

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



**“Efecto y mecanismo de acción de la  
progesterona tras su administración  
oral en el ratón rd10: un modelo  
experimental de retinosis  
pigmentaria”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: M<sup>a</sup> Soledad Benlloch Navarro

Dirigida por: Dra. Dña. María Miranda Sanz

Dr. D. José Miguel Soria López

**VALENCIA**

**2015**



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.
- Beca FPD1 de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, desde Febrero del año 2012 hasta Julio del año 2014.
- Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral, programa Valid+d convocatoria 2014, Generalitat Valenciana, desde Julio del año 2014 hasta Septiembre de 2015.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
1. Estructura del ojo.....	15
1.1. Circulación sanguínea en la retina.....	18
2. Estructura microscópica de la retina.....	19
2.1. Células y capas microscópicas de la retina .....	20
2.1.1. Epitelio pigmentario de la retina .....	21
2.1.2. Segmentos externos de los fotorreceptores .....	23
2.1.2.1. Fotorreceptores: bastones y conos.....	23
2.1.2.2 Mecanismo de renovación de los discos del segmento externo de los fotorreceptores.....	25
2.1.3. Membrana limitante externa .....	25
2.1.4. Capa nuclear interna .....	26
2.1.5. Capa de células ganglionares .....	26
2.1.5.1. Células ganglionares .....	27
2.1.6. Membrana limitante interna .....	28
2.1.6.1. Células gliales.....	28
3. Fotoquímica de la visión .....	29
3.1. La transducción visual.....	29
3.1.1. Los pigmentos visuales .....	29
3.1.2. La cascada de fototransducción .....	30
3.1.2.1. Oscuridad.....	30
3.1.2.2. Luz: activación y amplificación de la cascada .....	31
3.1.3. Cascada de inactivación.....	33
3.2. El ciclo visual.....	34

4. Estrés oxidativo .....	35
4.1. Radicales libres.....	36
4.2. Antioxidantes.....	37
4.3. El sistema glutatión.....	37
4.3.1. Síntesis de GSH .....	37
4.3.2. Funciones del GSH.....	38
4.3.2.1. Función antioxidante del GSH .....	39
4.3.2.2. Mantenimiento del estado tiol en las proteínas.....	40
4.4. Peroxidación lipídica .....	41
4.4.1. Malondialdehído .....	42
5. Retinosis pigmentaria .....	43
5.1. Incidencia y fisiopatología de la enfermedad.....	43
5.2. Base genética de la retinosis pigmentaria .....	44
5.3. Muerte celular programada y autofagia .....	45
5.3.1. Apoptosis y retinosis pigmentaria .....	45
5.3.2. Autofagia y retinosis pigmentaria.....	47
5.4. La inflamación en la retinosis pigmentaria .....	48
5.5. Terapias en el tratamiento de la retinosis pigmentaria .....	49
5.5.1. Terapia génica .....	50
5.5.2. Neuroreparación.....	51
5.5.2.1. Terapia celular .....	51
5.5.2.2. Implantes de retina .....	53
5.5.2.3. Optogenética.....	53
5.5.3. Neuroprotección .....	54
5.6. Estrés oxidativo y retinosis pigmentaria.....	55
5.6.1. Peroxidación lipídica y retinosis pigmentaria.....	57
5.6.2. Antioxidantes presentes en la retina.....	58
5.6.3. Los antioxidantes en el tratamiento de la retinosis pigmentaria .....	59

5.7. Modelos animales en la retinosis pigmentaria .....	61
6. Esteroides y neuroprotección .....	63
6.1. Neuroesteroides y progesterona.....	64
6.1.1. Síntesis de progesterona.....	65
6.1.2. Metabolismo de la progesterona .....	67
6.1.3. Biodisponibilidad y toxicidad de la progesterona.....	68
6.1.4. Funciones de la progesterona .....	70
6.1.4.1. Neuroprotección.....	71
6.1.4.2. Disminución de apoptosis .....	71
6.1.4.3. Modulación de los receptores GABA <sub>A</sub> .....	72
6.1.4.4. Antioxidante .....	72
6.1.4.5. Antiinflamatorio .....	72
6.2. La progesterona en la retina .....	73
6.3. Situación actual de tratamientos neuroprotectores con progesterona.....	74
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>79</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>83</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
1. Tratamiento y manejo de los animales de experimentación.....	87
1.1. Condiciones de estabulación .....	87
1.2. Manejo de los animales .....	87
2. Diseño experimental .....	88
2.1. Caracterización histológica y muerte celular en un modelo de ratón rd10 .....	88
2.2. Tratamiento con progesterona .....	88
3. Obtención y procesado de muestras .....	90
3.1. Estudio <i>in vivo</i> .....	91
3.1.1. Estudio histológico y de inmunofluorescencia .....	91
3.1.2. Análisis bioquímico .....	91

3.1.2.1. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia de glutamato, glutatión, disulfuro de glutatión y determinación del malondialdehído.....	91
3.1.2.2. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot.....	91
3.2. Estudio <i>ex vivo</i> .....	92
3.2.1. Inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de tejido de ratón ...	92
3.3. Estudio <i>in vitro</i> .....	92
3.3.1. Determinación de la viabilidad celular de un cultivo de células ARPE-19 ...	92
4. Procedimientos y técnicas.....	93
4.1. Estudio <i>in vivo</i> .....	93
4.1.1. Estudio histológico: tinción de hematoxilina-eosina .....	93
4.1.2 Detección mediante la técnica de marcaje con la técnica TUNEL .....	95
4.1.3. Detecciones por inmunofluorescencia.....	96
4.1.4. Análisis bioquímico.....	98
4.1.4.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry .....	98
4.1.4.2. Determinación de las concentraciones de glutamato, glutatión y disulfuro de glutatión.....	99
4.1.4.3. Determinación de la concentración de malondialdehído .....	101
4.1.4.4. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot.....	103
4.1.4.4.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford .....	103
4.1.4.4.2. Técnica de Western blot.....	104
4.2. Estudio <i>ex vivo</i> .....	107
4.2.1. Inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de hígado de ratón	107
4.3. Estudio <i>in vitro</i> .....	109
4.3.1. Cultivo de células ARPE-19.....	109
4.3.2. Administración de progesterona y sulforafano como pre-tratamiento frente a la inducción de estrés oxidativo en células ARPE-19 con peróxido de hidrógeno .....	110
4.3.3. Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-tetrazolio .....	111
5. Tratamiento estadístico de los resultados .....	112

