 1994). Trabajos anteriores muestran como la progesterona tiene la capacidad de atenuar de disminuir la

apoptosis neural asociada con un daño en el sistema nervioso central (Gonzalez S.L. et al., 2009; Shahrokhi N. et al., 2010).

Existen pocos estudios sobre el papel neuroprotector y los efectos beneficiosos de la administración de progesterona sobre las patologías oculares, pero sí de sus derivados metabólicos más importantes (Cascio C., et al., 2015). En estudios llevados a cabo como el de Nakazawa y colaboradores se encontró como la progesterona no ofrecía protección en un modelo de daño en las células ganglionares de la retina (Nakazawa et al., 2006). A su vez, dos estudios independientes no pudieron demostrar los efectos protectores de la progesterona contra el estrés oxidativo inducido en la retina por luz (O'Steen W.K., 1977, Kaldi I. & Berta A., 2004). La mayoría de los estudios en se han centrado en el papel que juegan sobre el tratamiento de las patologías celulares, alguno de sus principales metabolitos como son la alopregnanolona y el 17- $\beta$ - estradiol.

En este sentido, se ha demostrado como el 17- $\beta$ -estradiol proporciona neuroprotección a las células ganglionares de la retina tanto *in vitro*, como *in vivo* en diferentes modelos animales frente a un daño oxidativo inducido (Arevalo M.A. et al., 2015; Cascio C., et al., 2015). Otros estudios han puesto de manifiesto como la inyección intravítrea de 17- $\beta$ -estradiol puede prevenir del daño inducido por la luz en la retina, probablemente debido a sus efectos neurotróficos y anti-inflamatorios (Mo M.S. et al., 2013). Russo y colaboradores demostraron como una administración sistémica de 17- $\beta$ -estradiol promueve la reducción de la muerte progresiva de las células ganglionares de la retina inducida por aumento de la presión intraocular, que se producen normalmente en el glaucoma agudo (Russo R. et al., 2008).

Sin embargo, Sánchez-Vallejo y colaboradores recientemente han puesto de manifiesto el papel neuroprotector de la progesterona en la retina de los ratones rd1. En dicho trabajo, se demostró como la administración oral de 100 mg/kg de peso corporal de progesterona cada 2 días, a partir del día post-natal 7, conserva significativamente el número de células fotorreceptoras en ratones rd1 (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015). Estos resultados avalan los obtenidos en el presente trabajo, en el que se observa cómo el número de células TUNEL positivas en las retinas de ratones rd1 a los que se les administró progesterona disminuyó significativamente en comparación con la retina de los ratones rd1 a los que no se les administró tratamiento (figura 27).

La disparidad existente de resultados entre unos estudios y otros podría ser debida a la variación existente en los estudios con luz, las especies animales, el régimen de dosis empleado o el origen de la progesterona (natural o sintética), ya que la progestina sintética no

siempre puede mimetizar los efectos fisiológicos de la progesterona (Doonan F. et al., 2011). Es por ello, que se necesitan más estudios para optimizar la dosis, elección del momento oportuno y vía de administración de la progesterona (Liu M. et al., 2010).

Además, actualmente se desconocen cómo se ponen en marcha las vías de señalización que concurren durante el tratamiento hormonal en las enfermedades neurodegenerativas, y que representan un punto crítico. Por lo que serían necesarios más estudios para comprender el mecanismo de acción por el cual ejercen, estas hormonas ejercen su mecanismo neuroprotector *in vivo* en modelos animales con retinosis pigmentaria. Aunque este tratamiento no parece inhibir el curso patológico de la enfermedad, parece ralentizar su progresión (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015).

En base a la hipótesis de que el tratamiento con ácido lipoico, progesterona y la combinación del ácido lipoico y la progesterona puede proteger de la muerte celular se estudió su posible efecto como neuroprotector en las diferentes partes de la retina de los ratones rd1 a día post-natal 11.

En nuestro modelo de ratón, la neurodegeneración de la retina comienza a día post-natal 10. En nuestro caso, en la figura 26 observamos como a día post-natal 11 existen diferencias significativas entre el número de células TUNEL positivas en la retina de los ratones control y rd1 en las diferentes partes de la retina (\* $p < 0,05$  vs control sin tratamiento,  $^{\$}p < 0,05$  vs control progesterona,  $^{\#}p < 0,05$  vs control ácido lipoico,  $^{\dagger}p < 0,05$  vs control ácido lipoico y progesterona), como cabría de esperar.

En este sentido nosotros hemos encontrado una reducción significativa de la muerte celular de los fotorreceptores de aquellos ratones rd1 a los que se les trató con progesterona (figura 27). Sin embargo, esta esta reducción es menor a la que observamos en la retina de los animales rd1 tratados con con ácido lipoico o con la combinación de ácido lipoico y progesterona ( $^{\$}p < 0,05$  vs rd1 ácido lipoico, ácido lipoico y progesterona), siendo estos mas eficaces.

En la figura 26 observamos cómo en las diferentes partes de la retina de los ratones rd1 a los que se les administró la dosis conjunta de ácido lipoico y de progesterona, presentan un número de células TUNEL positivas parecidas a las obtenidas en la retina de los ratones control. Esto demuestra que la combinación de ácido lipoico y progesterona puede tener un mejor efecto neuroprotector que cada una de las moléculas de estudio por separado, sobre todo en la periferia lejana (figura 26 C). En la figura 27 C (tabla) se observa como se produjo una disminución del porcentaje de células TUNEL positivas de aproximadamente de un 30% a

un 83%, entre aquellos animales no tratados con respecto a los animales tratados con ácido lipoico, progesterona y su combinación. En esta misma tabla observamos que el mayor porcentaje de reducción de células TUNEL positivas tiene lugar en aquellos animales rd1 a los que se les administró la combinación de ácido lipoico y progesterona en las diferentes partes de la retina (figura 27).

No se encontraron diferencias significativas en la reducción de la muerte de las células de la retina entre los animales rd1 tratados con ácido lipoico y los animales tratados con la combinación de ácido lipoico y progesterona. Esto último, puede ser debido a que habría que ajustar la dosis, la vía administración, la forma de combinarlas, etc..., por lo que sería necesario más estudios adecuando dichos parámetros para determinar si realmente esta combinación es eficaz. Nebbioso M. y colaboradores evaluaron la eficacia de un tratamiento combinado de ácido lipoico y superóxido dismutasa sobre las células ganglionares de la retina y en astrocitos del nervio óptico de ojos glaucomatosos, en un modelo animal de envejecimiento (cepa Wistar machos Harlan) (Nebbioso M., et al., 2015). En dicho estudio, no se observó una disminución de las células TUNEL positivas entre los animales no tratados y los tratados con la combinación y concluyeron que posiblemente esto fuera debido a la presencia de mecanismos no sinérgicos de acción entre la superóxido dismutasa y el ácido lipoico (Nebbioso M., et al., 2015). Principalmente, la superóxido dismutasa actúa en el entorno extracelular, y por el contrario el ácido lipoico actúa a nivel intracelular (Nebbioso M., et al., 2013; Reveillaud I. et al., 1991; Nebbioso M. et al., 2013). Por lo que se podría extrapolar esta posibilidad a nuestro caso, es decir, que la progesterona y ácido lipoico tuvieran mecanismos de acción diferentes y no sinérgicos, a través de los cuales ejercen su papel neuroprotector.

En la actualidad, muchas investigaciones están apostando por el uso de una terapia combinada con antioxidantes. La hipótesis parte del hecho, de que la combinación de estos puede presentar resultados más beneficiosos que cada uno de ellos por separado. Incluso, en el mercado ya existen diferentes medicamentos para la mejora de defectos visuales como DMAE, ojo seco, o cataratas, cuya composición química incluye varios principios activos con acción antioxidante: ácido ascórbico (Vitamina C), ácido lipoico, D- $\alpha$  tocoferol (Vitamina E), luteína....

La terapia combinada con antioxidantes está cobrando cada día mayor protagonismo para el tratamiento o prevención de las degeneraciones retinianas. Los trabajos previos en modelos animales han aportado información importante sobre la implicación del daño oxidativo en la muerte de los fotorreceptores. En estos modelos se han ensayado diversas estrategias terapéuticas dirigidas a neutralizar los radicales libres a través de la administración conjunta

de diferentes antioxidantes (ácido lipoico, vitamina C, tocoferol, etc.) (Komeima K. et al., 2006; Lu S.C. et al., 2009; Usui S. et al., 2009; Oveson B.C. et al., 2011). Por ejemplo, se ha observado como una combinación de ácido lipoico (100 mg/kg) (misma dosis utilizada en este trabajo) y Vitamina E (140 mg/kg) en conejos disminuyó la gliosis reactiva y mejoraba el rendimiento funcional (García-Estrada J. et al., 2003; González-Pérez O. et al., 2002).

Actualmente, incluso se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos administrando cócteles de antioxidantes compuestos por vitamina A, vitamina E, luteína y ácido docosahexanoico en pacientes con RP, en los que se han mostrado algún tipo de beneficio (Aleman T.S. et al., 2001; Berson E.L. et al., 2004; Berson E.L. et al., 2010). Además, algunas casas comerciales los empiezan a comercializar como suplemento alimentario (ácido dihidrolipoico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido lipoico...). Se ha descrito que una dieta rica en ácidos grasos omega-3 suplementada con vitamina A reduce la pérdida de la agudeza visual de cuatro a seis años (Berson E. L. et al., 2012) o que la combinación de luteína con vitamina A disminuye la pérdida de campo visual periférico en pacientes con RP (Berson E. L et al., 2010).

## **2.- LA GLIOSIS REACTIVA DISMINUYE TRAS EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y LA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LIPOICO Y PROGESTERONA**

La retina se considera un tejido inmune privilegiado y, por lo tanto, en él, operan una multitud de mecanismos para limitar la inflamación dañina que provocan las sustancias extrañas. Se cree que las células ganglionares de la retina representan la primera línea de defensa en la retina, desempeñando un papel importante en la depuración y posterior reconocimiento de patógenos durante la infección. A su vez, las células gliales son capaces de modificar sus posiciones con el fin de mantener la homeostasis, y además, colaboran en la actividad antiinflamatoria detectando lesiones en la retina y cambiando su morfología para ejercer como barrera protectora ante dicha lesión (Vecino E. et al., 2016).

En la retina, los astrocitos y células de Müller expresan en condiciones normales, poco o nada de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Bignami A. & Dald D., 1979; Lewis G.P. & Fisher S.K., 2003), pero cuando tiene lugar un daño retiniano agudo o crónico, se produce una activación de la gliosis reactiva en donde las células de Müller proliferan y se convierten en hipertróficas (Suria H., 1999; Wilding C. et al., 2015; Vecino E. et al., 2016).

Así pues, la gliosis reactiva es un fenómeno complejo que implica la activación y proliferación de la microglía y astrogliosis y la migración de estas células hacia los sitios de la lesión (Sofroniew M.V., 2009; Graeber M.B & Streit W.J., 2010; Lull M.E & Block M.L., 2010). Es la respuesta de las células gliales en el tejido neural, incluyendo la retina, a cualquier daño. El reclutamiento de células gliales a regiones dañadas se produce en casi todas las condiciones patológicas en el SNC y en una gama de patologías retinianas, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad, la RP, la degeneración de la retina de inicio tardío, el desprendimiento de retina, el glaucoma, la retinopatía diabética y en muchos modelos experimentales de degeneración de la retina (Gupta N. et al., 2003; Ghosh F. & Johansson K., 2012; Chong R.S. & Martin K.R., 2015; Kern T.S., 2014; Collier et al., 2014; Rutar M. et al., 2012; Karlstetter M. et al., 2015).

El aspecto más conocido de la respuesta glial en la retina es que las células de Müller expresan la proteína GFAP (Roesch K. et al., 2012). Las células de Müller en respuesta a una lesión o degeneración en la retina se vuelven inmunorreactivas y expresan niveles elevados de vimentina y de GFAP, lo cual altera las propiedades físicas de las células de la retina que se hacen más rígidas (Ekström P. et al., 1988; Strettoi E. et al., 2002; Strettoi E. et al., 2003; Lewis G.P. & Fisher S.K., 2003; Tackenberg M.A. et al., 2009; Robel S. et al., 2011). Esto permite establecer una cicatriz glial que constituye una barrera física y bioquímica para las infecciones, así como una barrera para la regeneración (Vecino E. et al., 2016; Karl M.O & Reh T.A, 2010). Estudios recientes han demostrado que las células de Müller participan activamente en la inmunidad innata de la retina, específicamente en condiciones infecciosas como la endofalitis bacteriana (irritación e inflamación del cerebro, casi siempre debido a infecciones), la fagocitosis, y en la secreción de citocinas y quimiocinas (Vecino et al., 2016).

En la RP se ha observado como la degeneración de los fotorreceptores va acompañada también de una gliosis reactiva con activación y migración de la microglía de las capas internas de la retina a las externas y al espacio subretiniano (Roque R.S. et al., 1996; Gupta N. et al., 2003; Zeng H.Y. et al., 2005; Peng B. et al., 2014). Durante la degeneración de los fotorreceptores en el ratón rd1 y en otros modelos de distrofias retinianas (el ratón chx10 y prph2 y la P23H, RCS y la rata S344ter), se ha observado como en la última fase de la degeneración retiniana, en donde los fotorreceptores empiezan a desaparecer completamente, existen cambios glióticos que incluyen el aumento de la expresión de la GFAP (Chua J. et al., 2013; Greferath U. et al., 2015; Strettoi E. et al., 2002).

Es necesario comprender los procesos celulares fundamentales que causan la degeneración de la retina, así como una mejor comprensión de los mecanismos de muerte celular, los cambios

anatómicos y funcionales anteriores a la pérdida total de los fotorreceptores en la retina, para el desarrollo de nuevas estrategias basadas en la prevención (Cuenca N. et al., 2014; Guadagni V. et al., 2015). Por esta razón, en este trabajo se ha estudiado la expresión de GFAP a día post-natal 11, es decir, antes de que se produzca la degeneración total de los fotorreceptores, así como el posible papel modulador del ácido lipoico, progesterona y la combinación de ambos sobre esta gliosis reactiva.

Nuestros resultados sugieren que la gliosis reactiva asociada a la degeneración en los ratones rd1 (tanto tratados como no tratados), como avalan otros trabajos en diversos modelos de degeneración retiniana, se encuentra altamente activada (Goel M. & Dhingra NK., 2012). Asimismo, se observa cómo a día post-natal 11 con el tratamiento con ácido lipoico, progesterona y la combinación de ácido lipoico y progesterona, la inducción de GFAP fue parcialmente o ligeramente inhibida en las diferentes partes de la retina (figura 28 y 29).

Numerosos estudios demuestran que el ácido lipoico es un excelente antioxidante (Osborne N.N., 2008; Santos J.M. & Kowluru R.A., 2011) también en el entorno ocular (Mérida S. et al., 2013) y que actúa protegiendo a la retina en su conjunto, (Chidlow G. & Schmidt K.G., 2002). A pesar de estos resultados positivos, la eficacia del ácido lipoico como un protector neural de la retina no se ha investigado (Wang Y. et al., 2006) en profundidad, más allá de los resultados publicados por nuestro grupo en modelo animal de uveítis (Mérida S. et al., 2013). En el presente trabajo, los resultados demuestran el posible papel tanto como antioxidante como antiinflamatorio del ácido lipoico. Estos resultados se reflejan en la figura 30, en la que observamos que existe una disminución significativa del marcaje de GFAP para los ratones rd1 tratados con ácido lipoico frente aquellos que no habían sido tratados ( $^{\#}p < 0,05$  vs ácido lipoico). De hecho en esta misma figura, observamos como existe una reducción de la gliosis reactiva de entre un 40% a un 75% en las diferentes partes de la retina entre los animales rd1 no tratados y aquellos a los que se les administró ácido lipoico (figura 30 B).