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>117</b>
1. Caracterización de la degeneración a nivel histológico y de muerte celular en un modelo de ratón rd10 y en ratones C57 .....	117
1.1. Caracterización histológica .....	117
1.2. Caracterización de la muerte celular.....	118
2. Determinación de la dosis óptima para el tratamiento con progesterona.....	120
2.1. Efecto de las diferentes dosis de progesterona en la degeneración de la retina de ratones rd10 .....	120
2.2. Correlaciones del número de filas de fotorreceptores con la dosis creciente de progesterona .....	122
3. La progesterona disminuye la muerte de los fotorreceptores en la retina de los ratones rd10 a día PN21.....	124
3.1. Estudio histológico a día PN21 .....	124
3.2. Estudio de la muerte celular a día PN21 .....	126
4. Efecto de la progesterona sobre la expresión de las proteínas pCREB, CREB, iNOS, BDNF y LC3 en los ratones rd10 y C57 .....	127
4.1. BDNF .....	128
4.2. iNOS .....	128
4.3. pCREB/CREB.....	130
4.4. LC3 .....	132
5. La progesterona altera la óxido nítrico sintetasa neuronal .....	132
6. El tratamiento con progesterona provoca alteraciones en el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd10.....	134
6.1. Cuantificación de la gliosis reactiva en el modelo de ratón rd10 y C57 a día PN21 y PN23 .....	134
6.2. Comparación de la gliosis reactiva en el modelo de ratón rd10 y C57 a día PN21 y PN23 .....	135
7. La progesterona reduce el estrés oxidativo.....	140
7.1. Efecto de la progesterona sobre el glutamato, GSH y GSSG a día PN21 .....	140
7.1.1. Concentraciones de glutamato .....	140
7.1.2. Concentraciones de GSH.....	141
7.1.3. Concentraciones de GSSG .....	141

7.1.4. Ratio GSH/GSSG .....	142
7.2. Cuantificación de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica mediante western blot a día PN21 .....	143
7.3. Efecto de la progesterona sobre la peroxidación lipídica.....	144
7.3.1. Determinación del malondialdehído a día PN21 .....	144
7.3.2. Inducción de la peroxidación lipídica en tejido .....	144
7.4. Determinación de la viabilidad celular en un cultivo con células ARPE-19 tras el tratamiento con sulforafano y progesterona.....	145
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>149</b>
1. Caracterización de la degeneración a nivel histológico y de muerte celular en un modelo de ratón de rd10 y en ratones C57 .....	150
2. Determinación de la dosis óptima para el tratamiento con progesterona.....	153
3. La progesterona disminuye la muerte celular de los fotorreceptores en la retina de los ratones rd10 .....	155
4. Estudio de la progesterona sobre la expresión en la retina de las proteínas BDNF, iNOS, pCREB, CREB y LC3.....	157
4.1. BDNF .....	157
4.2. iNOS .....	159
4.3. pCREB y CREB .....	161
4.4. LC3 .....	163
5. La progesterona altera la óxido nítrico sintetasa neuronal .....	165
6. El tratamiento con progesterona provoca alteraciones en el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd10.....	167
7. La progesterona reduce el estrés oxidativo.....	171
7.1. Efecto de la progesterona sobre el ácido glutámico, el GSH, la enzima GCLC y el GSSG a día PN21 .....	171
7.1.1. Ácido glutámico .....	171
7.1.2. GSH, GCLC y GSSG.....	172
7.2. Efecto de la progesterona sobre la peroxidación lipídica.....	177
7.2.1. Determinación del malondialdehído a día PN21 .....	177
7.2.2. Inducción de la peroxidación lipídica en tejido .....	179

7.3. Determinación de la viabilidad celular en un cultivo con células ARPE-19 tras el tratamiento con sulforafano y progesterona.....	180
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>189</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**AAV** (Adenoassociated virus): Virus adeno-asociado recombinante

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

**Arr**: Proteína Arrestina

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

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

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

**BHR**: Barrera hematorretiniana

**BHT**: Butil-hidroxitolueno

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

**CCG**: Capa de células ganglionares

**CMZ** (Ciliar marginal zone): Zona marginal ciliar

**CNE**: Capa nuclear externa

**CNI**: Capa nuclear interna

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

**CPE**: Capa plexiforme externa

**CPI**: Capa plexiforme interna

**CREB** (cAMP response element-binding): Elemento de unión y respuesta al AMPc

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

**DHA** (Docosahexaenoic acid): Ácido docosahexanoico

**DHEA**: Dehidroepiandrosterona

**DHEAS**: Dehidroepiandrosterona sulfato

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

**DL50**: Dosis letal 50

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

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNFB:** Dinitrofluorobenceno, reactivo de Sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno

**DNP** (2,4-dinitrophenyl): Derivados 2,4-dinitrofenil

**DTT:** Ditiotreitól

**EPR:** Epitelio pigmentario de la retina

**ERG:** Electrorretinograma

**ESC** (Embryonic stem cells): Células madre embrionarias

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

**FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:** Sulfato de hierro heptahidratado

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

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

**GCAP** (Guanylate cyclase-activating proteins): Proteínas activadoras de la guanilato ciclasa

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

**GCLC:** Glutamato cisteína ligasa catalítica

**GCLM:** Glutamato cisteína ligasa modificadora

**GNDF** (Glial cell line-derived neurotrophic factor): Factor neurotrófico derivado de la línea celular de glía

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

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

**Gln:** Glutamina

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

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GR:** GSSG reductasa

**GS:** Glutación sintetasa

**GSH:** Glutación

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

**G $\alpha$ -GTP** (G $\alpha$ -guanosine triphosphate): G $\alpha$ -guanosín trifosfato

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

**HCLO**: Ácido hipocloroso

**HE**: Hematoxilina-eosina

**4-HNE**: 4-hidroxinonenal

**HO $_2$  $\cdot$** : Radical hidroperóxido

**HPLC** (High pressure liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta eficacia

**HRP** (Horseradish peroxidase): Peroxidasa de rábano

**3 $\alpha$ -HSD** (3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase): 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**3 $\beta$ -HSD** (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase): 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**HSE**: Hidroxiesteroide epimerasa

**3 $\alpha$ -HSOR** (3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxido-reductase): 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidorreductasa

**ICER** (Inducible cGMP early repressor): Represor temprano inducible de GMPC

**IGF I** (Insulin like-growht factor I): Factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IL**: Interleuquina

**iNOS** (Inducible nitric oxide synthase): Óxido nítrico sintetasa inducible

**ipRGCs** (Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells): Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles

**iPS** (Induced pluripotent stem cells): Células madre pluripotentes inducidas

**LC3** (Light chain 3): Anticuerpo de cadena ligera 3

**LOO $\cdot$** : Radical peróxido lipídico

**LOOH**: Radical hidroxiperóxido lipídico

**MAPK** (Mitogen-activated protein kinases): Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MDA**: Malondialdehído

**MLE**: Membrana limitante externa

**MLI**: Membrana limitante interna

**MSC** (Mesenchimal stem cells): Células madre mesenquimales

**MTT:** 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-tetrazolio

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

**NF- $\kappa$ B** (NF- $\kappa$ B; nuclear factor kappa B): Factor nuclear kappa B

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

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

**$\cdot$ NO:** Óxido nítrico

**$\text{NO}_2\cdot$ :** Dióxido nítrico

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

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

**$\text{O}_2\cdot^-$ :** Anión superóxido

**$\cdot$ OH** (Hydroxyl radical): Radical hidroxilo

**$\text{ONOO}\cdot$ :** Radical peroxinitrito

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

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

**pCREB** (Phosphorilated cAMP response element-binding): Elemento fosforilado de unión y respuesta al AMPc

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

**PDE6 $\beta$**  (Phosphodiesterase 6 subunit beta): Subunidad beta de la fosfodiesterasa 6

**PDGF** (Platelet-derived growth factor): Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PEDF** (Pigment epithelium-derived factor): Factor derivado del epitelio pigmentario