Pese a que la progesterona produzca una disminución de la gliosis reactiva menor a la obtenida con el tratamiento con ácido lipoico y con la combinación de ácido lipoico y progesterona en la retina de los ratones rd1 (figura 28, 29 y 30), numerosos estudios avalan su papel antiinflamatorio (Chen G. et al., 2008; Stein D.G. et al., 2008; Anderson M.E. et al., 2011; Sarkaki A.R. et al., 2013). En particular, se ha observado que la progesterona suprime la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias tras una isquemia cerebral, entre otras patologías y minimiza el aumento inducido por la isquemia de la IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$  (Gibson C.L et al., 2005) y TNF- $\alpha$  (Aggarwal R. et al., 2008). Además, la progesterona puede disminuir la

expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS; inducible nitric oxide synthase) *in vivo* (Coughlan T. et al., 2005, Gibson C.L. et al., 2005) y también *in vitro* (Coughlan T. et al., 2005, Muller E. & Kerschbaum H.H., 2006). Efectos similares se han obtenido con su precursor pregnenolona (García-Estrada R. et al., 1999) y uno de los estrógenos más potentes que derivan de la síntesis de la progesterona, el 17- $\beta$ -estradiol (Acáz-Fonseca E. et al., 2016).

Más recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado como la expresión de GFAP en la retina de los ratones rd1 tratados con progesterona vía oral (100 mg/kg) presenta una ligera disminución en comparación con los ratones rd1 no tratados, principalmente a día PN11, lo que sugiere que la progesterona puede inducir un retraso en la gliosis reactiva en la RP (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015).

En la presente tesis no evidenciamos que haya una disminución de la gliosis reactiva significativa entre los animales a los que se trató con ácido lipoico y aquellos a los que se trató con la combinación de ácido lipoico y progesterona, aunque, en el centro retina sí se observa una ligera disminución del marcaje de GFAP en aquellos ratones rd1 a los que se les administro la combinación de ácido lipoico y progesterona, de hecho, el área de la retina ocupada por el marcaje de GFAP en los animales rd1 no tratados y los tratados con la combinación de ácido lipoico y progesterona son muy parecidos en las diferentes partes de la retina (figura 30).

Hasta donde sabemos, este estudio ha sido el primero que se ha realizado utilizando una combinación de un neuroesteroide y un antioxidante, por lo que sería necesario seguir investigando para determinar la dosis óptima de ácido lipoico y progesterona necesaria para que se observara una disminución mayor de la expresión de GFAP y para establecer cual sería el mecanismo de acción subyacente a esta disminución.

Otra posibilidad sería utilizar esteroides en los que se ha observado una capacidad antioxidante y antiinflamatoria más potente que en la progesterona como es la alopregnanolona y/o el 17- $\beta$  estradiol. En concreto, se ha observado numerosos efectos beneficiosos del estradiol en el cerebro y cómo está implicado en la regulación de muchos procesos como son la supervivencia celular y la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control de la transmisión sináptica o la regeneración axonal (Maggi A. et al., 2004).

Finalmente, podemos concluir que nuestros datos sugieren que los efectos protectores de la progesterona o el ácido lipoico y la combinación de ambos sobre la retina de los ratones rd1, podrían estar mediados de forma parcial a través de la disminución de la gliosis, y de la apoptosis, conduciendo esto a la mayor supervivencia de los fotorreceptores.

### **3.- EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO, PROGESTERONA Y SU COMBINACIÓN SOBRE LA ENZIMA GLUTAMATO CISTEINA CATALASA EN LA RETINA DE RATONES CONTROL Y RD1 A DÍA POST-NATAL 11**

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) y los sistemas antioxidantes existentes en las células (Betteridge D.J., 2000). Estas especies reactivas son una parte esencial de la inmunidad innata que protege a las células de las infecciones pero también contribuyen a la patogénesis de enfermedades degenerativas.

Se ha sugerido que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la RP, tanto en modelos animales como en pacientes con RP (Komeima K. et al., 2007, Lee S.Y. et al., 2011b, Oveson B.C. et al., 2011). Existen varias hipótesis/teorías en cuanto a lo que conduce a la muerte de los fotorreceptores en RP, pero ninguno de ellos ha sido demostrada de manera definitiva (Bhatt L. et al., 2010).

Se sabe, que los bastones son más numerosos que los conos y son células metabólicamente más activas con un alto nivel de consumo de oxígeno. Los niveles de oxígeno en la periferia lejana de la retina varían inversamente con el consumo de oxígeno; es decir, cuando el número de bastones en un área particular de la retina disminuye, disminuye el consumo de oxígeno (porque no hay bastones que lo consuman), y por lo tanto aumentan los niveles de oxígeno. Por ello, la periferia lejana de la retina es la primera región que experimenta la muerte de los fotorreceptores, debido a su exposición a niveles peligrosamente altos de oxígeno y es por ello que en el caso de la RP el campo visual periférico se estrecha primero (Shen J. et al., 2005).

La *hipótesis oxidativa de la RP* postula que la muerte de los batones conduce a un aumento del estrés oxidativo, lo que eventualmente mata a los conos. Es decir, durante la progresión de la RP, cuando los bastones mueren como consecuencia de una mutación genética, el consumo de oxígeno en la retina disminuye y se produce una situación de hiperoxia que originaría daño oxidativo. Este daño afectaría a la supervivencia de las células de la retina, entre ellas los conos, y además exacerbaría la muerte de los bastones. Los elevados niveles de oxígeno favorecerían la acumulación de radicales  $O_2^-$  que, junto con otras ROS y RNS como el  $H_2O_2$  y los radicales  $OH\cdot$ , causarían importantes daños a lípidos, proteínas y al ADN (Usui S. et al., 2011).

En 2005, Shen y colaboradores demostraron en un modelo de cerdo transgénico de RP que tras la muerte de los bastones por mutaciones genéticas la hiperoxia generada causaba

peroxidación lipídica y daño oxidativo a proteínas y ADN que afectaba a la supervivencia de los conos (Shen J. et al., 2005). A su vez, Komeima y colaboradores confirmaron estos resultados en el ratón rd1. Además, observaron como la inyección de vitamina E y ácido  $\alpha$ -lipoico reducía la muerte de los conos al prevenir el daño oxidativo tras la muerte de los bastones (Komeima K. et al., 2006). También se ha visto en un modelo autosómico dominante de RP, ratas P23H, como la muerte de los fotorreceptores inducida por la hiperoxia incrementaba el estrés oxidativo y aceleraba la muerte de los fotorreceptores supervivientes (Yu D.Y. et al., 2004). Estos estudios apoyan la hipótesis oxidativa de la RP sugiriendo que los marcadores de estrés oxidativo, así como las enzimas antioxidantes pueden ser importantes dianas terapéuticas.

La retina es especialmente sensible al estrés oxidativo en comparación con otros órganos. En condiciones normales, la retina puede equilibrar los ERO generados con su propia defensa antioxidante. En concreto, en humor acuoso hay elevados niveles de ácido ascórbico o vitamina C (1 mM) y de glutatión (GSH) (2  $\mu$ M) (Umapathy A. et al., 2013), este último se encuentra en mayor cantidad en el cristalino (Aebi H. & Flohé L., 1974). Se sabe que las cantidades de GSH de la retina se mantienen gracias a su síntesis de *novo*, a la regeneración del disulfuro de glutatión (GSSG) y a la toma de GSH extracelular (Circu A.W., 2012). El GSH es el agente tiol más abundante y juega un papel crítico como antioxidante en el CNS (Dringen R., 2000). En algunas enfermedades neurodegenerativas cerebrales se ha visto como existe un agotamiento de GSH (Sian J. et al., 1994; Ramassamy C. et al., 2000), por lo que se considera como un evento temprano hacia la progresión de las enfermedades (Jenner P., 1994).

Como se ha explicado anteriormente, el paso inicial en la síntesis de GSH es catalizada por la ligasa glutamato cisteína (GCL), una enzima heterodimérica con una subunidad de 73 kDa catalítica (GCLC), que puede ser inhibida por GSH (Huang C.S. et al., 1993) y otra subunidad modificadora de 31-kDa (GCLM) (Griffith O. W. & Mulcahy R. T., 1999; Seelig G. F. & Meister A., 1984). En condiciones fisiológicas normales, la tasa de la síntesis de GSH se determina en gran parte por dos factores, la disponibilidad de cisteína y de la actividad GCL.

El estrés oxidativo causado por una variedad de agentes es una de los factores que se han asociado con los cambios que se producen en los niveles celulares de GSH y en la actividad de la GCL (Ishikawa T. et al., 1996, Woods J.S, et al., 1992, Shi M.M. et al., 1994, Liu R.M. et al., 1998 y Yamane Y. et al., 1998). En concreto, se ha visto cómo un aumento excesivo de las ERO conlleva una disminución de la acción de la enzima GCL y por tanto, un agotamiento de la producción de GSH. Por ejemplo, Liu y colaboradores han evaluado sistemáticamente el efecto del envejecimiento en roedores sobre la homeostasis de GSH en diferentes tejidos, y

encontraron que el nivel de GSH disminuye en todos los tejidos con la edad, debido a una disminución de la expresión génica de GS (Wang H. et al., 2003; Liu H. et al., 2004).

Pocos estudios han investigado el papel que desempeña la GCL en la retina en estado normal y patológico (Sánchez-Vallejo V. et al., 2016). Es por ello, que en la presente tesis, se estudió los posibles cambios en la subunidad GCLC asociados a RP en el modelo de ratón rd1, con el objetivo de poder comprender si esta enzima para hacer frente al estrés oxidativo. Nuestros resultados corroboran los obtenidos recientemente por nuestro grupo de investigación en la retina de los ratones rd1, control y C57 y rd10 (Sánchez-Vallejo V. et al., 2016).

En el mencionado estudio, se midieron las concentraciones de las dos subunidades de ligasa glutamato cisteína (GCLC y GCLM) en la retina de ratones control y rd1, a diferentes días post-natales (los días post-natales seleccionados correspondieron a las fases temprana, intermedia y final de la degeneración de la retina) y se observó que tanto la expresión de GCLC como la de GCLM disminuyó en la retina de ambos tipos de ratón con la edad. Además, se observó que en las fases tempranas de la degeneración retiana (a día post-natal 7 y a día post-natal 11), no existen diferencias significativas en la expresión de GCLC entre la retina de los ratones control y rd1 (Sánchez-Vallejo V. et al., 2016).

Por otra parte, se ha visto como el ácido lipoico puede actuar como un antioxidante indirecto mediante la inducción de la ligasa  $\gamma$ -glutamilcisteína (GCL), y otras enzimas de fase II que están implicados en la desintoxicación de compuestos xenobióticos (Suh J.H. et al., 2004). Estos resultados, juntos con otros estudios previos (Suh J.H. et al., 2004; Liu J. et al., 2002; Han D. et al., 1997), demuestran el papel del ácido lipoico sobre el aumento de los niveles de mecanismos de protección asociados a la activación de GSH (Suh J.H. et al., 2004). De hecho, estudios recientes han revelado que el ácido lipoico ejerce un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo en las neuronas de la retina, a través de la activación de GSH (Koriyama Y. et al., 2013; Liu B. et al., 2012).

En relación con la progesterona, existen muy pocos estudios que relacionen la actividad de la GCLC y del GSH en la retina de ratones con RP. En la retina, autores como Ishikawa y colaboradores entre otros, han observado en un modelo *ex vivo* de glaucoma en ratas, que el aumento de glutamato y del calcio intracelular provocado por una presión inducida, puede desencadenar la síntesis de neuroesteroides (Ferrarese C. et al., 1991, Guarneri C. et al., 1998, Ishikawa H. et al., 2014). En este sentido, estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio reflejaron cómo no existían diferencias significativas en la actividad de la GSH entre

los animales rd1 no tratados y los animales rd1 tratados con una dosis de progesterona conocida (100 mg/Kg) a día post-natal 11, pero sí a días posteriores justo después del pico de la degeneración (Sanchez- Vallejo V., 2015).

No obstante, según nuestros resultados, el ácido lipoico, la progesterona y su combinación no tiene efecto a nivel de la expresión de la enzima GCLC, al no observarse diferencias en la expresión de la GCLC en los grupos tratados (control y rd1 tratado) respecto de los correspondientes grupos no tratados con ácido lipoico, progesterona y su combinación en las diferentes partes de la retina (figura 31y 32) a día post-natal 11. Sin embargo, en la figura 33 A si que observa una disminución significativa de la expresión de GCLC en la periferia lejana de la retina de los ratones rd1 a los que se les administró la dosis conjunta de ácido lipoico y progesterona, en comparación en la misma parte de la retina, con los animales rd1 a los que no se les administró tratamiento (\* $p < 0,05$  vs rd1 sin tratamiento) (figura 33 A).

Estos resultados contrastan con lo demostrado por otros autores que han empleado compuestos como el lípido sintético ebselen, con objetivos similares. En estos estudios se ha determinado que dicho compuesto, era capaz de activar la GPx y la GCLC (Lee J.M & Johnson J.A., 2004, Tamasi V. et al., 2004, Tan V. et al., 2015) y también de proteger contra el estrés oxidativo en tejidos, incluido la retina (Nakamura Y. et al., 2002, Uno K. et al., 2010, Xu X. et al., 2014).

Hasta donde tenemos constancia, es la primera vez que se estudia el efecto de dicha combinación sobre la expresión de GCLC y por lo tanto de la síntesis de GSH, por lo tanto sería necesarios mas estudios para entender el mecanismo por el cual puede actuar como posible neuroprotector temprano ante un aumento del estrés oxidativo que tiene lugar en la RP.

#### **4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE UN CULTIVO CON CÉLULAS ARPE- 19.**

El epitelio pigmentario retiniano (EPR), es una monocapa de células epiteliales, cuya función principal es la de actuar como barrera hemato-retiniana para controlar el transporte de nutrientes y metabolitos de la retina, mientras que de forma secundaria se incluyen funciones metabolizadoras y de reciclaje, así como la secreción de factores de crecimiento para los fotorreceptores (Strauss O. et al., 2005), por lo que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la función visual normal (Cai Z. et al., 2000). Se sabe que, el EPR es muy vulnerable al estrés oxidativo con una elevada tensión de oxígeno y está expuesto a la luz que puede ser fototóxica (Wu J. et al., 2006; Li Y. et al., 2014; Mettu P.S. et al. 2012; Beatty S. et al.,

2000). Sin embargo, no se entiende completamente cómo el estrés oxidativo induce lesiones en el RPE. Actualmente, no se dispone de ningún agente farmacológico clínicamente eficaz que pueda proteger a las células del RPE de la lesión inducida por el estrés oxidativo.

#### **4.1.- La inducción de estrés oxidativo mediante peróxido de hidrogeno disminuye significativamente la viabilidad celular en las células ARPE-19**

El tratamiento con  $H_2O_2$  en cultivos celulares es un modelo comúnmente usado para probar la susceptibilidad al estrés oxidativo o la eficiencia antioxidante en tipos celulares con alto riesgo de daño oxidativo *in vivo* (Kaczara P. et al., 2010, Zheng M. et al., 2010, Jia L. et al., 2011) como es el caso de las células del RPE.

Las diferentes sensibilidades de las células al  $H_2O_2$  son debidas al tipo celular del que se trate y a los diferentes mecanismos antioxidantes que pueden contrarrestar los efectos de las concentraciones de  $H_2O_2$ . En el presente trabajo, se realizó un estudio de inducción del estrés oxidativo con  $H_2O_2$  en células del RPE, las células ARPE-19. Nuestros resultados demuestran que la aplicación de dosis crecientes de  $H_2O_2$  a células en cultivo provoca una disminución de la viabilidad celular dosis-dependiente. El ensayo MTS puso de manifiesto que a 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$  tuvo lugar una disminución significativa de la viabilidad celular (44,90 % de disminución), disminución relativamente suave si la comparamos con las posteriores concentraciones crecientes de 750  $\mu M$  y 1000  $\mu M$  de  $H_2O_2$  (95,17 % y 97,80 % de disminución respectivamente). Por lo tanto, elegimos la dosis de 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$  como la concentración de referencia para los siguientes experimentos, pues parecía que esta concentración era la adecuada para demostrar si tanto el ácido lipoico como la progesterona son capaces de apoyar el sistema endógeno de defensa antioxidante para mejorar la viabilidad celular (figura 34).

Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Yu L. y colaboradores, los cuales demostraron que el  $H_2O_2$  induce a la apoptosis en células ARPE-19 de una manera dependiente de la concentración (Yu L. et al., 2014).

#### **4.2.- Protección de la viabilidad celular de las células ARPE- 19, tras la inducción de estrés oxidativo, mediante ácido lipoico y progesterona.**

Tomando como base investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio, utilizamos diferentes dosis de ácido lipoico y progesterona en las células ARPE-19, los resultados obtenidos evidenciaron en primer lugar que, estos compuestos por sí mismos no afectaban a

la viabilidad de las células que no habían sido sometidas previamente a ningún tipo de estrés, en ninguno de los experimentos realizados de pre-tratamiento y co-inducción (figuras 35 y 36).

El efecto del ácido lipoico en nuestro estudio apoya el hallazgo que constatan otros autores sobre los efectos protectores del ácido lipoico en las células ARPE-19 a través de la inhibición del estrés oxidativo (Lin J. et al., 2006; Ilnat M.A. et al., 2006). En este sentido, se ha visto como el ácido lipoico usado como pretratamiento tiene un efector protector tanto en células primarias humanas fetales, como en el RPE en condiciones de estrés oxidativo inducido (Jia L. et al., 2015; Jia L. et al., 2007). Recientemente, Li Y. y colaboradores, para demostrar el papel protector del ácido lipoico, incubaron las células ARPE-19 con una concentración determinada de  $H_2O_2$  durante 30 min y posteriormente se incubaron con o sin ácido lipoico durante 0, 2, 4, 6, 8, y 10 horas. Los resultados obtenidos demostraron que el ácido lipoico administrado fue capaz de mitigar el efecto del  $H_2O_2$  en la inducción de la apoptosis en las células ARPE-19 (Yun L. et al., 2015).

Nuestros resultados demuestran que la aplicación de dosis crecientes de ácido lipoico sobre las células ARPE-19 produce una tendencia al aumento de la supervivencia celular ante un daño oxidativo inducido con  $H_2O_2$ . Estos resultados se ponen de manifiesto tanto en las células pre-tratadas como las co-incubadas (figura 37 y 39). En concreto, la figura 37 pone de manifiesto un aumento significativo del porcentaje de la viabilidad celular de ARPE-19 en aquellas a las que les administró ácido lipoico previmente al daño oxidativo inducido, en comparación a aquellas que no fueron tratadas (figura 37), observándose un aumento del porcentaje de la viabilidad celular aproximadamente en un 50% cuando estas células son pre-tratadas con 1000  $\mu$ M de ácido lipoico (figura 37 B).

En este mismo sentido, las células ARPE-19 a las que se les indujo un daño oxidativo al mismo tiempo que fueron tratadas con diferentes dosis de ácido lipoico, observamos que existe una tendencia al aumento de la viabilidad celular pero, únicamente se observa un aumento significativo cuando la dosis administrada era de 1000  $\mu$ M de ácido lipoico (figura 39 A), con un aumento de la viabilidad celular de un 70% (figura 39 B).

En conjunto nuestros resultados demuestran el poder protector del ácido lipoico como tratamiento ante la inducción de estrés oxidativo mediante  $H_2O_2$ , sin embargo el porque es más efectivo como pretratamiento que como co-tratamiento se podría explicar debido a que su mecanismo de acción es fundamentalmente biológico (Packer L. et al., 1995). En la co-incubación al producirse el daño simultáneamente con la administración de ácido lipoico, es posible que las células no sean capaces de reducir el ácido lipoico y por eso observemos una

menor supervivencia celular en comparación a la observada cuando las células han sido tratadas anteriormente de producirse el daño oxidativo.

Diversos estudios han revelado el papel protector de diferentes antioxidantes sobre el daño oxidativo inducido en las células ARPE-19 a unas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similares a las utilizadas en nuestro estudio. En este sentido, por ejemplo, se ha visto como existe un aumento de la viabilidad celular tras la inducción de estrés oxidativo a través de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando las células ARPE-19 fueron tratadas con los polisacáridos de *Lycium barbarum* (planta de las bayas de Gogi) (Liu L. et al., 2015), el tratamiento conjunto de una combinación de luteína y zeaxantina (Xu et al., 2013), la curcumina (Woo J.M. et al., 2012), la astaxantina (Li Y. et al., 2013), o la vitamina C (Wei W. et al., 2014)...

Por otro lado, con el objetivo de conocer si el mecanismo de acción neuroprotector de la progesterona es debido a su efecto antioxidante, sometimos a las células ARPE-19 a un estrés oxidativo inducido tal y como lo habíamos realizado anteriormente con el ácido lipoico. Nuestros resultados demuestran que la aplicación de dosis crecientes de progesterona ante la inducción de un daño oxidativo no provoca una disminución significativa de la viabilidad celular de las células ARPE-19 (figura 38). Es más, podemos observar que cuando las células son tratadas conjuntamente con 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las células que fueron tratadas con progesterona con una concentración mayor a 20 µM presentaban un porcentaje de viabilidad celular menor a las células que no fueron tratadas con progesterona (figura 40).

En conjunto nuestros datos sugieren que los efectos protectores del ácido lipoico podría estar mediados de forma parcial a través de la inhibición del estrés oxidativo sobre todo cuando es administrado de manera preventiva ante un daño oxidativo inducido, conduciendo esto a la mayor supervivencia de las células ARPE-19. Sin embargo, aunque los otros resultados previos han sugerido que la progesterona protege frente al daño mediados de forma parcial a través de la disminución de la apoptosis y la gliosis en un modelo de ratón rd1, *in vitro* la progesterona no muestra la capacidad de reducir el estrés oxidativo, por lo que esta molécula debe de tener otro mecanismo de acción por el cual lleve a cabo su poder como neuroprotector conduciendo esto a una mayor supervivencia de los fotorreceptores.

## 5.- LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO LIPOICO Y LA PROGESTERONA SE EJERCE A TRAVÉS DE SUS PRINCIPALES METABOLITOS

El estudio del estrés oxidativo ha cobrado una considerable importancia debido a las numerosas consecuencias que puede tener sobre la salud. Hoy en día, conocer la actividad antioxidante de las moléculas (que se pueden encontrar en los alimentos, suplementos nutricionales o ser sintetizadas por nuestro propio organismo), se está convirtiendo en un objetivo esencial para el desarrollo de nuevas terapias que ayuden a la prevención contra el daño oxidativo crónico y que dará lugar a la aparición de aquellas patologías que se encuentran asociadas al estrés oxidativo. Sin embargo, existen muy pocos estudios que se centren en analizar la estructura molecular mediante un método topológico matemático y relacionarlo con su actividad antioxidante mediante un método colorimétrico como CUPRAC.

El ácido lipoico deriva del ácido octanoico y contiene dos átomos de azufre unidos mediante un puente disulfuro, es un compuesto de origen natural (Shay K.P., et al., 2009), que tiene un centro quiral y por lo tanto existe en dos formas R y S enantiómeros (Shay K.P., et al., 2009; Gomes M.B., et al., 2014).

EL ácido lipoico es conocido por estar reducido a ácido dihidrolipoico a través de la deshidrogenasa mitocondrial dihidrolipoamida, la glutatión reductasa citosólica, y la tioredoxina reductasa (Slepneva I.A. et al., 1995; Bilska A. et al., 2005; Arner E.S.J. et al., 1996). Además, se sabe que el ácido dihidrolipoico tiene un actividad antioxidante más fuerte que el ácido lipoico debido a su grupo tiol (Zhao F. et al., 2011). Nuestros resultados muestran que el ácido lipoico no presenta una actividad antioxidante tan grande como cabría esperar tanto mediante el método CUPRAC (figura 41 y 42 A) como con el modelo topológico matemático (FD=0,20). Esto quizá es debido a su mecanismo de acción fundamentalmente biológico (Packer L. et al., 1995), y el ciclo de su estructura química, con dos átomos de azufre unidos y la falta de un grupo tiol ( $^{\#}p < 0,05$  vs ácido dihidrolipoico; FD=1,14) (figura 42 A). De hecho, Zhao L. et al., pusieron de manifiesto que la superior actividad antioxidante del ácido dihidrolipoico frente al ácido lipoico podría ser debida a la presencia del grupo tiol libre que presenta el ácido dihidrolipoico y del que carece el ácido lipoico (Zhao L. et al., 2011), en consonancia con los resultados obtenidos.

Tanto el ácido lipoico como el ácido dihidrolipoico se consideran potentes agentes antioxidantes naturales con capacidad de eliminación de muchas especies reactivas del

oxígeno (Scott B.C., et al., 1994; Packer L., et al., 1995). Se ha demostrado como estos tienen algunas ventajas importantes sobre otros agentes antioxidantes tales como la vitamina E y C, ya que presentan propiedades anfifílicas que le confieren sus acciones antioxidantes (Gomes M.B. & Negrato C.A., 2014; Golbidi S. et al., 2001; Scott B. C et al., 1994). Nuestros resultados demuestran como el ácido dihidrolipoico posee más capacidad antioxidante que el ácido ascórbico en la reacción de óxido-reducción que se da mediante CUPRAC, pero no en el método topológico matemático (FD=2,68). Esto puede ser debido a que el modelo matemático solo tiene en cuenta los descriptores establecidos sin tener en cuenta las reacciones que estos pueden llevar a cabo en las reacciones de oxido-reducción.

Por otra parte, hemos estudiado la capacidad antioxidante intrínseca de la progesterona (pregn-4-ene-3, 20-dione, progesterona), hormona esteroide C-21 (con una cadena lateral de 2 átomos de carbono en el C17) (García-Segura L. & Melcangi R., 2006), que se sintetiza principalmente por el ovario en la mujer, y los testículos y la corteza adrenal en el varón. Si bien, los niveles de progesterona son generalmente más altos en las hembras, vale la pena señalar que durante la fase folicular del ciclo menstrual femenino los niveles de progesterona son similares a las observadas en los hombres (Strauss J. & Barbieri R., 2004), y por lo tanto, pueden ser igualmente importantes en los varones.

Los resultados obtenidos sobre la capacidad antioxidante de la progesterona mediante el método de CUPRAC ( $^{\#}p < 0,05$  vs alopregnanolona y 17- $\beta$ -estradiol) y mediante la topología molecular (FD= -2,75), pusieron de manifiesto que no poseía capacidad antioxidante, resultado que cabría esperar, ya que la progesterona no es considerado como antioxidante. Esto es debido a que la progesterona presenta un doble enlace en el C4, tres grupos metilo y dos grupos cetónicos. De hecho, la progesterona es considerado un neuroesteroide y no como un antioxidante aunque muchos estudios avalen su poder como antioxidante (Sánchez-Vallejo V. et al., 2015).

La progesterona es rápidamente metabolizada en el cerebro por las enzimas 5 $\alpha$ / $\beta$ -reductasa y se convierte en 5 $\alpha$ / $\beta$ -dihidroprogesterona (5 $\alpha$ / $\beta$ -DH PROG). A continuación, se produce una reducción de este en la posición C3, por la enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa enzima (3 $\alpha$ -HSOR), que da lugar a la alopregnanolona (3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one) (Celotti F. et al., 1992, Guarneri P. et al., 1998, Mellon S.H & Vaudry H., 2001, Stoffel W., 2001, Belelli D. & Lambert J.J., 2005, Rone M.B. et al., 2009). Los resultados muestran como el metabolito, tampoco presenta una alta capacidad antioxidante aunque si ligeramente superior a la

progesterona, hecho que podría explicarse por la ruptura del doble enlace en el C4 y el grupo hidróxilo en C3 (figura 41 y 42 B).

Los efectos beneficiosos del 17- $\beta$ -estradiol en el cerebro implican la regulación de muchos procesos como la supervivencia celular y la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control de la transmisión sináptica o la regeneración axonal (Maggi A. et al., 2004). Y afectan al menos a los principales componentes del cerebro: las neuronas, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células microgliales (Tripanichkul W. et al., 2007; Dhandapani K.M. & Brann D.W., 2007; Zhu T.S. & Glaser M., 2008; BruceKeller A.J. et al., 2000).

La molécula de estradiol, tiene efecto neuroprotector en sí misma, debido a las propiedades antioxidantes que le confiere el grupo hidroxilo que el anillo A presenta en la posición C3 (Behl C. et al., 1997). El estradiol (E2 (17 $\beta$ )-estra-1, 3,5 (10)-trieno-3,17-diol) es el estrógeno natural más potente en seres humanos seguido por la estrona y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El estradiol, a excepción de su región terminal, es una molécula apolar e hidrofóbica. La flexibilidad conformacional del esqueleto estratrieno reside en el anillo B (Duax W.L y Weeks C.M, 1980) probablemente, debido a sus uniones en una conformación de baja energía. El grupo fenólico -OH del anillo A presenta una energía libre de unión que le hace actuar fundamentalmente como un enlace donador de hidrógeno. Por su parte, el grupo 17- $\beta$ -hidroxilo del anillo D presenta una energía libre inferior a la del grupo fenólico del anillo A y suele actuar como un enlace aceptor de hidrógenos, ya sea directamente o a partir de una molécula de agua.

Datos recientes apuntan que la alopregnanolona presenta un efecto protector contra varias patologías, restaurando el estado redox intracelular (Zampieri S. et al., 2009; Raso G.M., et al., 2011; Afrazi S. et al., 2014). Aunque todavía no ha sido bien dilucidado como la alopregnanolona ejerce neuroprotección al reducir el estrés oxidativo, Qian X. y colaboradores en un modelo de Alzheimer propusieron que el papel protector de alopregnanolona pudiera ser que se realizara a través de la inhibición del estrés oxidativo intracelular (Qian X. et al, 2015) disminuyendo las concentraciones intracelulares de ERO mediante la mejora de la actividad de la enzima SOD.

Todo ello concuerda con los resultados obtenidos en el método de CUPRAC, en donde se observaba que la capacidad antioxidante total del estradiol es significativamente mayor que la de la progesterona (figura 42 B), lo cual se observa a simple vista en el método CUPRAC y también en el modelo topográfico en el que la  $FD = -0,99$ . Aunque según estos datos, el estradiol no se podría considerar una molécula con capacidad antioxidante activa, el valor  $FD$  es más cercano a +1 que el de la progesterona y la alopregnanolona.

En conjunto nuestros resultados sugieren que los posibles efectos protectores del ácido lipoico, la progesterona y la combinación de ambos, podrían estar mediados, aunque sea de forma parcial, a través de la disminución de la apoptosis, la gliosis, y la inhibición del estrés, para una mayor supervivencia de los fotorreceptores en las fases tempranas de la enfermedad en los ratones *rd1*. Por lo que el uso de neuroesteroides como la progesterona, la alopregnanolona y/o el 17- $\beta$ -estradiol, así como el uso de ácido lipoico y/o ácido dihidrolipoico y la utilización combinada de todos ellos, podrían ser una posible nueva vía para la prevención temprana de la muerte progresiva de los fotorreceptores en la RP, considerándose una nueva estrategia de neuroprotección para la RP.



# **CONCLUSIONES**



1. – Acid lipoic, progesterone and their combined treatment, decrease cell death in an experimental model of RP, the rd1 mice.

1.1. – Acid lipoic, progesterone and their combined oral treatment, are able to protect photoreceptors from death in the retina of rd1 mice. The number of TUNEL positive cells after these three different treatments in the retina from rd1 mice at post-natal day 11 decrease when compared to the number of TUNEL cells in the non treated rd1 mice.

1.2. - *In vivo*, characteristic gliosis observed in the retina of the rd1 mice model is decreased after oral treatment with acid lipoic, progesterone and their combination at post-natal day 11.

1.3. - A slight decrease of GCLC expression was observed in the retina of rd1 mice treated with the combination of lipoic acid and progesterone when compared to rd1 mice treated with lipoic acid or progesterone alone.