**Pen/Strep:** Penicilina-estreptomicina

**PKB** (Protein kinase B): Proteína quinasa B

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

**PN:** Post-natal

**PR:** (Progesterone receptor): Receptor "clásico" de la progesterona

**PREG:** Pregnenolona

**PROTECT** (Progesterone for Traumatic Brain Injury, Experimental Clinical Trial): Ensayos clínicos experimentales para el uso de la progesterona en el daño cerebral traumático

**PUFAs** (Polyunsaturated fatty acids): Ácidos grasos poliinsaturados

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

**PRPH2** (Peripherin 2): Gen de la proteína periferina o RDS

**RBP** (Retinol binding protein): Proteína de unión al retinol

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

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

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

**RdCVFs** (Rod-derived cone viability factors): Factores para la viabilidad de los conos derivados de los bastones

**RDH**: Retinol deshidrogenasa

**RIPA** (Radio-immunoprecipitation assay): Tampón para ensayos de radio-inmunoprecipitación

**RK** (Rhodopsine kinase): Rodopsina quinasa

**RNS** (Reactive nitrogen species): Especies reactivas de nitrógeno

**ROOH**: Radical hidroperóxido

**RO<sup>•</sup>**: Radical alcoxi

**ROO<sup>•</sup>**: Radical peroxi

**ROS** (Reactive oxygen species): Especies reactivas de oxígeno

**RP**: Retinosis pigmentaria

**RPE65** (Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein): Enzima isomerasa del retinal

**SDS** (Sodium dodecyl sulfate): Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE** (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis): Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida

**SNC**: Sistema nervioso central

**SOD**: Superóxido dismutasa

**SRP** (Sporadic retinitis pigmentosa): Retinosis pigmentaria esporádica

**STAIR** (Stroke therapy academic industry roundtable): Mesa redonda académica de la industria para la terapia del ictus

**SYNAPSE** (Study of the Neuroprotective Activity of Progesterone in Severe Traumatic Brain Injuries): Estudio de la actividad neuroprotectora de la progesterona en daños cerebrales traumáticos severos

**TBA** (Thiobarbituric acid): Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** (Thiobarbituric acid reactive substances): Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico

**TBI** (Traumatic brain injury): Daño cerebral traumático

**TEMED**: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

**TGF** (Transforming growth factor): Factor de crecimiento transformante

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

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

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

**WB**: Western blot

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Dibujo de las diferentes cámaras que constituyen el globo ocular y de las diferentes partes del ojo.

**Figura 2.** Imagen representativa de la llegada de la luz a las principales capas de la retina.

**Figura 3.** Capas de la retina.

**Figura 4.** Fotorreceptores.

**Figura 5.** Esquema de la composición de los pigmentos visuales en conos y bastones.

**Figura 6.** Cambios bioquímicos en el interior del bastón en condiciones de oscuridad.

**Figura 7.** Modelo propuesto para el primer complejo formado en la fotoactivación de la rodopsina junto con la metarrodopsina II y la transducina.

**Figura 8.** Cambios bioquímicos en el interior del bastón en condiciones de luz.

**Figura 9.** Inactivación de la rodopsina y la PDE6 en la fototransducción.

**Figura 10.** Fotoquímica de la visión y regeneración de la rodopsina.

**Figura 11.** Principales especies reactivas de oxígeno y antioxidantes que forman parte del desequilibrio que representa el estrés oxidativo.

**Figura 12.** Estructura del GSH.

**Figura 13.** Ciclo redox del GSH.

**Figura 14.** Etapas que tienen lugar en la peroxidación lipídica.

**Figura 15.** Reacción entre el MDA y el TBA para formar el aducto MDA-TBA<sub>2</sub>.

**Figura 16.** Principales estrategias para el tratamiento de degeneraciones hereditarias de fotorreceptores como la RP.

**Figura 17.** Representación esquemática de la pérdida de los bastones durante la progresión de la RP que conlleva cambios en la citoarquitectura de la retina.

**Figura 18.** Estructura tridimensional de la progesterona.

**Figura 19.** Esquema de la síntesis de progesterona y otros neuroesteroides.

**Figura 20.** Metabolismo de la progesterona.

**Figura 21.** Diseño experimental para el tratamiento con progesterona de los ratones rd10 y C57.

**Figura 22.** Tinción de retinas con hematoxilina-eosina.

**Figura 23.** Desarrollo experimental del modelo de peroxidación lipídica en homogenado de hígado de ratón.

**Figura 24.** Procedimiento experimental para la inducción de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$ ) y la utilización de los tratamientos con sulforafano (10  $\mu\text{M}$ ) y progesterona (1 y 10  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 25.** Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, a los días PN5, PN13 y PN21.

**Figura 26.** Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, a los días PN5, PN13 y PN21.

**Figura 27.** Representación gráfica del número de filas de fotorreceptores en la retina entera de los ratones rd10 en los diferentes grupos según la dosis de progesterona.

**Figura 28.** Representación gráfica del número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 en los diferentes grupos según la dosis de progesterona.

**Figura 29.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en la periferia lejana de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio.

**Figura 30.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en la periferia central de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio.

**Figura 31.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en el centro de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio.

**Figura 32.** Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, tratados y no tratados a día PN21.

**Figura 33.** Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, tratados y no tratados a día PN21.

**Figura 34.** Detección de la proteína BDNF por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21.

**Figura 35.** Detección de la proteína iNOS por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21.

**Figura 36.** Detección de la proteína iNOS por WB a día PN13 y PN18 en los grupos C57 y rd10.

**Figura 37.** Detección de la proteína pCREB por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21.

**Figura 38.** Detección de la proteína pCREB/CREB por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21.

**Figura 39.** Detección de la proteína LC3 por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21.

**Figura 40.** Inmunofluorescencia para nNOS en las diferentes zonas de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21.

**Figura 41.** Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21.

**Figura 42.** Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN23.

**Figura 43.** Inmunofluorescencia para GFAP en la periferia lejana de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23.

**Figura 44.** Inmunofluorescencia para GFAP en la periferia central de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23.

**Figura 45.** Inmunofluorescencia para GFAP en el centro de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23.

**Figura 46.** Concentraciones de glutamato (nmol/mg proteína) en la retina de los ratones de los diferentes grupos a día PN21, obtenidas por HPLC

**Figura 47.** Concentraciones de GSH (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC

**Figura 48.** Concentraciones de GSSG (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC.

**Figura 49.** Ratio de las concentraciones (nmol/mg proteína) de GSH/GSSG en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21

**Figura 50.** Detección de la proteína GCLC por WB en los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) a día PN21.

**Figura 51.** Concentraciones de MDA (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC.

**Figura 52.** Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de progesterona (0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 y 10  $\mu$ M) en homogenado de hígado de ratón sobre la concentración de MDA (nmol/mg proteína) determinado por HPLC.

**Figura 53.** Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con sulforafano a 10  $\mu$ M y la P4 a 1 y 10  $\mu$ M previo a la inducción de un estrés oxidativo con diferentes dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0  $\mu$ M, 500  $\mu$ M y 750  $\mu$ M).