2. – Lipoic acid and progesterone increased survival of ARPE-19 cells that where subjected to oxidative stress.

2.1. - Higher concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced higher apoptosis in ARPE-19 cells. The dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selected for our studies was 500 μM.

2.2. - Lipoic acid and progesterone have no toxic effects on ARPE-19 cells.

2.3. - Pre-treatment with increasing concentrations of lipoic acid decreased cell death induced by oxidative damage in ARPE-19 cells. In contrast, progesterone has no effect on an *in vitro* model of oxidative damage.

2.4. - Lipoic acid is able to protect ARPE-19 cells against induced oxidative damage when lipoic acid was co-incubated together with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, the co-incubation of progesterone with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has no effect on ARPE-19 cells.

3. - The reduced form of lipoic acid, dihydrolipoic acid shows a higher total antioxidant capacity, as demonstrated by the CUPRAC method, than lipoic acid. Allopregnanolone and 17-β-estradiol show higher total antioxidant capacity than progesterone.

4. - The molecular structures *per se* of lipoic acid and progesterone showed a discriminant function lower than 1, so these molecules are considered non-active molecules, without antioxidant capacity.

4.1. - Dihydrolipoic acid is considered and active molecules with antioxidant capacity.

4.2.-Allopregnanolone and 17-β-estradiol show a discriminant function inferior to 1. However this value is higher than the one obtained for progesterone, demonstrating that they have better antioxidant properties than progesterone.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Acaz-Fonseca, E., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., & Barreto, G. E. (2016). Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology*, 144,5-26.
- Acosta, M. L., Fletcher, E. L., Azizoglu, S., Foster, L. E., Farber, D. B., & Kalloniatis, M. (2005). Early markers of retinal degeneration in rd/rd mice. *Molecular Vision*, 11, 717-728.
- Afrazi, S., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., & Abbasnejad, M. (2014). Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: In vitro and in vivo studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 98-103.
- Aggarwal, R., Medhi, B., Pathak, A., Dhawan, V., & Chakrabarti, A. (2008). Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 731-737.
- Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2007). Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA (A) receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 116, 35-57.
- Akpinar, D., Yargicoglu, P., Derin, N., Aliciguzel, Y., & Agar, A. (2008). The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 57, 893-901.
- Aleman, T. S., LaVail, M. M., Montemayor, R., Ying, G., Maguire, M. M., Laties, A. M., et al. (2001). Augmented rod bipolar cell function in partial receptor loss: An ERG study in P23H rhodopsin transgenic and aging normal rats. *Vision Research*, 41, 2779-2797.
- Allen, R. S., Olsen, T. W., Sayeed, I., Cale, H. A., Morrison, K. C., Oumarbaeva, Y., et al. (2015). Progesterone treatment in two rat models of ocular ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56, 2880-2891.
- Allocca, M., Manfredi, A., Iodice, C., Di Vicino, U., & Auricchio, A. (2011). AAV-mediated gene replacement, either alone or in combination with physical and pharmacological agents, results in partial and transient protection from photoreceptor degeneration associated with betaPDE deficiency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 5713-5719.

- Anasagasti, A., Irigoyen, C., Barandika, O., Lopez de Munain, A., & Ruiz-Ederra, J. (2012). Current mutation discovery approaches in retinitis pigmentosa. *Vision Research*, 75, 117-129.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Ardeljan, D., & Chan, C. C. (2013). Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 68-89.
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16, 17-29.
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16, 17-29.
- Arivazhagan, P., Juliet, P., & Panneerselvam, C. (2000). Effect of dl-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacological Research*, 41, 299-303.
- Arner, E. S., Nordberg, J., & Holmgren, A. (1996). Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225, 268-274.
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D., & Pugh, E. N., Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annual Review of Physiology*, 64, 153-187.
- Assaf, F., Zhang, J., & Ogilvie, J. M. (2015). Phosphodiesterase 6 $\beta$  Expression in Developing Mouse Retina. *Impulse (Columbia, S.C.)*, 2015,
- Audo, I., Friedrich, A., Mohand-Said, S., Lancelot, M. E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., et al. (2010). An unusual retinal phenotype associated with a novel mutation in RHO. *Archives of Ophthalmology*, 128, 1036-1045.
- Ayuso, C., & Millan, J. M. (2010). Retinitis pigmentosa and allied conditions today: A paradigm of translational research. *Genome Medicine*, 2, 34.

- Backstrom, T., Carstensen, H., & Sodergard, R. (1976). Concentration of estradiol, testosterone and progesterone in cerebrospinal fluid compared to plasma unbound and total concentrations. *Journal of Steroid Biochemistry*, 7, 469-472.
- Backstrom, T., Wahlstrom, G., Wahlstrom, K., Zhu, D., & Wang, M. D. (2005). Isoallopregnanolone; an antagonist to the anaesthetic effect of allopregnanolone in male rats. *European Journal of Pharmacology*, 512, 15-21.
- Barber, A. C., Hippert, C., Duran, Y., West, E. L., Bainbridge, J. W., Warre-Cornish, K., et al. (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 354-359.
- Barbosa, K. B., Bressan, J., Zulet, M. A., & Martinez Hernandez, J. A. (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. [Influencia de la dieta sobre marcadores plasmaticos de estres] *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 31, 259-280.
- Barlow, H. B. (1982). What causes trichromacy? A theoretical analysis using comb-filtered spectra. *Vision Research*, 22, 635-643.
- Barry, M. P., Dagnelie, G., & Argus II Study Group. (2012). Use of the argus II retinal prosthesis to improve visual guidance of fine hand movements. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 5095-5101.
- Barry, M. P., Dagnelie, G., & Argus II Study Group. (2012). Use of the argus II retinal prosthesis to improve visual guidance of fine hand movements. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 5095-5101.
- Baulieu, E., & Schumacher, M. (2000). Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids*, 65, 605-612.
- Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: Of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Progress in Hormone Research*, 52, 1-32.
- Baumgartner, W. A. (2000). Etiology, pathogenesis, and experimental treatment of retinitis pigmentosa. *Medical Hypotheses*, 54, 814-824.
- Bazan, N. G. (2006). Cell survival matters: Docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, 29, 263-271.

- Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D., & Flinter, F. A. (1999). New criteria for improved diagnosis of bardet-biedl syndrome: Results of a population survey. *Journal of Medical Genetics*, 36, 437-446.
- Bear M.F., Connors B.W. y Paradiso M.A. (1998). *El ojo. Neurociencia. Explorando el cerebro.* (pp. 223-229). Barcelona: Masson.
- Beatty, S., Koh, H. H., Carden, D., & Murray, I. J. (2000). Macular pigment optical density measurement: A novel compact instrument. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 20, 105-111.
- Belelli, D., & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABA (A) receptor. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6, 565-575.
- Bennett, J., Ashtari, M., Wellman, J., Marshall, K. A., Cyckowski, L. L., Chung, D. C., et al. (2012). AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Science Translational Medicine*, 4, 120ra15.
- Berkowitz, B. A., Roberts, R., Stemmler, A., Luan, H., & Gadianu, M. (2007). Impaired apparent ion demand in experimental diabetic retinopathy: Correction by lipoic acid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 4753-4758.
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Hayes, K. C., Nicholson, B. W., Weigel-DiFranco, C., et al. (1993). A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Archives of Ophthalmology*, 111, 761-772.
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C., Moser, A., Brockhurst, R. J., et al. (2004). Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: Subgroup analyses. *Archives of Ophthalmology*, 122, 1306-1314.
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49, 3-8.
- Bhatt, L., Groeger, G., McDermott, K., & Cotter, T. G. (2010). Rod and cone photoreceptor cells produce ROS in response to stress in a live retinal explant system. *Molecular Vision*, 16, 283-293.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., & Boddeke, H. W. (2007). Neuronal 'on' and 'off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences*, 30, 596-602.

- Bignami, A., & Dahl, D. (1979). Isolation of GFA protein from normal brain--a comment. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 27, 693-696.
- Bigsby, R. M., Cardenas, H., Caperell-Grant, A., & Grubbs, C. J. (1999). Protective effects of estrogen in a rat model of age-related cataracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9328-9332.
- Bilska, A., & Wlodek, L. (2005). Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacological Reports: PR*, 57, 570-577.
- Binny, C. J., & Nathwani, A. C. (2012). Vector systems for prenatal gene therapy: Principles of adeno-associated virus vector design and production. *Methods in Molecular Biology*, 891, 109-131.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L. L., Simonetti, R. G., & Glud, C. (2015). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina*, 133, 164-165.
- Blum, S., Vardi, M., Brown, J. B., Russell, A., Milman, U., Shapira, C., et al. (2010). Vitamin E reduces cardiovascular disease in individuals with diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype. *Pharmacogenomics*, 11, 675-684.
- Bosch-Morell, F., Roma, J., Marin, N., Romero, B., Rodriguez-Galietero, A., Johnsen-Soriano, S., et al. (2002). Role of oxygen and nitrogen species in experimental uveitis: Anti-inflammatory activity of the synthetic antioxidant ebselen. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 669-675.
- Bourbon, A., Vionnet, M., Leprince, P., Vaissier, E., Copeland, J., McDonagh, P., et al. (2004). The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 26, 932-938.
- Bowes, C., Li, T., Danciger, M., Baxter, L. C., Applebury, M. L., & Farber, D. B. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature*, 347, 677-680.
- Boycott, B. B., & Wassle, H. (1991). Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *The European Journal of Neuroscience*, 3, 1069-1088.

- Brea-Fernandez, A. J., Pomares, E., Brion, M. J., Marfany, G., Blanco, M. J., Sanchez-Salorio, M., et al. (2008). Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *The British Journal of Ophthalmology*, 92, 1419-1423.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., et al. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25, 397-424.
- Brinton, R. D., & Wang, J. M. (2006). Preclinical analyses of the therapeutic potential of allopregnanolone to promote neurogenesis in vitro and in vivo in transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 3, 11-17.
- Buch, P. K., MacLaren, R. E., & Ali, R. R. (2007). Neuroprotective gene therapy for the treatment of inherited retinal degeneration. *Current Gene Therapy*, 7, 434-445.
- Bucolo, C., & Drago, F. (2004). Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: Role of sigma1 recognition sites. *European Journal of Pharmacology*, 498, 111-114.
- Bunker, C. H., Berson, E. L., Bromley, W. C., Hayes, R. P., & Roderick, T. H. (1984). Prevalence of retinitis pigmentosa in maine. *American Journal of Ophthalmology*, 97, 357-365.
- Buraczynska, M., Mears, A. J., Zarepars, S., Farjo, R., Filippova, E., Yuan, Y., et al. (2002). Gene expression profile of native human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 603-607.
- Wilding C., K. Bell, S. Funke ,S. Beck , Norbert Pfeiffer ,Franz H. Grus. (2015). GFAP antibodies show protective effect on oxidatively stressed neuroretinal cells via interaction with ERP5. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127, 298–304.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors*, 6, 391-397.
- Callachan, H., Cottrell, G. A., Hather, N. Y., Lambert, J. J., Nooney, J. M., & Peters, J. A. (1987). Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 231, 359-369.
- Carmody, R. J., McGowan, A. J., & Cotter, T. G. (1999). Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Experimental Cell Research*, 248, 520-530.

- Carter-Dawson, L. D., & LaVail, M. M. (1979). Rods and cones in the mouse retina. I. structural analysis using light and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*, 188, 526-687
- Carter-Dawson, L. D., LaVail, M. M., & Sidman, R. L. (1978). Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17, 489-498.
- Caruso, D., Pesaresi, M., Abbiati, F., Calabrese, D., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., et al. (2013). Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 2278-2290.
- Caruso, D., Pesaresi, M., Maschi, O., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., & Melcangi, R. C. (2010). Effect of short-and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 1137-1147.
- Cascio, C., Deidda, I., Russo, D., & Guarneri, P. (2015). The estrogenic retina: The potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. *Steroids*, 103, 31-41.
- Cayouette, M., & Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Human Gene Therapy*, 8, 423-430.
- Celotti, F., & Negri Cesi, P. (1992). Anabolic steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 469-477.
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227, 375-381.
- Chai, Y. C., Jung, C. H., Lii, C. K., Ashraf, S. S., Hendrich, S., Wolf, B., et al. (1991). Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III; characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 284, 270-278.
- Chang, G. Q., Hao, Y., & Wong, F. (1993). Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11, 595-605.

- Chang, S., Vaccarella, L., Olatunji, S., Cebulla, C., & Christoforidis, J. (2011). Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: Genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Current Genomics*, 12, 267-275.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19, 300-307.
- Chaudiere, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 37, 949-962.
- Chen, G., Shi, J., Jin, W., Wang, L., Xie, W., Sun, J., et al. (2008). Progesterone administration modulates TLRs/NF-kappaB signaling pathway in rat brain after cortical contusion. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 38, 65-74.
- Chiche, J. D., Schlutsmeyer, S. M., Bloch, D. B., de la Monte, S. M., Roberts, J. D., Jr, Filippov, G., et al. (1998). Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 34263-34271.
- Chizzolini, M., Galan, A., Milan, E., Sebastiani, A., Costagliola, C., & Parmeggiani, F. (2011). Good epidemiologic practice in retinitis pigmentosa: From phenotyping to biobanking. *Current Genomics*, 12, 260-266.
- Chong, R. S., & Martin, K. R. (2015). Glial cell interactions and glaucoma. *Current Opinion in Ophthalmology*, 26, 73-77.
- Chrysostomou, V., Rezaie, F., Trounce, I. A., & Crowston, J. G. (2013). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 12-15.
- Chua, J., Nivison-Smith, L., Fletcher, E. L., Trenholm, S., Awatramani, G. B., & Kalloniatis, M. (2013). Early remodeling of muller cells in the rd/rd mouse model of retinal dystrophy. *The Journal of Comparative Neurology*, 521, 2439-2453.
- Cingolani, C., Rogers, B., Lu, L., Kachi, S., Shen, J., & Campochiaro, P. A. (2006). Retinal degeneration from oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 660-669.

- Colella, P., & Auricchio, A. (2012). Gene therapy of inherited retinopathies: A long and successful road from viral vectors to patients. *Human Gene Therapy*, 23, 796-807.
- Collier, R. J., Wang, Y., Smith, S. S., Martin, E., Ornberg, R., Rhoades, K., et al. (2011). Complement deposition and microglial activation in the outer retina in light-induced retinopathy: Inhibition by a 5-HT<sub>1A</sub> agonist. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 8108-8116.
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 1-56.
- Corrochano, S., Barhoum, R., Boya, P., Arroba, A. I., Rodriguez-Muela, N., Gomez-Vicente, V., et al. (2008). Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 4188-4194.
- Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., & Vlietinck, A. J. (2004). Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1345-1359.
- Cottet, S., & Schorderet, D. F. (2009). Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa. *Current Molecular Medicine*, 9, 375-383.
- Coughlan, T., Gibson, C., & Murphy, S. (2005). Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 93, 932-942.
- Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M. L., Kinzel, B., et al. (2010). The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death and Differentiation*, 17, 1199-1210.
- Cuajungco, M. P., Goldstein, L. E., Nunomura, A., Smith, M. A., Lim, J. T., Atwood, C. S., et al. (2000). Evidence that the beta-amyloid plaques of alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 19439-19442.
- Cuenca, N., Fernandez-Sanchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P., et al. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 43, 17-75.

- Curcio, C. A., & Allen, K. A. (1990). Topography of ganglion cells in human retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 300, 5-25.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *The Journal of Comparative Neurology*, 292, 497-523.
- Cutler, S. M., Cekic, M., Miller, D. M., Wali, B., VanLandingham, J. W., & Stein, D. G. (2007). Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat. *Journal of Neurotrauma*, 24, 1475-1486.
- Daiger, S. P., Bowne, S. J., & Sullivan, L. S. (2007). Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Archives of Ophthalmology*, 125, 151-158.
- Danielson, S. R., & Andersen, J. K. (2008). Oxidative and nitrative protein modifications in parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 1787-1794.
- De Bock, F., Derijard, B., Dornand, J., Bockaert, J., & Rondouin, G. (1998). The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF-alpha. *The European Journal of Neuroscience*, 10, 3107-3114.
- De Hoz, R., Rojas, B., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., Gallego, B. I., Trivino, A., et al. (2016). Retinal macroglial responses in health and disease. *BioMed Research International*, 2016, 2954721.
- De Waart, F. G., Schouten, E. G., Stalenhoef, A. F., & Kok, F. J. (2001). Serum carotenoids, alpha-tocopherol and mortality risk in a prospective study among dutch elderly. *International Journal of Epidemiology*, 30, 136-143.
- Deeg, C. A., Amann, B., Lutz, K., Hirmer, S., Lutterberg, K., Kremmer, E., et al. (2016). Aquaporin 11, a regulator of water efflux at retinal muller glial cell surface decreases concomitant with immune-mediated gliosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 89-016-0554-2.
- Deguchi, A., Thompson, W. J., & Weinstein, I. B. (2004). Activation of protein kinase G is sufficient to induce apoptosis and inhibit cell migration in colon cancer cells. *Cancer Research*, 64, 3966-3973.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A. K., Miesenbock, G., Ting, A., & Schnitzer, M. J. (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26, 10380-10386.

- Delyfer, M. N., Leveillard, T., Mohand-Said, S., Hicks, D., Picaud, S., & Sahel, J. A. (2004). Inherited retinal degenerations: Therapeutic prospects. *Biology of the Cell*, 96, 261-269.
- Dene, B. A., Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B., 3rd. (2005). Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21, 28-35.
- Dennery, P. A. (2010). Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 1147-1151.
- Devi, B. G., & Chan, A. W. (1999). Effect of cocaine on cardiac biochemical functions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 33, 1-6.
- Di Michele, F., Longone, P., Romeo, E., Lucchetti, S., Brusa, L., Pierantozzi, M., et al. (2003). Decreased plasma and cerebrospinal fluid content of neuroactive steroids in parkinson's disease. *Neurological Sciences*, 24, 172-173.
- Dick, A. D. (2009). Influence of microglia on retinal progenitor cell turnover and cell replacement. *Eye*, 23, 1939-1945.
- Dizhoor, A. M. (2000). Regulation of cGMP synthesis in photoreceptors: Role in signal transduction and congenital diseases of the retina. *Cellular Signalling*, 12, 711-719.
- Djaldetti, R., Lev, N., & Melamed, E. (2003). Neuroprotection in progressive brain disorders. *The Israel Medical Association Journal*, 5, 576-580.
- Doonan, F., & Cotter, T. G. (2004). Apoptosis: A potential therapeutic target for retinal degenerations. *Current Neurovascular Research*, 1, 41-53.
- Drack, A. V., Dumitrescu, A. V., Bhattarai, S., Gratie, D., Stone, E. M., Mullins, R., et al. (2012). TUDCA slows retinal degeneration in two different mouse models of retinitis pigmentosa and prevents obesity in bardet-biedl syndrome type 1 mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 100-106.
- Dringen, R. (2000). Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 267, 4903.
- Dryja, T. P., & Berson, E. L. (1995). Retinitis pigmentosa and allied diseases. implications of genetic heterogeneity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 1197-1200.

- Dubrovsky, B. O. (2005). Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29, 169-192.
- Dufier, J. L. (2003). Early therapeutic trials for retinitis pigmentosa. [La retinopathie pigmentaire a la recherche d'une approche therapeutique] *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine*, 187, 1685-92.
- Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R., & Hjelmeland, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*, 62, 155-169.
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54, 15-36.
- Edelstein, C. L., Ling, H., Wangsiripaisan, A., & Schrier, R. W. (1997). Emerging therapies for acute renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, S89-95.
- Edwards, R. B., & Adler, A. J. (1994). Exchange of retinol between IRBP and CRBP. *Experimental Eye Research*, 59, 161-170.
- Egenthaler, M., Lohmann, S. M., Walter, U., & Pilz, R. B. (1999). Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 135, 173-209.
- Eugenio Martin Cuenca. (2006). Fotorrecepción. *Fisiología de la visión. Fundamentos de fisiología* (3ª ed., pp. 776) Paraninfo.
- Fahim, A. T., Daiger, S. P., & Weleber, R. G. (1993). Retinitis pigmentosa overview. In R. A. Pagon, et al. (Eds.), *GeneReviews(r)* (). Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
- Farber, D. B. (1995). From mice to men: The cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. the proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 263-275.
- Farrar, G. J., Kenna, P. F., & Humphries, P. (2002). On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO Journal*, 21, 857-864.
- Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Campello, L., Pinilla, I., & Cuenca, N. (2015). Astrocytes and muller cell alterations during retinal degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 484.

- Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Esquivia, G., Martin-Nieto, J., Pinilla, I., & Cuenca, N. (2012). Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PloS One*, 7, e43074.
- Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Pinilla, I., Martin-Nieto, J., & Cuenca, N. (2011). Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 4998-5008.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., & Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: Genes and disease mechanisms. *Current Genomics*, 12, 238-249.
- Filina, A. A., Davydova, N. G., Endrikhovskii, S. N., & Shamshinova, A. M. (1995). Lipoic acid as a means of metabolic therapy of open-angle glaucoma. [Lipoeva kislota kak sredstvo metabolicheskoi terapii otkrytougol'noi glaukomy] *Vestnik Oftalmologii*, 111, 6-8.
- Fillebeen, C., & Pantopoulos, K. (2002). Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 7, 15-22.
- Fischer, A. J., & Bongini, R. (2010). Turning muller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular Neurobiology*, 42, 199-209.
- Fisher, S. K., & Lewis, G. P. (2003). Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: A review and reconsideration of recent data. *Vision Research*, 43, 887-897.
- Fletcher, E. L., Jobling, A. I., Vessey, K. A., Luu, C., Guymer, R. H., & Baird, P. N. (2011). Animal models of retinal disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 100, 211-286.
- Forman, H. J., & Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 189-216.
- Fox, D. A., Poblenz, A. T., & He, L. (1999). Calcium overload triggers rod photoreceptor apoptotic cell death in chemical-induced and inherited retinal degenerations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 282-285.
- Francisco, B. M., Salvador, M., & Amparo, N. (2015). Oxidative stress in myopia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 750637.

- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., et al. (2007). Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8287-8292.
- Frasson, M., Picaud, S., Leveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., et al. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 2724-2734.
- Frasson, M., Sahel, J. A., Fabre, M., Simonutti, M., Dreyfus, H., & Picaud, S. (1999). Retinitis pigmentosa: Rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature Medicine*, 5, 1183-1187.
- Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.
- Fuchs, E., & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 345-382.
- Fuensanta A. Vera-Díaz and Nathan Doble. (January 20, 2012). The human eye and adaptive optics. In book edited by Robert K. Tyson (Ed.), *Topics in adaptive optics*.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., et al. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752-1761.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., et al. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics*, 26, 270-271.
- Galili, O., Versari, D., Sattler, K. J., Olson, M. L., Mannheim, D., McConnell, J. P., et al. (2007). Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292, H904-11.
- Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Jimenez-Lopez, M., Garcia-Ayuso, D., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., et al. (2013). Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 974-985.

- Gallego A. (1971). Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Res*, 3, 33-50.
- Gamm, D. M., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Bischoff, N., et al. (2007). Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease. *PLoS One*, 2, e338.
- Gao, J., Zhu, Z. R., Ding, H. Q., Qian, Z., Zhu, L., & Ke, Y. (2007). Vulnerability of neurons with mitochondrial dysfunction to oxidative stress is associated with down-regulation of thioredoxin. *Neurochemistry International*, 50, 379-385.
- García-Segura, L. M., Azcoitia, I., & DonCarlos, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*, 63, 29-60.
- Gargini, C., Terzibasi, E., Mazzoni, F., & Strettoi, E. (2007). Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: A morphological and ERG study. *The Journal of Comparative Neurology*, 500, 222-238.
- Garland, D. L. (1991). Ascorbic acid and the eye. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 1198S-1202S.
- Gasior, M., Carter, R. B., & Witkin, J. M. (1999). Neuroactive steroids: Potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 107-112.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119, 493-501.
- Gee, K. W., Chang, W. C., Brinton, R. E., & McEwen, B. S. (1987). GABA-dependent modulation of the Cl<sup>-</sup> ionophore by steroids in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 136, 419-423.
- Geneser F. (2000). *El ojo en histología*. 24<sup>ª</sup> edición. Buenos Aires. Editorial Panamericana.
- Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. 13<sup>ª</sup> edición. . Buenos Aires. Editorial Panamericana.
- Germain F, Pérez-Rico C, Vicente J, de la Villa P. (2010). Functional histology of the retina. in: *Microscopy: Science, technology, applications and education*. 2<sup>ª</sup> edición.
- Ghosh, F., & Johansson, K. (2012). Neuronal and glial alterations in complex long-term rhegmatogenous retinal detachment. *Current Eye Research*, 37, 704-711.

- Gibis, B., Grenz, S., Gawlik, C., Sander, G., & Rheinberger, P. (2001). Age-related macular degeneration--a public health problem. [Altersabhängige Makuladegeneration--ein Public Health Problem] *Zeitschrift Fur Arztliche Fortbildung Und Qualitätssicherung*, 95, 357-359.
- Gibson, C. L., Constantin, D., Prior, M. J., Bath, P. M., & Murphy, S. P. (2005). Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 193, 522-530.
- Gibson, R., Fletcher, E. L., Vingrys, A. J., Zhu, Y., Vessey, K. A., & Kalloniatis, M. (2013). Functional and neurochemical development in the normal and degenerating mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 521, 1251-1267.
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19, 257-267.
- Golbidi, S., Badran, M., & Laher, I. (2011). Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 69.
- Gomes, M. B., & Negrato, C. A. (2014). Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6, 80-5996-6-80.
- Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R. E., Huerta, M., Luquin, S., Gomez-Pinedo, U., Sanchez-Almaraz, E., et al. (2002). Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neuroscience Letters*, 321, 100-104.
- Goodman, Y., Bruce, A. J., Cheng, B., & Mattson, M. P. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 66, 1836-1844.
- Gordon, S. (2007). The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, 37, S9-17.
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 89-105.
- Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *saccharomyces*

- cerevisiae due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 1699-1707.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., & Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*, 21, 1465-1468.
- Greferath, U., Anderson, E. E., Jobling, A. I., Vessey, K. A., Martinez, G., de Longh, R. U., et al. (2015). Inner retinal change in a novel rd1-FTL mouse model of retinal degeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 293.
- Griffith, O. W., & Mulcahy, R. T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: Gamma-glutamylcysteine synthetase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 73, 209-267.
- Grondahl, J. (1987). Autosomal recessive inheritance in 'senile' retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmologica*, 65, 231-236.
- Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C., & Stretto, E. (2015). Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. *Progress in Retinal and Eye Research*, 48, 62-81.
- Guarneri, P., Cascio, C., Russo, D., D'Agostino, S., Drago, G., Galizzi, G., et al. (2003). Neurosteroids in the retina: Neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007, 117-128.
- Guillamon-Vivancos, T., Gomez-Pinedo, U., & Matias-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description. *Neurologia*, 30, 119-129.
- Gunn, B. G., Brown, A. R., Lambert, J. J., & Belelli, D. (2011). Neurosteroids and GABA(A) receptor interactions: A focus on stress. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 131.
- Guo, L., Duggan, J., & Cordeiro, M. F. (2010). Alzheimer's disease and retinal neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, 7, 3-14.
- Gupta, N., Brown, K. E., & Milam, A. H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76, 463-471.

- Hackam, A. S., Strom, R., Liu, D., Qian, J., Wang, C., Otteson, D., et al. (2004). Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 2929-2942.
- Hagen, T. M., Ingersoll, R. T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C. M., Vinarsky, V., et al. (1999). (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB Journal*, 13, 411-418.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246, 501-514.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1, 40.
- Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C. K., Roy, S., Kobuchi, H., et al. (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *BioFactors*, 6, 321-338.
- Han, J., Dinculescu, A., Dai, X., Du, W., Smith, W. C., & Pang, J. (2013). Review: The history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. *Molecular Vision*, 19, 2579-2589.
- Hanus, J., Anderson, C., & Wang, S. (2015). RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Research Reviews*, 24, 286-298.
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., et al. (2002). Microglia-muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 22, 9228-9236.
- Hardy, K., & Hunt, N. H. (2004). Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1550-1563.
- Hargrave, P. A. (2001). Rhodopsin structure, function, and topography the friedewald lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 3-9.

- Harry, G. J., & Kraft, A. D. (2008). Neuroinflammation and microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4, 1265-1277.
- Hart, A. W., McKie, L., Morgan, J. E., Gautier, P., West, K., Jackson, I. J., et al. (2005). Genotype-phenotype correlation of mouse pde6b mutations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 3443-3450.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368, 1795-1809.
- Hauck, S. M., Ekstrom, P. A., Ahuja-Jensen, P., Suppmann, S., Paquet-Durand, F., van Veen, T., et al. (2006). Differential modification of phosphodiesterase protein in degenerating rd1 retina is associated with constitutively active Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II in rod outer segments. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 324-336.
- Helga Kolb. (2014). Roles of amacrine cells by helga kolb <http://webvision.med.utah.edu/>, 2013b, from <http://webvision.med.utah.edu/>
- Hicks J.J, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. (2006). Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutrición*, 14, 223-226.
- Himori, N., Yamamoto, K., Maruyama, K., Ryu, M., Taguchi, K., Yamamoto, M., et al. (2013). Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Journal of Neurochemistry*, 127, 669-680.
- Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R., & Weinmeister, P. (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handbook of Experimental Pharmacology*, 137-162.
- Hollander, H., Makarov, F., Dreher, Z., van Driel, D., Chan-Ling, T. L., & Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: Sharing and division of labour between astrocytes and muller cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 313, 587-603.
- Holmqvist, L., Stuchbury, G., Berbaum, K., Muscat, S., Young, S., Hager, K., et al. (2007). Lipoic acid as a novel treatment for alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacology & Therapeutics*, 113, 154-164.
- Huang, C. S., Anderson, M. E., & Meister, A. (1993). Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 20578-20583.

- Huang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E., & Meister, A. (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 19675-19680.
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). Stereoscopic vision in macaque monkey. cells sensitive to binocular depth in area 18 of the macaque monkey cortex. *Nature*, 225, 41-42.
- Huttl, S., Michalakis, S., Seeliger, M., Luo, D. G., Acar, N., Geiger, H., et al. (2005). Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. *The Journal of Neuroscience*, 25, 130-138.
- Iandiev, I., Pannicke, T., Biedermann, B., Wiedemann, P., Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2006). Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina. *Neuroscience Letters*, 408, 108-112.
- Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski, C. F., & Izumi, Y. (2014). Neurosteroids are endogenous neuroprotectants in an ex vivo glaucoma model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55, 8531-8541.
- Ishikawa, T., Bao, J. J., Yamane, Y., Akimaru, K., Frindrich, K., Wright, C. D., et al. (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 14981-14988.
- Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S. B., Roman, A. J., et al. (2012). Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: Safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of Ophthalmology*, 130, 9-24.
- Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S. B., Roman, A. J., et al. (2012). Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: Safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of Ophthalmology*, 130, 9-24.
- Jacque, C. M., Vinner, C., Kujas, M., Raoul, M., Racadot, J., & Baumann, N. A. (1978). Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences*, 35, 147-155.