## ÍNDICE DE TABLAS

---

**Tabla 1.** Capas de la retina, abreviatura y componentes celulares de cada una de las capas.

**Tabla 2.** Principales efectos de la administración de progesterona como terapia neuroprotectora.

**Tabla 3.** Lista de anticuerpos utilizados para técnicas de inmunofluorescencia.

**Tabla 4.** Lista de anticuerpos utilizados para la técnica de western blot.

**Tabla 5.** Volumen de progesterona 5 mM y DMSO necesario para la preparación de las concentraciones intermedias de progesterona y las correspondientes concentraciones finales para el ensayo de inducción de la peroxidación lipídica.



# INTRODUCCIÓN

---



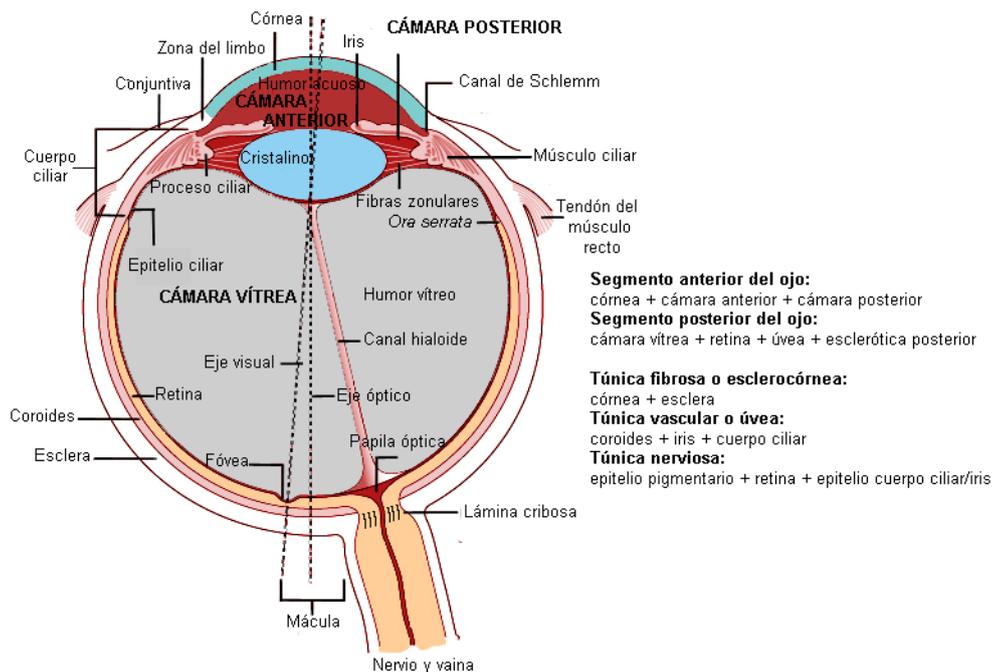
El concepto de visión describe al sentido que permite a los diferentes organismos detectar la luz y reconocer lugares, personas y objetos, es decir, les posibilita ver. La visión, en sí misma, es una capacidad que han desarrollado el ser humano y los animales a partir de su estructura ocular. En el caso de ciertas maquinarias o dispositivos que imitan este logro, se habla de visión artificial.

De los cinco sentidos que posee el ser humano, el sentido de la vista es uno de los más preciados y el ojo su componente principal. No obstante, aunque el ojo es denominado a menudo el órgano de la visión, en realidad, el órgano que efectúa el proceso de la visión es el cerebro; la función del ojo es traducir las radiaciones electromagnéticas del espectro visible, en un determinado tipo de impulsos nerviosos que se transmiten al cerebro a través del nervio óptico. Esto permite ver la geometría detallada, el movimiento, la brillantez, el color y la textura superficial de todos los elementos que aparecen en nuestro entorno. Con una clara connotación antropocéntrica, se dice que sin tejidos fotosensibles y sistemas nerviosos, la luz y el color no existirían en el universo (West, 1986).

## **1. Estructura del ojo**

El globo ocular mide alrededor de 25 mm de diámetro, está sostenido dentro de la cavidad orbitaria por seis músculos extrínsecos que controlan su movimiento y presenta una capa gruesa de tejido adiposo que se encuentra a su alrededor y sirve para amortiguar los movimientos dentro de la órbita. Además, posee diversos compartimentos o espacios, conocidos con el nombre de cámaras intraoculares (Figura 1).

1. Cámara anterior, el espacio que hay entre la córnea y el iris.
2. Cámara posterior, situada entre la superficie posterior del iris y la superficie anterior del cristalino.
3. Cámara vítrea, constituye el espacio existente entre la superficie posterior del cristalino y la retina nerviosa.



**Figura 1.** Dibujo de las diferentes cámaras que constituyen el globo ocular y de las diferentes partes del ojo. En el lateral se detallan las diferentes partes que constituyen los segmentos y las tunicas del ojo. Adaptado de Graham (Graham et al., 1965).

A medida que los rayos luminosos atraviesan los componentes del globo ocular, estos son refractados. La refracción enfoca estos rayos sobre los fotorreceptores de la retina. Son cuatro los componentes del globo ocular conocidos como medios ópticos de difracción (o aparato dióptrico) que modifican el trayecto de los rayos de luz en su viaje hacia la retina (Guyton and Hall, 2011):

1. **Córnea**, es el principal elemento refráctil del ojo.

2. **Humor acuoso**, es el líquido que hay en las cámaras anterior y posterior. Tiene una composición iónica similar a la del plasma pero con menos proteínas. Es producido por el cuerpo ciliar constantemente, al igual que su reabsorción, que tiene lugar en la cámara anterior. El balance entre su formación y su reabsorción regula el volumen y la presión totales del líquido intraocular. El humor acuoso tiene la importante función de proveer de sustancias nutritivas a dos estructuras avasculares: el cristalino y la córnea (Davson, 1954, Goel et al., 2010).

3. **Cristalino**, estructura biconvexa transparente que se encuentra suspendida de la superficie interna del cuerpo ciliar por un anillo de fibras radiales zonulares, llamado zónula de Zinn. A causa de su elasticidad, la forma del cristalino puede sufrir cambios leves en respuesta a la tensión del músculo ciliar (Fisher, 1977).

4. **Cuerpo vítreo**, sustancia gelatinosa y transparente que llena la cámara vítrea. Está compuesto en un 99% por agua, pero contiene gran cantidad de diferentes proteínas. El componente líquido del cuerpo vítreo se denomina humor vítreo. Tanto el agua como las sustancias disueltas pueden difundir con lentitud por él, pero el flujo de líquido es escaso. Además de transmitir la luz, el cuerpo vítreo actúa como un “amortiguador” que protege la retina durante los movimientos oculares rápidos. A su vez el cuerpo vítreo contribuye a mantener la forma del ojo y la posición del cristalino y permite que la retina nerviosa esté en contacto con el epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Locke and Morton, 1965).

En los mamíferos, el globo ocular está recubierto por tres capas (Moore and Agur, 2007, Welsch and Sobotta, 2008):

1. La **túnica fibrosa**, es la capa más externa, también denominada esclerocórnea porque comprende la esclerótica (blanca y opaca) y la córnea (transparente).

La córnea es la “ventana” de la superficie anterior del ojo y se sitúa en continuidad con la esclerótica. La esclerótica está compuesta por tejido conjuntivo denso que provee de puntos de fijación para los músculos extrínsecos del ojo.