- Jacque, C. M., Vinner, C., Kujas, M., Raoul, M., Racadot, J., & Baumann, N. A. (1978). Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences*, 35, 147-155.
- Jareno, E. J., Roma, J., Romero, B., Marin, N., Muriach, M., Johnsen, S., et al. (2002). Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radical Research*, 36, 341-344.
- Jarrett, S. G., Lin, H., Godley, B. F., & Boulton, M. E. (2008). Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27, 596-607.
- Jenner, P. (1994). Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet*, 344, 796-798.
- Jeon, C. J., Strettoi, E., & Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of Neuroscience*, 18, 8936-8946.
- Jia, L., Liu, Z., Sun, L., Miller, S. S., Ames, B. N., Cotman, C. W., et al. (2007). Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: Protection by (R)-alpha-lipoic acid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 339-348.
- John E. Dowling. (1987). *The retina. An approachable part of the brain.* Revised Edition, Johnsen-Soriano, S., Garcia-Pous, M., Arnal, E., Sancho-Tello, M., Garcia-Delpech, S., Miranda, M., et al. (2008). Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice. *Free Radical Research*, 42, 613-617.
- Jones, B. W., Kondo, M., Terasaki, H., Lin, Y., McCall, M., & Marc, R. E. (2012). Retinal remodeling. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 56, 289-306.
- Jones, B. W., & Marc, R. E. (2005). Retinal remodeling during retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, 81, 123-137.
- Jones, B. W., Watt, C. B., Frederick, J. M., Baehr, W., Chen, C. K., Levine, E. M., et al. (2003). Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *The Journal of Comparative Neurology*, 464, 1-16.
- Kaczara, P., Sarna, T., & Burke, J. M. (2010). Dynamics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 1064-1070.

- Kagan, V. E., Shvedova, A., Serbinova, E., Khan, S., Swanson, C., Powell, R., et al. (1992). Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochemical Pharmacology*, 44, 1637-1649.
- Kaja, S., Yang, S. H., Wei, J., Fujitani, K., Liu, R., Brun-Zinkernagel, A. M., et al. (2003). Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of vesl-1L/Homer 1c immunoreactive synaptic connections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3155-3162.
- Kaldi, I., & Berta, A. (2004). Progesterone administration fails to protect albino male rats against photostress-induced retinal degeneration. *European Journal of Ophthalmology*, 14, 306-314.
- Kalloniatis, M., & Fletcher, E. L. (2004). Retinitis pigmentosa: Understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clinical & Experimental Optometry*, 87, 65-80.
- Karl, M. O., & Reh, T. A. (2010). Regenerative medicine for retinal diseases: Activating endogenous repair mechanisms. *Trends in Molecular Medicine*, 16, 193-202.
- Karlsson, M., Frennesson, C., Gustafsson, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., & Kurz, T. (2013). Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells. *Experimental Eye Research*, 116, 359-365.
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: Just bystander or target for therapy?. *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 30-57.
- Kas, J., & Blattna, J. (1986). Phospholipids in foodstuffs. *Acta Universitatis Carolinae Medica*, 32, 81-92.
- Kaur, J., Mencl, S., Sahaboglu, A., Farinelli, P., van Veen, T., Zrenner, E., et al. (2011). Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PloS One*, 6, e22181.
- Kaur, P., Jodhka, P. K., Underwood, W. A., Bowles, C. A., de Fiebre, N. C., de Fiebre, C. M., et al. (2007). Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3

- kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 2441-2449.
- 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.
- Kern, T. S. (2014). Interrelationships between the retinal neuroglia and vasculature in diabetes. *Diabetes & Metabolism Journal*, 38, 163-170.
- Kettenmann, H. (1996). Beyond the neuronal circuitry. *Trends in Neurosciences*, 19, 305-306.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91, 461-553.
- Kim, I. J., Zhang, Y., Meister, M., & Sanes, J. R. (2010). Laminar restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: Subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers. *The Journal of Neuroscience*, 30, 1452-1462.
- Kim, K. J., Kim, C., Bok, J., Kim, K. S., Lee, E. J., Park, S. P., et al. (2011). Spectrum of rhodopsin mutations in korean patients with retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 17, 844-853.
- Kim, N. R., Lee, E. S., Seong, G. J., Kang, S. Y., Kim, J. H., Hong, S., et al. (2011). Comparing the ganglion cell complex and retinal nerve fibre layer measurements by fourier domain OCT to detect glaucoma in high myopia. *The British Journal of Ophthalmology*, 95, 1115-1121.
- Klassen, H. (2016). Stem cells in clinical trials for treatment of retinal degeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16, 7-14.
- Ko, M. L., Peng, P. H., Ma, M. C., Ritch, R., & Chen, C. F. (2005). Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 365-373.
- Kokona, D., Charalampopoulos, I., Padiaditakis, I., Gravanis, A., & Thermos, K. (2012). The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacology*, 62, 2106-2117.
- Kolb H, Nelson R, Fernandez E, Bryan J. The organization of the Retina and Visual System. (2000). The organization of the retina and visual system. <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Kolb H. (2014). Morphology and circuitry of ganglion cells. <http://webvision.med.utah.edu/>

- Komeima, K., Rogers, B. S., & Campochiaro, P. A. (2007). Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 809-815.
- Komeima, K., Rogers, B. S., & Campochiaro, P. A. (2007). Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 809-815.
- Kong, J. H., Fish, D. R., Rockhill, R. L., & Masland, R. H. (2005). Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *The Journal of Comparative Neurology*, 489, 293-310.
- Kong, J. H., Fish, D. R., Rockhill, R. L., & Masland, R. H. (2005). Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *The Journal of Comparative Neurology*, 489, 293-310.
- Koppen & Stanto. (2008). *Berne and levy physiology*. 6ª edición an imprint of Elsevier, Inc.
- Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., & Kato, S. (2013). Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline. *Brain Research*, 1499, 145-157.
- Kosower, N. S., & Kosower, E. M. (1978). The glutathione status of cells. *International Review of Cytology*, 54, 109-160.
- Kowluru, R. A. (2005). Diabetic retinopathy: Mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 1581-1587.
- Kowluru, R. A., & Chan, P. S. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, 2007, 43603.
- Kowluru, R. A., & Odenbach, S. (2004). Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes*, 53, 3233-3238.
- Kowluru, R. A., Zhong, Q., Santos, J. M., Thandampallayam, M., Putt, D., & Gierhart, D. L. (2014). Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutrition & Metabolism*, 11, 8-7075-11-8.
- Krejsa, C. M., Franklin, C. C., White, C. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., & Kavanagh, T. J. (2010). Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 16116-16124.

- Krishnamoorthy, R. R., Crawford, M. J., Chaturvedi, M. M., Jain, S. K., Aggarwal, B. B., Al-Ubaidi, M. R., et al. (1999). Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 3734-3743.
- KUFFLER, S. W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, 16, 37-68.
- Kumar, A., Pandey, R. K., Miller, L. J., Singh, P. K., & Kanwar, M. (2013). Muller glia in retinal innate immunity: A perspective on their roles in endophthalmitis. *Critical Reviews in Immunology*, 33, 119-135.
- L.c Junqueira & José Carneiro. (2001). *Histología básica*. 5ª edición. Masson.
- Lahmar, I., Pfaff, A. W., Marcellin, L., Sauer, A., Moussa, A., Babba, H., et al. (2014). Muller cell activation and photoreceptor depletion in a mice model of congenital ocular toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, 144, 22-26.
- LaVail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C. H., et al. (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39, 592-602.
- Lee, J. M., & Johnson, J. A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 139-143.
- Leveillard, T., Fridlich, R., Clerin, E., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Jaillard, C., et al. (2014). Therapeutic strategy for handling inherited retinal degenerations in a gene-independent manner using rod-derived cone viability factors. *Comptes Rendus Biologies*, 337, 207-213.
- Lewis, G. P., & Fisher, S. K. (2003). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: Its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *International Review of Cytology*, 230, 263-290.
- Li, Y., Shen, H., Shi, J., & Tang, L. (2014). The effects of alpha lipoic acid in preventing oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92, 765-772.
- Liang, F. Q., & Godley, B. F. (2003). Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76, 397-403.

- Lin, J., Bierhaus, A., Bugert, P., Dietrich, N., Feng, Y., Vom Hagen, F., et al. (2006). Effect of R-(+)-alpha-lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 49, 1089-1096.
- Lincoln, T. M., & Cornwell, T. L. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB Journal*, 7, 328-338.
- Liu, B., Ma, X., Guo, D., Guo, Y., Chen, N., & Bi, H. (2012). Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrostatic pressure-induced damage of retinal ganglion cells in vitro. *Neuroscience Letters*, 526, 24-28.
- Liu, C. B., Feng, Y. H., Ye, G. H., & Xiao, M. (2010). Effects of alpha-lipoic acid and vitamin C on oxidative stress in rat exposed to chronic arsenic toxicity. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 28, 891-894.
- Liu, H., Wang, H., Shen, S., Hagen, T. M., & Liu, R. M. (2004). Glutathione metabolism during aging and in alzheimer disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019, 346-349.
- Liu, J., & Ames, B. N. (2005). Reducing mitochondrial decay with mitochondrial nutrients to delay and treat cognitive dysfunction, alzheimer's disease, and parkinson's disease. *Nutritional Neuroscience*, 8, 67-89.
- Liu, J., Atamna, H., Kuratsune, H., & Ames, B. N. (2002). Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 133-166.
- Liu, L., Lao, W., Ji, Q. S., Yang, Z. H., Yu, G. C., & Zhong, J. X. (2015). Lycium barbarum polysaccharides protected human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *International Journal of Ophthalmology*, 8, 11-16.
- Liu, M., Kelley, M. H., Herson, P. S., & Hurn, P. D. (2010). Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinologica*, 35, 127-143.
- Liu, P. K., Robertson, C. S., & Valadka, A. (2002). The association between neuronal nitric oxide synthase and neuronal sensitivity in the brain after brain injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962, 226-241.
- Liu, R. M., Gao, L., Choi, J., & Forman, H. J. (1998). Gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *The American Journal of Physiology*, 275, L861-9.

- Loweth, A. C., Williams, G. T., Scarpello, J. H., & Morgan, N. G. (1997). Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Letters*, 400, 285-288.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 42-59.
- Lull, M. E., & Block, M. L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, 7, 354-365.
- Luo, J. L., Hammarqvist, F., Andersson, K., & Wernerman, J. (1998). Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *The American Journal of Physiology*, 27, E359-65.
- Luo, P. F., Wang, G. Y., & Xia, Z. F. (2012). Advancement in the research of mechanism of endogenous cellular injury in visceral complications as complications after severe burn. *Chinese Journal of Burns*, 28, 183-185.
- MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., et al. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, 444, 203-207.
- Mansoor, S., Gupta, N., Luczy-Bachman, G., Limb, G. A., Kuppermann, B. D., & Kenney, M. C. (2013). Protective effects of lipoic acid on chrysene-induced toxicity on muller cells in vitro. *Molecular Vision*, 19, 25-38.
- Mantopoulos, D., Murakami, Y., Comander, J., Thanos, A., Roh, M., Miller, J. W., et al. (2011). Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) protects photoreceptors from cell death after experimental retinal detachment. *PLoS One*, 6, e24245.
- Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L., & Jialal, I. (1999). Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1114-1121.
- Martinez-Fernandez de la Camara, C., Sequedo, M. D., Gomez-Pinedo, U., Jaijo, T., Aller, E., Garcia-Tarraga, P., et al. (2013). Phosphodiesterase inhibition induces retinal degeneration, oxidative stress and inflammation in cone-enriched cultures of porcine retina. *Experimental Eye Research*, 111, 122-133.

- Martin-Garcia, E., Darbra, S., & Pallares, M. (2007). Involvement of neurosteroids in normal and pathological behaviour. [Implicacion de los neuroesteroides en la conducta normal y patologica] *Revista De Neurologia*, 44, 661-676.
- Marx, C. E., Bradford, D. W., Hamer, R. M., Naylor, J. C., Allen, T. B., Lieberman, J. A., et al. (2011). Pregnenolone as a novel therapeutic candidate in schizophrenia: Emerging preclinical and clinical evidence. *Neuroscience*, 191, 78-90.
- Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 2013-2054.
- Matthew N. Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. (2006). *The special sense*. Berne & levy physiology .4ª edición. Elsevier.
- May, C. A., Lutjen-Drecoll, E., & Narfstrom, K. (2005). Morphological changes in the anterior segment of the abyssinian cat eye with hereditary rod-cone degeneration. *Current Eye Research*, 30, 855-862.
- Mayne, S. T., Cartmel, B., Lin, H., Zheng, T., & Goodwin, W. J., Jr. (2004). Low plasma lycopene concentration is associated with increased mortality in a cohort of patients with prior oral, pharynx or larynx cancers. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 34-42.
- Mayo, W., George, O., Darbra, S., Bouyer, J. J., Vallee, M., Darnaudery, M., et al. (2003). Individual differences in cognitive aging: Implication of pregnenolone sulfate. *Progress in Neurobiology*, 71, 43-48.
- McEwen, B. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 357-384.
- McLaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genetics*, 4, 130-134.
- Mebed, R., Ali, Y. B. M., Solouma, N., Eldib, A., Amer, M., & Osman, A. (2015). Rhodopsin mutations are scarcely implicated in autosomal recessive retinitis pigmentosa: A preliminary study of egyptian retinitis pigmentosa patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 16, 355-359.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.

- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.
- Mellon, S. H., & Vaudry, H. (2001). Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *International Review of Neurobiology*, 46, 33-78.
- Mellon, S. H., & Vaudry, H. (2001). Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *International Review of Neurobiology*, 46, 33-78.
- Merida, S., Palacios, E., Navea, A., & Bosch-Morell, F. (2015). Macrophages and uveitis in experimental animal models. *Mediators of Inflammation*, 2015, 671417.
- Merriam, & Webster. (2006). *Anatomy of human eye*. <http://www.britannica.com/>
- Mettu, P. S., Wielgus, A. R., Ong, S. S., & Cousins, S. W. (2012). Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 376-398.
- Michael H. Ross & Wojciech Pawlina. (2006). *Histology: A text and atlas*. 5ª edición. Lippincott Williams and Wilkins.
- Michalakakis, S., Muhlfriedel, R., Tanimoto, N., Krishnamoorthy, V., Koch, S., Fischer, M. D., et al. (2010). Restoration of cone vision in the CNGA3<sup>-/-</sup> mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Molecular Therapy*, 18, 2057-2063.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Tsukioka, T., Shinkawa, H., Kobayashi, F., Nishikawa, Y., et al. (2007). Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *BioFactors*, 30, 91-104.
- Miranda, M., Arnal, E., Ahuja, S., Alvarez-Nolting, R., Lopez-Pedrajas, R., Ekstrom, P., et al. (2010). Antioxidants rescue photoreceptors in rd1 mice: Relationship with thiol metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 216-222.
- Mitamura, Y., Mitamura-Aizawa, S., Nagasawa, T., Katome, T., Eguchi, H., & Naito, T. (2012). Diagnostic imaging in patients with retinitis pigmentosa. *The Journal of Medical Investigation*, 59, 1-11.
- Miyazaki, M., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Goto, Y., Sakamoto, T., Tabata, T., et al. (2003). Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor

- protects retinal degeneration and electrical defect in royal college of surgeons rats. *Gene Therapy*, 10, 1503-1511.
- Mo, M. S., Li, H. B., Wang, B. Y., Wang, S. L., Zhu, Z. L., & Yu, X. R. (2013). PI3K/Akt and NF-kappaB activation following intravitreal administration of 17beta-estradiol: Neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis. *Neuroscience*, 228, 1-12.
- Monti-Bloch, L., Jennings-White, C., Dolberg, D. S., & Berliner, D. L. (1994). The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology*, 19, 673-686.
- Morrow, A. L. (2007). Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--introduction to the special issue. *Pharmacology & Therapeutics*, 116, 1-6.
- Muller, E., & Kerschbaum, H. H. (2006). Progesterone and its metabolites 5-dihydroprogesterone and 5-3-tetrahydroprogesterone decrease LPS-induced NO release in the murine microglial cell line, BV-2. *Neuro Endocrinology Letters*, 27, 675-678.
- Murakami, Y., Notomi, S., Hisatomi, T., Nakazawa, T., Ishibashi, T., Miller, J. W., et al. (2013). Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 114-140.
- Muriach, M., Lopez-Pedrajas, R., Barcia, J. M., Sanchez-Villarejo, M. V., Almansa, I., & Romero, F. J. (2010). Cocaine causes memory and learning impairments in rats: Involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *Journal of Neurochemistry*, 114, 675-684.
- Nakamura, Y., Feng, Q., Kumagai, T., Torikai, K., Ohigashi, H., Osawa, T., et al. (2002). Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. implication for inflammation-associated carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 2687-2694.
- Nakao, T., Tsujikawa, M., Notomi, S., Ikeda, Y., & Nishida, K. (2012). The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa. *PloS One*, 7, e32472.
- Nakazawa, T., Kayama, M., Ryu, M., Kunikata, H., Watanabe, R., Yasuda, M., et al. (2011). Tumor necrosis factor-alpha mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 1384-1391.