2. La **túnica vascular o úvea**, constituye la capa media y comprende la coroides, el iris y el estroma del cuerpo ciliar.

La **coroides**, es la porción de la túnica vascular que cubre la retina. En la coroides se distinguen dos capas; la capa coriocapilar, que es la capa vascular interna cuya función es la de nutrir a las células de la retina y por otra parte encontramos la capa vítrea o membrana vítrea o de Bruch, que está situada entre la capa coriocapilar y el EPR constituyendo una barrera intermedia entre estas dos.

El **iris** forma un diafragma contráctil delante del cristalino y controla la entrada de la cantidad adecuada de luz a través de una apertura central, la pupila. El proceso de adaptación del ojo, hace referencia al aumento o disminución del tamaño de la pupila.

El **cuerpo ciliar**, es la porción anterior engrosada de la túnica vascular y está situado entre el iris y la coroides. El tercio anterior del cuerpo ciliar tiene prolongaciones con forma de crestas de las que emergen fibras zonulares que se extienden hasta el cristalino. Debido a su arquitectura plegada, el área total de los procesos ciliares es de una gran extensión si se tiene en cuenta el pequeño tamaño del cuerpo ciliar.

Los procesos ciliares y el cuerpo ciliar están compuestos por una doble capa de células epiteliales cilíndricas, el epitelio ciliar. El epitelio ciliar cumple tres funciones principales (Ross, 2013):

1. Secreción de humor acuoso.
  2. Participación en la barrera hematoacuosa (una parte de la barrera hematoocular).
  3. Secreción y anclaje de las fibras zonulares que forman el ligando suspensorio del cristalino.
3. La **túnica nerviosa o retina**, es la capa más interna y comprende un epitelio pigmentario externo, una retina nerviosa interna y el epitelio del cuerpo ciliar y del iris.

### 1.1. Circulación sanguínea en la retina

El aporte sanguíneo de nutrientes para las capas internas de la retina deriva de su arteria central, que penetra en el globo ocular a través del centro del nervio óptico y a continuación, se divide para irrigar toda la cara interna de la retina. Existe una caída en la tensión de oxígeno en la parte de la retina externa (Alder and Cringle, 1988) y el mínimo se encuentra en la región de la capa nuclear externa (Linsenmeier, 1986). Las capas externas de la retina, sobre todo los segmentos externos de los conos y de los bastones, dependen para su nutrición de los vasos sanguíneos de la coroides (Foulds, 1990), en especial para recibir el oxígeno, aunque la circulación en la coroides es independiente del metabolismo de la retina.

El alto flujo de sangre en la coroides está en parte relacionado con la baja resistencia de sus capilares cuyo calibre es mucho más grande comparado con el calibre de los capilares retinianos. Los capilares de la coroides presentan fenestraciones que se necesitan para permitir el paso de proteínas del plasma como la albúmina y más concretamente la proteína de unión al retinol (RBP; retinol binding protein) que es la transportadora específica de la Vitamina A. Hasta alcanzar la retina los metabolitos procedentes de los capilares coroides deben pasar a través de la membrana de Bruch, el EPR y del espacio entre los fotorreceptores (Foulds, 1990).

La tasa de extracción de oxígeno en la retina es del 40-50% (Tornquist and Alm, 1979), similar a la del cerebro. Sin embargo, es interesante destacar que a diferencia del cerebro, la retina es capaz de “soportar y aguantar” periodos de isquemia total siendo capaz de recuperar su funcionalidad y morfología después de periodos de isquemia de 18

hasta una hora (Johnson, 1976) y pudiendo además autorregular su propio flujo sanguíneo (Bill and Sperber, 1990).

## 2. Estructura microscópica de la retina

La retina es la más profunda de las tres tunicas concéntricas del globo ocular. Está compuesta por dos capas básicas: la retina nerviosa o retina propiamente dicha, que corresponde a la capa interna que contiene los fotorreceptores y el EPR que es la capa externa contigua a la capa coriocapilar de la coroides, a la que se une con firmeza a través de la membrana de Bruch. Entre las dos capas de la retina hay un espacio y ambas se pueden separar mecánicamente durante el procesamiento histológico (Ross, 2013). La separación de estas capas o desprendimiento de retina, también puede ocurrir en las personas como consecuencia de enfermedades o traumatismos oculares. A su vez, en la retina se distinguen dos regiones:

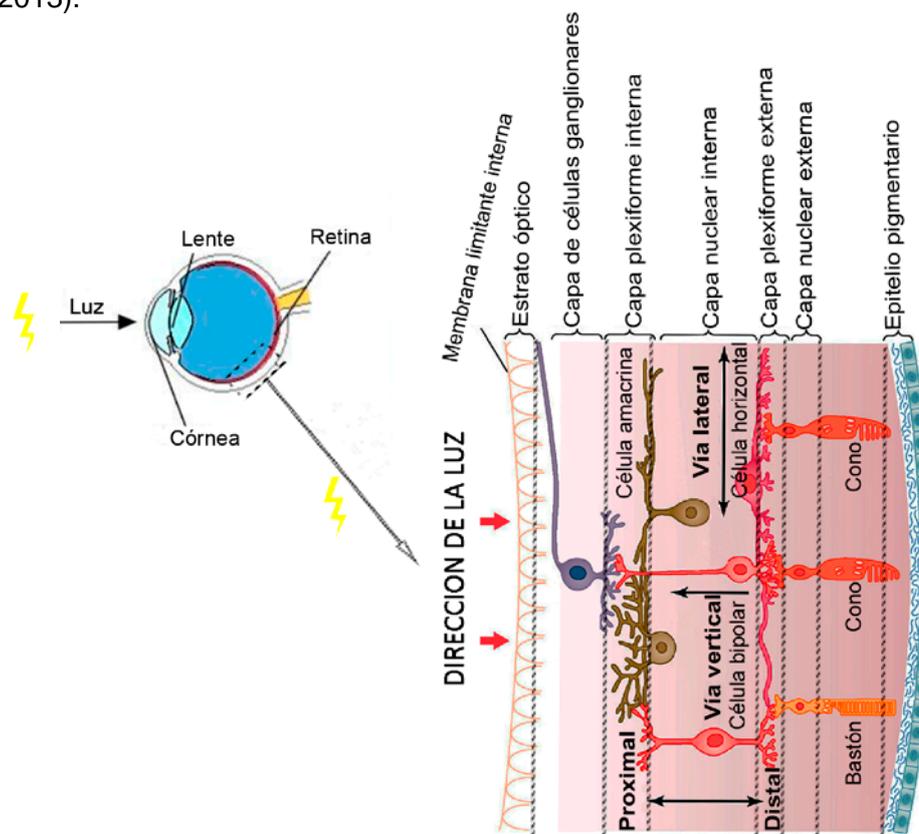
a) La región no fotosensible (porción no visual), ubicada por delante de la *ora serrata* (estructura más periférica de la retina), que reviste la superficie del cuerpo ciliar y la superficie posterior del iris.

b) La región fotosensible (porción óptica), que se encuentra por detrás de la *ora serrata*, que reviste la superficie interna del ojo, excepto donde es perforada por el nervio óptico (disco o papila óptica). Dado que la papila óptica carece de fotorreceptores es un punto ciego en el campo visual.

Una vez que la luz atraviesa el sistema ocular de lentes, llega a la retina cruzando todas sus capas. La agudeza visual disminuye debido a este trayecto de la luz por las diferentes capas de la retina con diversos tipos celulares (Guyton and Hall, 2011) (Figura 2).

En el ojo encontramos una región con aspecto amarillento por su elevado contenido en pigmentos xantofílicos, la mácula lútea, localizada en el polo posterior del eje óptico del globo ocular. En la mácula hay una zona deprimida, la fovea, que en condiciones luminosas es la zona de mayor nitidez visual y está compuesta por conos casi en su totalidad. Asimismo, en esta región los vasos sanguíneos, las células ganglionares, la capa nuclear interna (CNI) y las capas plexiformes quedan desplazadas hacia un lado, en vez de apoyarse directamente sobre la parte superior de los conos. Esto permite que la luz llegue hasta los conos sin ningún impedimento. Los conos y

bastones son más alargados a la altura de la fóvea central que en la periferia de la retina (Ross, 2013).



**Figura 2.** Imagen representativa de la llegada de la luz a las principales capas de la retina. Adaptado de Guyton & Hall (Guyton and Hall, 2011).

## 2.1. Células y capas microscópicas de la retina

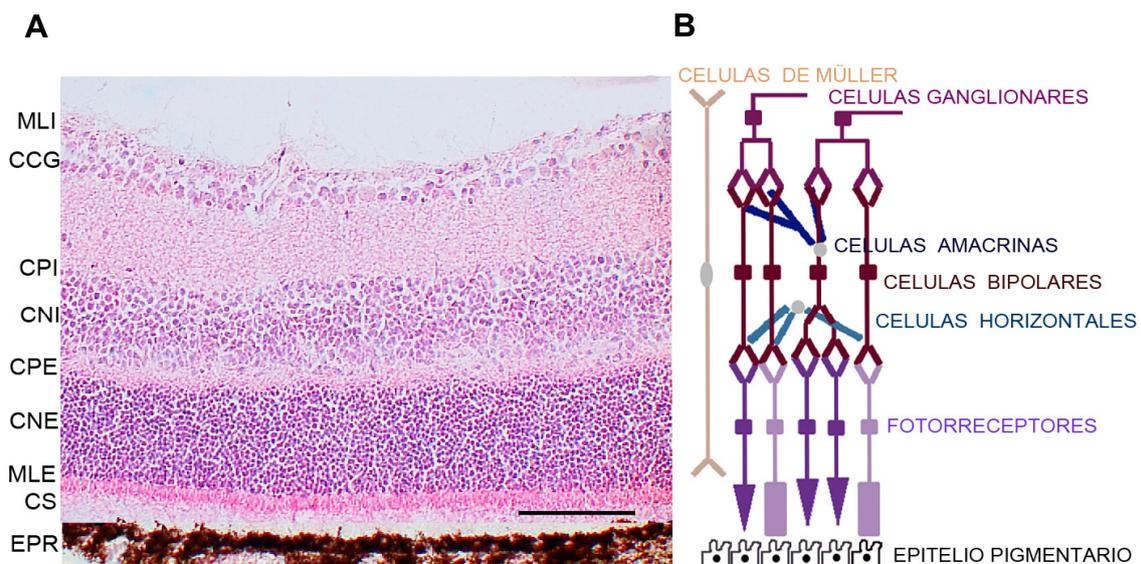
Por razones de conveniencia, las neuronas y las células de sostén de la retina se pueden clasificar en cuatro grupos celulares:

1. Fotorreceptores: los conos y los bastones de la retina.
2. Neuronas de conducción: células bipolares y células ganglionares.
3. Neuronas de asociación y otras neuronas: células horizontales y células amacrinas.
4. Células de sostén: las células de Müller, los microglíocitos y los astrocitos.

La distribución, las asociaciones y prolongaciones específicas de todas estas células, determinan que la retina esté organizada en nueve capas que se identifican con el microscopio óptico (Ross, 2013) (Tabla 1) y (Figura 3). De afuera hacia dentro estas capas son las siguientes:

Nº	NOMBRE DE LA CAPA	ABREVIATURA	COMPONENTES DE LA CAPA
1	Epitelio pigmentario de la retina	EPR	Parte externa de la retina
2	Capa de los fotorreceptores	CS	Incluye los segmentos externo e interno de los fotorreceptores
3	Membrana limitante externa	MLE	Límite superficial (apical) de las células de Müller
4	Capa nuclear externa	CNE	Cuerpos celulares y los núcleos de los fotorreceptores
5	Capa plexiforme externa	CPE	Prolongaciones de fotorreceptores, de las células horizontales, amacrinas y neuronas bipolares con las que establecen sinapsis
6	Capa nuclear interna	CNI	Cuepos celulares y núcleos de las células amacrinas, horizontales, bipolares y de Müller
7	Capa plexiforme interna	CPI	Prolongaciones de células horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares que establecen sinapsis entre sí
8	Capa de células ganglionares	CCG	Contiene los cuerpos celulares y los núcleos de las células ganglionares que son grandes y multipolares
9	Membrana limitante interna	MLI	Constituida por la lámina basal de las células de Müller.

**Tabla 1.** Capas de la retina, abreviatura y componentes celulares de cada una de las capas.



**Figura 3.** Capas de la retina. (A) Tinción de hematoxilina-eosina de la retina de un ratón control C57BL/6J. Escala 50 µm. (B) Esquema representativo de las asociaciones de las células que componen las diferentes capas de la retina.

Se presentan de forma más detallada las principales capas de la retina con sus características más importantes:

### 2.1.1. Epitelio pigmentario de la retina

El EPR diferenciado es una monocapa de células cuboidales productoras de melanina que está localizada entre los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina y la membrana de Bruch, que también contiene melanocitos y por tanto también

está pigmentada. El EPR juega un papel importante durante el desarrollo del ojo, ya que éste es necesario para mantener la estructura laminar de la retina en el ojo embrionario (Raymond and Jackson, 1995). La anomalía en el EPR es la primera causa de degeneración de los fotorreceptores (Mullen and LaVail, 1976), de manera que la pérdida de visión puede ocurrir cuando mueren células del EPR y una disfunción en esta capa aumenta la vulnerabilidad de los fotorreceptores (Strauss, 2005).

Dada su gran importancia para la supervivencia y correcto funcionamiento de las células de la retina, destacan las siguientes funciones del EPR:

1. Aporte de factores tróficos a la retina.

Multitud de factores tróficos contribuyen al desarrollo del ojo y a su diferenciación (Tripathi et al., 1991, Raymond and Jackson, 1995). Los factores tróficos sintetizados por el EPR durante el desarrollo pueden estar implicados en la formación temprana del ojo. Posibles candidatos son el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF; pigment epithelium-derived factor) (Steele et al., 1993) y otros factores bien caracterizados como el factor de crecimiento transformante (TGF; transforming growth factor), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; fibroblast growth factor) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF; platelet-derived growth factor) (Raymond and Jackson, 1995).