- Nash, B. M., Wright, D. C., Grigg, J. R., Bennetts, B., & Jamieson, R. V. (2015). Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Translational Pediatrics*, 4, 139-163.
- Nebbioso, M., Pranno, F., & Pescosolido, N. (2013). Lipoic acid in animal models and clinical use in diabetic retinopathy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14, 1829-1838.
- Newman, E., & Reichenbach, A. (1996). The muller cell: A functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19, 307-312.
- Newman, E. A., Frambach, D. A., & Odette, L. L. (1984). Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science*, 225, 1174-1175.
- Nguyen, H. V., Li, Y., & Tsang, S. H. (2015). Patient-specific iPSC-derived RPE for modeling of retinal diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 4, 567-578.
- Noailles, A., Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., & Cuenca, N. (2014). Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 186-014-0186-3.
- Nordmann, R. (1994). Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol and Alcoholism*, 29, 513-522.
- Obrosova, I. G., Fathallah, L., & Greene, D. A. (2000). Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: Effect of DL-alpha-lipoic acid. *European Journal of Pharmacology*, 398, 139-146.
- Okoye, G., Zimmer, J., Sung, J., Gehlbach, P., Deering, T., Nambu, H., et al. (2003). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *The Journal of Neuroscience*, 23, 4164-4172.
- Omori, K., & Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circulation Research*, 100, 309-327.
- Ono, S. J. (2003). Immunity in the eye: Lessons in organ-specific responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 74, 149-150.
- Oppenheimer, L., Wellner, V. P., Griffith, O. W., & Meister, A. (1979). Glutathione synthetase. purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 5184-5190.

- Osborne, N. N. (2008). Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: Focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Progress in Brain Research*, 173, 339-352.
- O'Steen, W. K., Anderson, K. V., & Shear, C. R. (1974). Photoreceptor degeneration in albino rats: Dependency on age. *Investigative Ophthalmology*, 13, 334-339.
- Oveson, B. C., Iwase, T., Hackett, S. F., Lee, S. Y., Usui, S., Sedlak, T. W., et al. (2011). Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 116, 144-153.
- Packer, L. (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 257-264.
- Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 17, 888-895.
- Panfoli, I., Calzia, D., Ravera, S., Morelli, A. M., & Traverso, C. E. (2012). Extra-mitochondrial aerobic metabolism in retinal rod outer segments: New perspectives in retinopathies. *Medical Hypotheses*, 78, 423-427.
- Pang, J. J., Dai, X., Boye, S. E., Barone, I., Boye, S. L., Mao, S., et al. (2011). Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19, 234-242.
- Pang, J. J., Dai, X., Boye, S. E., Barone, I., Boye, S. L., Mao, S., et al. (2011). Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 19, 234-242.
- Paquet-Durand, F., Azadi, S., Hauck, S. M., Ueffing, M., van Veen, T., & Ekstrom, P. (2006). Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *Journal of Neurochemistry*, 96, 802-814.
- Paquet-Durand, F., Beck, S., Michalakis, S., Goldmann, T., Huber, G., Muhlfriedel, R., et al. (2011). A key role for cyclic nucleotide gated (CNG) channels in cGMP-related retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 20, 941-947.
- Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31, S170-80.

- Patchev, V. K., Montkowski, A., Rouskova, D., Koranyi, L., Holsboer, F., & Almeida, O. F. (1997). Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events. *The Journal of Clinical Investigation*, 99, 962-966.
- Peng, B., Xiao, J., Wang, K., So, K. F., Tipoe, G. L., & Lin, B. (2014). Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34, 8139-8150.
- Perrault, I., Rozet, J. M., Calvas, P., Gerber, S., Camuzat, A., Dollfus, H., et al. (1996). Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in leber's congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 14, 461-464.
- Perrault, I., Rozet, J. M., Gerber, S., Ghazi, I., Ducroq, D., Souied, E., et al. (2000). Spectrum of retGC1 mutations in leber's congenital amaurosis. *European Journal of Human Genetics*, 8, 578-582.
- Petrs-Silva, H., & Linden, R. (2013). Advances in recombinant adeno-associated viral vectors for gene delivery. *Current Gene Therapy*, 13, 335-345.
- Petrs-Silva, H., & Linden, R. (2014). Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clinical Ophthalmology*, 8, 127-136.
- Pfeffer, B. A., & Philp, N. J. (2014). Cell culture of retinal pigment epithelium: Special issue. *Experimental Eye Research*, 126, 1-4.
- Phillips, M. J., Walker, T. A., Choi, H. Y., Faulkner, A. E., Kim, M. K., Sidney, S. S., et al. (2008). Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 2148-2155.
- Piermarocchi, S., Saviano, S., Parisi, V., Tedeschi, M., Panozzo, G., Scarpa, G., et al. (2012). Carotenoids in age-related maculopathy italian study (CARMIS): Two-year results of a randomized study. *European Journal of Ophthalmology*, 22, 216-225.
- Piri, N., Gao, Y. Q., Danciger, M., Mendoza, E., Fishman, G. A., & Farber, D. B. (2005). A substitution of G to C in the cone cGMP-phosphodiesterase gamma subunit gene found in a distinctive form of cone dystrophy. *Ophthalmology*, 112, 159-166.

- Pittler, S. J., & Baehr, W. (1991). The molecular genetics of retinal photoreceptor proteins involved in cGMP metabolism. *Progress in Clinical and Biological Research*, 362, 33-66.
- Poulsen, H. E., Prieme, H., & Loft, S. (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, 7, 9-16.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Prokai-Tatrai, K., Xin, H., Nguyen, V., Szarka, S., Blazics, B., Prokai, L., et al. (2013). 17beta-estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an in vivo model of glaucoma. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 3253-3261.
- Pugh, E. N., Jr, Duda, T., Sitaramayya, A., & Sharma, R. K. (1997). Photoreceptor guanylate cyclases: A review. *Bioscience Reports*, 17, 429-473.
- Punzo, C., Xiong, W., & Cepko, C. L. (2012). Loss of daylight vision in retinal degeneration: Are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 1642-1648.
- Qian, X., Cao, H., Ma, Q., Wang, Q., He, W., Qin, P., et al. (2015). Allopregnanolone attenuates Aβ<sub>25-35</sub>-induced neurotoxicity in PC12 cells by reducing oxidative stress. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8, 13610-13615.
- Rajendram, R., Saraswathy, S., & Rao, N. A. (2007). Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in early experimental autoimmune uveoretinitis. *The British Journal of Ophthalmology*, 91, 531-537.
- Ramachandran, V., Watts, L. T., Maffi, S. K., Chen, J., Schenker, S., & Henderson, G. (2003). Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 74, 577-588.
- Ramamurthy, V., Niemi, G. A., Reh, T. A., & Hurley, J. B. (2004). Leber congenital amaurosis linked to AIPL1: A mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13897-13902.

- Ramassamy, C., Averill, D., Beffert, U., Theroux, L., Lussier-Cacan, S., Cohn, J. S., et al. (2000). Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease*, 7, 23-37.
- Ramirez, J. M., Trivino, A., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., & Garcia-Sanchez, J. (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Research*, 36, 2029-2036.
- Ramirez, J. M., Trivino, A., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., & Garcia-Sanchez, J. (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Research*, 36, 2029-2036.
- Ramón y Cajal S. (1982). *The structure of the retina*. Thomas Illinois. 1982.
- Rao, G. N., & Berk, B. C. (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation Research*, 70(3), 593-599.
- Rao, K. N., Anand, M., & Khanna, H. (2016). The carboxyl terminal mutational hotspot of the ciliary disease protein RRGORF15 (retinitis pigmentosa GTPase regulator) is glutamylated in vivo. *Biology Open*, 5, 424-428.
- Rapp, L. M., Maple, S. S., & Choi, J. H. (2000). Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1200-1209.
- Raso, G. M., Esposito, E., Vitiello, S., Iacono, A., Santoro, A., D'Agostino, G., et al. (2011). Palmitoylethanolamide stimulation induces allopregnanolone synthesis in C6 cells and primary astrocytes: Involvement of peroxisome-proliferator activated receptor-alpha. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 591-600.
- Rawson J.D. (1989). *Biochemistry*. 2ª edición. McGraw Hill-Interamericana.
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research*, 186, 113-137.
- Reddy, D. S., & Rogawski, M. A. (2009). Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6, 392-401.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (2007). Capturing cyclic nucleotides in action: Snapshots from crystallographic studies. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 8, 63-73.

- Reichenbach, A., Stolzenburg, J. U., Wolburg, H., Hartig, W., el-Hifnawi, E., & Martin, H. (1995). Effects of enhanced extracellular ammonia concentration on cultured mammalian retinal glial (muller) cells. *Glia*, 13, 195-208.
- Reveillaud, I., Niedzwiecki, A., Bensch, K. G., & Fleming, J. E. (1991). Expression of bovine superoxide dismutase in *drosophila melanogaster* augments resistance of oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 632-640.
- Rex, T. S., Allocca, M., Domenici, L., Surace, E. M., Maguire, A. M., Lyubarsky, A., et al. (2004). Systemic but not intraocular epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. *Molecular Therapy*, 10, 855-861.
- Rezaie, P., Dean, A., Male, D., & Ulfing, N. (2005). Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cerebral Cortex*, 15, 938-949.
- Richman, P. G., & Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 1422-1426.
- Ringvold, A. (1996). The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Experimental Eye Research*, 62, 261-264.
- Rivett, A. J. (1986). Regulation of intracellular protein turnover: Covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 28, 291-337.
- Robel, S., Berninger, B., & Gotz, M. (2011). The stem cell potential of glia: Lessons from reactive gliosis. *Nature Reviews.Neuroscience*, 12, 88-104.
- Roche, E., & Romero-Alvira, D. (1995). Role of oxidative stress in gene expression: Myocardial and cerebral ischemia, cancer and other diseases. [Papel del estres oxidativo en la expresion de genes: isquemia miocardica, cerebral, cancer y otras enfermedades] *Medicina Clinica*, 104, 468-476.
- Roesch, K., Stadler, M. B., & Cepko, C. L. (2012). Gene expression changes within muller glial cells in retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 18, 1197-1214.
- Rone, M. B., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2009). Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1791, 646-658.

- Roque, R. S., & Caldwell, R. B. (1990). Muller cell changes precede vascularization of the pigment epithelium in the dystrophic rat retina. *Glia*, 3, 464-475.
- Ross, J. W., Fernandez de Castro, J. P., Zhao, J., Samuel, M., Walters, E., Rios, C., et al. (2012). Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 501-507.
- Rossetti, M. F., Varayoud, J., Moreno-Piovan, G. S., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 330-338.
- Rożanowska, M., Bakker, L., Boulton, M. E., & Rożanowski, B. (2012). Concentration dependence of vitamin C in combinations with vitamin E and zeaxanthin on light-induced toxicity to retinal pigment epithelial cells. *Photochemistry and Photobiology*, 88, 1408-1417.
- Russo, R., Cavaliere, F., Watanabe, C., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M. T., et al. (2008). 17 $\beta$ -estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. *Progress in Brain Research*, 173, 583-590.
- Rutar, M., Natoli, R., & Provis, J. M. (2012). Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in muller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 221-2094-9-221.
- Rybczyńska, M. (1994). Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. [Biochemiczne podstawy wolnorodnikowego uszkodzenia tkanek] *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 48, 419-441.
- Sahin, M., Sagdic, G., Elmas, O., Akpınar, D., Derin, N., Aslan, M., et al. (2006). Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacological Research*, 54, 247-252.
- Sahni, J. N., Angi, M., Irigoyen, C., Semeraro, F., Romano, M. R., & Parmeggiani, F. (2011). Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: From neuroprotection to gene therapy. *Current Genomics*, 12, 276-284.

- Sanchez-Vallejo, V., Benlloch-Navarro, S., Lopez-Pedrajas, R., Romero, F. J., & Miranda, M. (2015). Neuroprotective actions of progesterone in an in vivo model of retinitis pigmentosa. *Pharmacological Research*, 99, 276-288.
- Sanchez-Vallejo, V., Benlloch-Navarro, S., Trachsel-Moncho, L., Lopez-Pedrajas, R., Almansa, I., Romero, F. J., et al. (2016). Alterations in glutamate cysteine ligase content in the retina of two retinitis pigmentosa animal models. *Free Radical Biology & Medicine*, 96, 245-254.
- Sancho-Pelluz, J., Arango-Gonzalez, B., Kustermann, S., Romero, F. J., van Veen, T., Zrenner, E., et al. (2008). Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Molecular Neurobiology*, 38, 253-269.
- Santos, J. M., & Kowluru, R. A. (2011). Role of mitochondria biogenesis in the metabolic memory associated with the continued progression of diabetic retinopathy and its regulation by lipoic acid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 8791-8798.
- Sanvicens, N., Gomez-Vicente, V., Masip, I., Messeguer, A., & Cotter, T. G. (2004). Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 39268-39278.
- Sanz, M. M., Johnson, L. E., Ahuja, S., Ekstrom, P. A., Romero, J., & van Veen, T. (2007). Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience*, 145, 1120-1129.
- Sarkaki, A. R., Khaksari Haddad, M., Soltani, Z., Shahrokhi, N., & Mahmoodi, M. (2013). Time- and dose-dependent neuroprotective effects of sex steroid hormones on inflammatory cytokines after a traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 30, 47-54.
- Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Noda, K., Imamura, Y., Kobayashi, S., et al. (2009). Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 1433-1439.
- Schmidt, S. Y., & Berson, E. L. (1990). Opsin phosphorylation in retinas from autopsy eyes with retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31, 1023-1028.
- Schnitzer, J. (1988). Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, muller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 44, 59-72.

- Schramm, H., Robertson, L. W., & Oesch, F. (1985). Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 34, 3735-3739.
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J. P., Mattern, C., & Ghomari, A. M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: Implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 10.
- Scott, B. C., Aruoma, O. I., Evans, P. J., O'Neill, C., Van der Vliet, A., Cross, C. E., et al. (1994). Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radical Research*, 20, 119-133.
- Seelig, G. F., & Meister, A. (1984). Gamma-glutamylcysteine synthetase. interactions of an essential sulfhydryl group. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 3534-3538.
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1790, 1149-1160.
- Shen, J., Yang, X., Dong, A., Petters, R. M., Peng, Y. W., Wong, F., et al. (2005). Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 203, 457-464.
- Shi, M. M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L., & Forman, H. J. (1994). Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26512-26517.
- Shi, Z. Z., Habib, G. M., Rhead, W. J., Gahl, W. A., He, X., Sazer, S., et al. (1996). Mutations in the glutathione synthetase gene cause 5-oxoprolinuria. *Nature Genetics*, 14, 361-365.
- Shimojo, T., Hiroe, M., Ishiyama, S., Ito, H., Nishikawa, T., & Marumo, F. (1999). Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway. *Experimental Cell Research*, 247, 38-47.
- Shin, J. Y., & Yu, H. G. (2014). Chlorogenic acid supplementation improves multifocal electroretinography in patients with retinitis pigmentosa. *Journal of Korean Medical Science*, 29, 117-121.
- Shu, X., Black, G. C., Rice, J. M., Hart-Holden, N., Jones, A., O'Grady, A., et al. (2007). RPGR mutation analysis and disease: An update. *Human Mutation*, 28, 322-328.