2. Es el principal componente de la barrera hematorretiniana (BHR) (Raymond and Jackson, 1995), constituyendo el componente externo de esta barrera (Spitznas, 1974, Nag and Wadhwa, 2012).

La BHR es análoga a la barrera hematoencefálica del cerebro, de manera que ambas emplean células gliales para mantener el buen estado y funcionamiento de las neuronas (Dowling, 1987).

3. Realiza funciones de transporte de moléculas a través de la retina.

El EPR transfiere moléculas procedentes de la retina y hacia la misma. Además, el EPR está implicado en el continuo movimiento de agua y otras moléculas a través de la cavidad vítrea y del espacio subretiniano, de esta manera se evita que dichas moléculas se acumulen en la retina y produzcan su separación (Bird and Marshall, 1986, Steinberg, 1986). Asimismo, el EPR es el encargado de proveer a la retina de retinoides (pues alberga grandes cantidades de vitamina A) y también de proporcionar el adecuado microambiente iónico (Bok, 1999).

4. Absorción de la luz para impedir su reflexión y el brillo resultante (Blanks and Dorey, 2009).

5. Protección frente a la fotooxidación (Cuenca et al., 2014).

6. Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Young and Bok, 1969).

### **2.1.2. Segmentos externos de los fotorreceptores**

La retina humana contiene alrededor de 92 millones de bastones y 4,6 millones de conos (Curcio et al., 1990). El 96% de células fotorreceptoras son bastones frente al 4% de los conos. Con un ratio total de 20:1 de bastones frente a conos, los bastones se concentran en la retina periférica, mientras que los conos predominan en la zona central de la retina, especialmente en la fovea, donde la densidad media es de 199.000 conos/mm<sup>2</sup>, mientras que los bastones están ausentes y aparecen en los primeros 100-200 micrómetros desde el centro de la fovea. No obstante, el número y distribución de los fotorreceptores varía dependiendo de la especie.

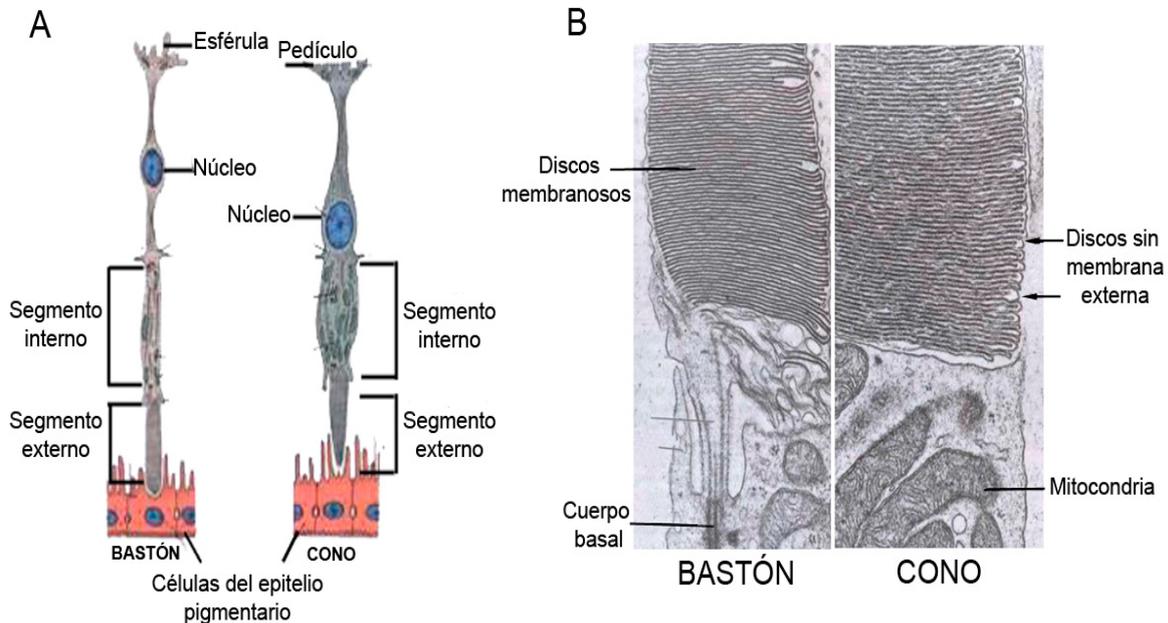
En ratones no encontramos fovea y se estima que hay 6,4 millones de bastones y 180.000 conos cuya densidad media es de 12.400 conos/mm<sup>2</sup> (Jeon et al., 1998), en términos de porcentaje 97,2% de bastones y 2,8% de conos (Carter-Dawson and LaVail, 1979) forman la retina murina. Además, la densidad absoluta de las células puede variar con la edad del animal, porque el ojo del ratón crece a lo largo de toda la edad adulta temprana.

#### **2.1.2.1. Fotorreceptores: bastones y conos**

Los bastones son células muy sensibles que se encargan de la visión cuando las condiciones son de baja luminosidad (visión escotópica). Su pigmento, la rodopsina, es sensible a longitudes de onda cercanas a 500 nm (luz verde-azul).

Los conos son los encargados de la visión en condiciones de luminosidad (visión fotópica), son capaces de percibir los colores así como los detalles espaciales, aunque son menos sensibles, tienen una respuesta cinética más rápida y se adaptan a un rango más amplio de intensidades de luz (Pugh and Cobbs, 1986, Fu and Yau, 2007). En humanos y en muchos primates hay tres clases de conos, L (*large wavelength*), sensibles a la luz de longitud de onda larga (luz roja), M (*medium wavelength*) sensibles a la luz de longitud de onda media (luz verde) y S (*short wavelength*) sensibles a longitudes de onda cortas (luz azul).

Cada fotorreceptor (bastón o cono) está compuesto por cuatro partes principales (Lamb, 2013) (Figura 4 A).



**Figura 4.** Fotorreceptores. (A) Diagrama esquemático de la estructura de un bastón (izquierda) y de un cono (derecha). Los segmentos externos de los bastones y conos están estrechamente asociados con el epitelio pigmentario contiguo. (B) Microfotografías electrónicas de parte de los segmentos interno y externo de un bastón (izquierda) y un cono (derecha). El segmento externo contiene los discos aplanados horizontales que en el cono están en comunicación con el espacio extracelular. Se observan la gran cantidad de mitocondrias que contiene el segmento interno y el cuerpo basal del pedículo de conexión que une el segmento externo e interno. Adaptado de Ross (Ross, 2013)

1. Segmento externo: cilíndrico o cónico (bastón o cono respectivamente), se relaciona estrechamente con las microvellosidades de las células del epitelio pigmentario contiguo. En los discos del segmento externo tiene lugar el fenómeno de fototransducción, tanto en los conos como en los bastones los discos membranosos se forman por las invaginaciones transversales repetidas de la membrana plasmática. En los bastones, los discos están limitados por la membrana plasmática perdiendo su continuidad con ella, mientras que los conos sí que retienen su continuidad con la membrana plasmática (Figura 4 B). El aporte de los lípidos necesarios para la continua síntesis de la membrana plasmática tiene lugar a través del EPR, pero también a través de la membrana de Bruch (Foulds, 1990).