- Shu, X., Pang, J. J., Zhang, H., & Mansfield, D. (2015). Retinitis pigmentosa: Disease mechanisms, diagnosis, and therapies. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 819452.
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., et al. (1994). Alterations in glutathione levels in parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology*, 36, 348-355.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91, 31S-38S.
- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69, 965-968.
- Slepneva, I. A., Sergeeva, S. V., & Khramtsov, V. V. (1995). Reversible inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase by alpha-lipoic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214, 1246-1253.
- Smith, A. J., Schlichtenbrede, F. C., Tschernutter, M., Bainbridge, J. W., Thrasher, A. J., & Ali, R. R. (2003). AAV-mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 8, 188-195.
- Smolenski, A., Burkhardt, A. M., Eigenthaler, M., Butt, E., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., et al. (1998). Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 358, 134-139.
- Sobrado, P., Goren, M. A., James, D., Amundson, C. K., & Fox, B. G. (2008). A protein structure initiative approach to expression, purification, and in situ delivery of human cytochrome b5 to membrane vesicles. *Protein Expression and Purification*, 58, 229-241.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32, 638-647.
- Sokal, I., Dupps, W. J., Grassi, M. A., Brown, J., Jr, Affatigato, L. M., Roychowdhury, N., et al. (2005). A novel GCAP1 missense mutation (L151F) in a large family with autosomal dominant cone-rod dystrophy (adCORD). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 1124-1132.
- Soto, F., & Kerschensteiner, D. (2015). Synaptic remodeling of neuronal circuits in early retinal degeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 395.

- Sparrow, J. R., Hicks, D., & Hamel, C. P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current Molecular Medicine*, 10, 802-823.
- Stacey, P., Rulten, S., Dapling, A., & Phillips, S. C. (1998). Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 249-254.
- Stadtman, E. R., & Oliver, C. N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. physiological consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 2005-2008.
- Steele, E. C., Jr, Guo, Q., & Namura, S. (2008). Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 39, 2099-2104.
- Stein, D. G. (2001). Brain damage, sex hormones and recovery: A new role for progesterone and estrogen? *Trends in Neurosciences*, 24, 386-391. doi:S0166-2236(00)01821-X [pii]
- Stoffel-Wagner, B. (2001). Neurosteroid metabolism in the human brain. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 145, 669-679.
- Stoyanovsky, D. A., Goldman, R., Darrow, R. M., Organisciak, D. T., & Kagan, V. E. (1995). Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid. *Current Eye Research*, 14, 181-189.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85, 845-881.
- Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: The eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 74, 179-185.
- Strettoi, E., & Pignatelli, V. (2000). Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11020-11025.
- Suber, M. L., Pittler, S. J., Qin, N., Wright, G. C., Holcombe, V., Lee, R. H., et al. (1993). Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3968-3972.

- Subramanian, K., Mohideen, S. S., Suzumura, A., Asai, N., Murakumo, Y., Takahashi, M., et al. (2012). Exposure to 1-bromopropane induces microglial changes and oxidative stress in the rat cerebellum. *Toxicology*, 302, 18-24.
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., et al. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3381-3386.
- Suria, H., Chau, L. A., Negrou, E., Kelvin, D. J., & Madrenas, J. (1999). Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism. *Life Sciences*, 65, 2697-2707.
- Svensk, A. M., Soini, Y., Paakko, P., Hiravikoski, P., & Kinnula, V. L. (2004). Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 122, 395-404.
- Tackenberg, M. A., Tucker, B. A., Swift, J. S., Jiang, C., Redenti, S., Greenberg, K. P., et al. (2009). Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Molecular Vision*, 15, 1886-1896.
- Tada, A., Wada, Y., Sato, H., Itabashi, T., Kawamura, M., Tamai, M., et al. (2006). Screening of the MERTK gene for mutations in japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 12, 441-444.
- Takano, Y., Ohguro, H., Dezawa, M., Ishikawa, H., Yamazaki, H., Ohguro, I., et al. (2004). Study of drug effects of calcium channel blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 1015-1022.
- Takeuchi, K., Nakazawa, M., & Mizukoshi, S. (2008). Systemic administration of nilvadipine delays photoreceptor degeneration of heterozygous retinal degeneration slow (rds) mouse. *Experimental Eye Research*, 86, 60-69.
- Talcott, K. E., Ratnam, K., Sundquist, S. M., Lucero, A. S., Lujan, B. J., Tao, W., et al. (2011). Longitudinal study of cone photoreceptors during retinal degeneration and in response to ciliary neurotrophic factor treatment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 2219-2226.

- Tamasi, V., Jeffries, J. M., Arteel, G. E., & Falkner, K. C. (2004). Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431, 161-168.
- Tan, S. M., Deliyanti, D., Figgett, W. A., Talia, D. M., de Haan, J. B., & Wilkinson-Berka, J. L. (2015). Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial muller cell and vascular injury in the retina. *Experimental Eye Research*, 136, 1-8.
- Tang, H., Hua, F., Wang, J., Yousuf, S., Atif, F., Sayeed, I., et al. (2015). Progesterone and vitamin D combination therapy modulates inflammatory response after traumatic brain injury. *Brain Injury*, 1-10.254
- Tao, W., Wen, R., Goddard, M. B., Sherman, S. D., O'Rourke, P. J., Stabila, P. F., et al. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 3292-3298.
- Taylor, H. M., McRobert, L., Grainger, M., Sicard, A., Dluzewski, A. R., Hopp, C. S., et al. (2010). The malaria parasite cyclic GMP-dependent protein kinase plays a central role in blood-stage schizogony. *Eukaryotic Cell*, 9, 37-45.
- Telfer, J. F., & Brock, J. H. (2004). Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 10, BR91-5.
- Testa, F., Maguire, A. M., Rossi, S., Pierce, E. A., Melillo, P., Marshall, K., et al. (2013). Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmology*, 120, 1283-1291.
- Thiadens, A. A., den Hollander, A. I., Roosing, S., Nabuurs, S. B., Zekveld-Vroon, R. C., Collin, R. W., et al. (2009). Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *American Journal of Human Genetics*, 85, 240-247.
- Thomas, P., & Pang, Y. (2012). Membrane progesterone receptors: Evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*, 96, 162-171.

- Torchinsky, A., & Toder, V. (2007). TNF $\alpha$  in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: Functions and targets. *The Review of Diabetic Studies*, 4, 200-209.
- Tosi, J., Davis, R. J., Wang, N. K., Naumann, M., Lin, C. S., & Tsang, S. H. (2011). shRNA knockdown of guanylate cyclase 2e or cyclic nucleotide gated channel alpha 1 increases photoreceptor survival in a cGMP phosphodiesterase mouse model of retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15, 1778-1787.
- Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 1000-1013.
- Trush, M. A., Mimnaugh, E. G., & Gram, T. E. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochemical Pharmacology*, 31, 3335-3346.
- Tucker, C. L., Woodcock, S. C., Kelsell, R. E., Ramamurthy, V., Hunt, D. M., & Hurley, J. B. (1999). Biochemical analysis of a dimerization domain mutation in RetGC-1 associated with dominant cone-rod dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9039-9044.
- Tuntivanich, N., Pittler, S. J., Fischer, A. J., Omar, G., Kiupel, M., Weber, A., et al. (2009). Characterization of a canine model of autosomal recessive retinitis pigmentosa due to a PDE6A mutation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 801-813.
- Uga, S., & Smelser, G. K. (1973). Electron microscopic study of the development of retinal mullerian cells. *Investigative Ophthalmology*, 12, 295-307.
- Umapathy, A., Donaldson, P., & Lim, J. (2013). Antioxidant delivery pathways in the anterior eye. *BioMed Research International*, 2013, 207250.
- Uno, K., Prow, T. W., Bhutto, I. A., Yerrapureddy, A., McLeod, D. S., Yamamoto, M., et al. (2010). Role of Nrf2 in retinal vascular development and the vaso-obliterative phase of oxygen-induced retinopathy. *Experimental Eye Research*, 90, 493-500.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

- Valter, K., Maslim, J., Bowers, F., & Stone, J. (1998). Photoreceptor dystrophy in the RCS rat: Roles of oxygen, debris, and bFGF. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39, 2427-2442.
- Van Vleet, J. F., Boon, G. D., & Ferrans, V. J. (1981). Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc: Protection by selenium or vitamin E supplements. *American Journal of Veterinary Research*, 42, 1206-1217.
- Vecino, E., Heller, J. P., Veiga-Crespo, P., Martin, K. R., & Fawcett, J. W. (2015). Influence of extracellular matrix components on the expression of integrins and regeneration of adult retinal ganglion cells. *PloS One*, 10, e0125250.
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1-40.
- Venkatesh, K., Srikanth, L., Vengamma, B., Chandrasekhar, C., Sanjeevkumar, A., Mouleshwara Prasad, B. C., et al. (2013). In vitro differentiation of cultured human CD34+ cells into astrocytes. *Neurology India*, 61, 383-388.
- Vigneswara, V., Esmaili, M., Deer, L., Berry, M., Logan, A., & Ahmed, Z. (2015). Eye drop delivery of pigment epithelium-derived factor-34 promotes retinal ganglion cell neuroprotection and axon regeneration. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 68, 212-221.
- Voloboueva, L. A., Liu, J., Suh, J. H., Ames, B. N., & Miller, S. S. (2005). (R)-alpha-lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 4302-4310.
- Wang, H., Liu, H., & Liu, R. M. (2003). Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. *Experimental Gerontology*, 38, 507-517.
- Wei, W., Li, L., Zhang, Y., Geriletu, Yang, J., Zhang, Y., et al. (2014). Vitamin C protected human retinal pigmented epithelium from oxidant injury depending on regulating SIRT1. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 750634.
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., & Sieving, P. A. (2012). CNTF and retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 136-151.

- Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., & Reme, C. E. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24, 275-306.
- Wert, K. J., Lin, J. H., & Tsang, S. H. (2014). General pathophysiology in retinal degeneration. *Developments in Ophthalmology*, 53, 33-43.
- West, E. L., Gonzalez-Cordero, A., Hippert, C., Osakada, F., Martinez-Barbera, J. P., Pearson, R. A., et al. (2012). Defining the integration capacity of embryonic stem cell-derived photoreceptor precursors. *Stem Cells* 30, 1424-1435.
- Wickham, L. A., Gao, J., Toda, I., Rocha, E. M., Ono, M., & Sullivan, D. A. (2000). Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 78, 146-153.
- Wilding, C., Bell, K., Funke, S., Beck, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2015). GFAP antibodies show protective effect on oxidatively stressed neuroretinal cells via interaction with ERP57. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127, 298-304.
- Wilson, J. X. (1997). Antioxidant defense of the brain: A role for astrocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75, 1149-1163.
- Wise, L. A., Palmer, J. R., Harlow, B. L., Spiegelman, D., Stewart, E. A., Adams-Campbell, L. L., et al. (2004). Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in african-american women: A prospective study. *American Journal of Epidemiology*, 159, 113-123.
- Wollin, S. D., & Jones, P. J. (2003). Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition*, 133, 3327-3330.
- Woo, J. M., Shin, D. Y., Lee, S. J., Joe, Y., Zheng, M., Yim, J. H., et al. (2012). Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *Molecular Vision*, 18, 901-908.
- Woods, J. S., Davis, H. A., & Baer, R. P. (1992). Enhancement of gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in rat kidney by methyl mercury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 296, 350-353.

- Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M., & Bhattacharya, S. S. (2010). Photoreceptor degeneration: Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature Reviews Genetics*, 11, 273-284.
- Wu, J., Marmorstein, A. D., & Peachey, N. S. (2006). Functional abnormalities in the retinal pigment epithelium of CFTR mutant mice. *Experimental Eye Research*, 83, 424-428.
- Xu, J., & Peng, Q. (2015). Retinitis pigmentosa treatment with western medicine and traditional chinese medicine therapies. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 421269.
- Xu, Z., Wei, Y., Gong, J., Cho, H., Park, J. K., Sung, E. R., et al. (2014). NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*, 57, 204-213.
- Yamada, H., Yamada, E., Ando, A., Esumi, N., Bora, N., Saikia, J., et al. (2001). Fibroblast growth factor-2 decreases hyperoxia-induced photoreceptor cell death in mice. *The American Journal of Pathology*, 159, 1113-1120.
- Yamada, H., Yamada, E., Hackett, S. F., Ozaki, H., Okamoto, N., & Campochiaro, P. A. (1999). Hyperoxia causes decreased expression of vascular endothelial growth factor and endothelial cell apoptosis in adult retina. *Journal of Cellular Physiology*, 179, 149-156.
- Yamane, Y., Furuichi, M., Song, R., Van, N. T., Mulcahy, R. T., Ishikawa, T., et al. (1998). Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 31075-31085.
- Yang, Y., Dieter, M. Z., Chen, Y., Shertzer, H. G., Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2002). Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit *gclm*(-/-) knockout mouse. novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 49446-49452.
- Yorek, M. A., Coppey, L. J., Gellett, J. S., Davidson, E. P., & Lund, D. D. (2004). Effect of fidearestat and alpha-lipoic acid on diabetes-induced epineurial arteriole vascular dysfunction. *Experimental Diabetes Research*, 5, 123-135.
- Yu, C. C., Nandrot, E. F., Dun, Y., & Finnemann, S. C. (2012). Dietary antioxidants prevent age-related retinal pigment epithelium actin damage and blindness in mice lacking  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *Free Radical Biology & Medicine*, 52, 660-670.

- 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. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 2013-2019.
- Yu, D. Y., Cringle, S. J., Su, E. N., & Yu, P. K. (2000). Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3999-4006.
- Yu, X., Rajala, R. V., McGinnis, J. F., Li, F., Anderson, R. E., Yan, X., et al. (2004). Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 13086-13094.
- Yvon, C., Ramsden, C. M., Lane, A., Powner, M. B., da Cruz, L., Coffey, P. J., et al. (2015). Using stem cells to model diseases of the outer retina. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 382-389.
- Zampieri, S., Mellon, S. H., Butters, T. D., Nevyjel, M., Covey, D. F., Bembi, B., et al. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: Protective effect of allopregnanolone. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 3786-3796.
- Zeng, H., Ding, M., Chen, X. X., & Lu, Q. (2014). Microglial NADPH oxidase activation mediates rod cell death in the retinal degeneration in rd mice. *Neuroscience*, 275, 54-61.
- Zeng, H. Y., Zhu, X. A., Zhang, C., Yang, L. P., Wu, L. M., & Tso, M. O. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 2992-2999.
- Zhang, C., & Tso, M. O. (2003). Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *Journal of Neuroscience Research*, 73, 840-845.
- Zhang, S., Wu, J., Wu, X., Xu, P., Tian, Y., Yi, M., et al. (2012). Enhancement of rAAV2-mediated transgene expression in retina cells in vitro and in vivo by coadministration of low-dose chemotherapeutic drugs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 2675-2684.
- Zhao, F., & Liu, Z. Q. (2011). Comparison of antioxidant effectiveness of lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25, 216-223.

- Zhao, L., Liu, Z., Jia, H., Feng, Z., Liu, J., & Li, X. (2015). Lipoamide acts as an indirect antioxidant by simultaneously stimulating mitochondrial biogenesis and phase II antioxidant enzyme systems in ARPE-19 cells. *PLoS One*, 10, e0128502.
- Zhao, R. R., Xu, F., Xu, X. C., Tan, G. J., Liu, L. M., Wu, N., et al. (2015). Effects of alpha-lipoic acid on spatial learning and memory, oxidative stress, and central cholinergic system in a rat model of vascular dementia. *Neuroscience Letters*, 587, 113-119.
- Zheng, A., Li, Y., & Tsang, S. H. (2015). Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15, 391-402.
- Zheng, X. R., Zhang, S. S., Yin, F., Tang, J. L., Yang, Y. J., Wang, X., et al. (2012). Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats. *Behavioural Brain Research*, 230, 108-115.
- Zimmerman, M. C., Lazartigues, E., Lang, J. A., Sinnayah, P., Ahmad, I. M., Spitz, D. R., et al. (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circulation Research*, 91, 1038-1045.
- Zmijewski, M. A., Sharma, R. K., & Slominski, A. T. (2007). Expression of molecular equivalent of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult retinal pigment epithelium. *The Journal of Endocrinology*, 193, 157-169.
- Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K. U., Benav, H., Besch, D., Bruckmann, A., Gabel, V. P., et al. (2011). Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings Biological Sciences/the Royal Society*, 278, 1489-1497.