2. Segmento interno: contiene la maquinaria metabólica que sustenta la actividad de los fotorreceptores, por ello este segmento presenta una dotación de orgánulos

típicos de células activas en la síntesis de proteínas, además de las mitocondrias que cumplen la misión de proporcionar energía para el funcionamiento de los fotorreceptores (Hoang et al., 2002).

3. El cuerpo celular que contiene el núcleo.

4. Las terminales sinápticas o terminales axónicas: esférula (redondeada) en los bastones y pedículo (triangular) en los conos. Estos contienen una gran cantidad de vesículas sinápticas, de forma que los neurotransmisores almacenados en ellas son liberados continuamente a la hendidura sináptica en la oscuridad. Cuando el segmento externo absorbe la luz se produce la fototransducción y se deja de liberar estos neurotransmisores (Rawn, 1989).

#### ***2.1.2.2 Mecanismo de renovación de los discos del segmento externo de los fotorreceptores***

El reemplazo de la membrana para la renovación de los discos consta de dos procesos: la formación de nuevas membranas y la eliminación de las viejas. Los constituyentes de las nuevas membranas se producen en el segmento interno de los fotorreceptores y luego son transportados al segmento externo para los pasos finales del ensamblaje a la membrana (Young, 1974, 1978). En los bastones, los discos son rápidamente fagocitados por el EPR (Young and Bok, 1969, Bok, 1985) de forma temprana durante el periodo de luz (LaVail, 1976), mientras que en los conos, los discos se producen de manera similar pero no son reemplazados con regularidad sino que los conos eliminan “paquetes” de membranas durante el periodo de oscuridad (Young, 1977, O'Day and Young, 1978, Young, 1978).

#### **2.1.3. Membrana limitante externa**

Está formada por una hilera de zonulas adherentes entre las células de Müller y los fotorreceptores contiguos, ya que los segmentos internos y externos de los fotorreceptores se encuentran apoyados sobre las prolongaciones de sostén de las células de Müller. El extremo apical de las células de Müller forma la capa o membrana limitante externa. Se cree que esta capa es una barrera metabólica que restringe el paso de moléculas grandes hacia las capas internas de la retina (Ross, 2013).

#### **2.1.4. Capa nuclear interna**

Está compuesta por los núcleos de las células horizontales (3,1%), amacrinas (39%), bipolares (41%) y de Müller (16%) (Jeon et al., 1998). De forma más concreta, se detallan a continuación algunas de las células citadas:

a) Células o neuronas horizontales: establecen sinapsis con las terminales sinápticas de los fotorreceptores y con las células bipolares en la capa plexiforme externa (CPE). Morfológicamente, se clasifican en células horizontales de tipo A o sin axón y de tipo B o con axón corto. Las células horizontales son neuronas gabaérgicas de interconexión lateral que contribuyen a integrar y regular los impulsos de entrada enviados por varias células fotorreceptoras (Perlman et al., 2012).

b) Células o neuronas amacrinas: estas células se ramifican ampliamente para establecer sinapsis con axones de células bipolares y dendritas de células ganglionares en la capa plexiforme interna (CPI). Las células amacrinas han demostrado tener respuestas de regeneración del potencial eléctrico, en sí mismas no reciben conexiones aferentes de los fotorreceptores pero si de las células bipolares y de otras amacrinas (Kuffler, 1973).

c) Células o neuronas bipolares: las células bipolares se extienden hasta la CPE y la CPI, responden a la luz con una considerable despolarización o hiperpolarización y al igual que las células horizontales no generan impulsos (Kuffler, 1973). Contactan a través de sus dendritas con los fotorreceptores a nivel de la CPE, y en la CPI a través de su axón con las células amacrinas y ganglionares. En la retina humana existen dos tipos de células bipolares: las que establecen sinapsis con bastones y las que establecen sinapsis con conos. A nivel de la CPE, las células bipolares pueden responder al glutamato liberado por los fotorreceptores hiperpolarizándose (células bipolares tipo ON) o despolarizándose (células bipolares tipo OFF). Las células bipolares de conos (tipo ON y OFF) establecen sinapsis glutamatérgicas con las células ganglionares y amacrinas, sin embargo, las células bipolares de bastones (únicamente de tipo ON) solo establecen sinapsis con las células amacrinas que actúan como intermediarias (Kuffler, 1953, Nelson and Connaughton, 1995).

#### **2.1.5. Capa de células ganglionares**

Está compuesta por los somas de las neuronas ganglionares que son grandes y multipolares.

### **2.1.5.1. Células ganglionares**

Estas células reciben información directa de las células bipolares y de las células amacrinas y transmiten potenciales de acción a lo largo de sus axones a los centros superiores de procesamiento visual del cerebro. Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico (Forrester et al., 2005).

En las regiones periféricas de la retina una sola célula ganglionar puede establecer sinapsis con un centenar de células bipolares. Por el contrario, en la mácula lútea que rodea la fovea central, las células bipolares son más pequeñas (células bipolares enanas) y hay una sola sinapsis entre cada una de ellas y una célula ganglionar (células ganglionares enanas), este tipo de transmisión de la señal produce una imagen punto a punto, desde la fovea al cerebro (Kolb, 2001).

Las células ganglionares miden las diferencias dentro de los campos receptores por comparación del grado de iluminación entre el centro y la periferia de la célula, centros ON-OFF, están diseñadas para detectar el contraste simultáneo de luz en estas zonas (Kuffler, 1973). En los campos receptores de centro ON, la luz produce la respuesta más fuerte si incide completamente en el centro, mientras que para su inhibición la luz tiene que incidir completamente en la parte que rodea el centro. Las células ganglionares de centro OFF tienen una organización contraria, apareciendo la inhibición cuando la luz incide en el centro. Las descargas de las células ganglionares reflejan aparentemente el balance entre los *inputs* de las bipolares y las amacrinas, aunque no está claro el papel de las células amacrinas en el centro ON-OFF (Kuffler, 1973). Sin embargo, se ha sugerido que en algunos vertebrados las células amacrinas contribuyen a aumentar la complejidad de las propiedades del campo receptivo (Barlow and Levick, 1965, Dowling, 1970).

Provencio y colaboradores identificaron una nueva opsina, denominada melanopsina presente en algunas células ganglionares (Provencio et al., 1998, Provencio et al., 2000) aunque es menos fotosensible que los pigmentos presentes en los fotorreceptores, esta opsina dota a las células ganglionares de la capacidad de responder a estímulos lumínicos del exterior. En el año 2002 Berson y colaboradores denominaron a estas células; células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs; intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) (Berson et al., 2002). Estas células son sensitivas a la luz por ellas mismas, mantienen las funciones típicas de las células ganglionares y parecen estar implicadas en la regulación del reflejo pupilar y del ciclo circadiano (Berson, 2003, 2007a).

### **2.1.6. Membrana limitante interna**

Esta capa separa la retina del espacio intravítreo y está compuesta por la lámina basal de las células de Müller. Estas células constituyen el componente glial mayoritario en la retina, representando el 90% del total de la glía de la retina.

#### **2.1.6.1. Células gliales**

La retina de los vertebrados contiene cuatro tipos de glía, cada uno de los cuales exhibe diferente morfología y distintas características antigénicas y del desarrollo. Las células de Müller son el elemento glial predominante, seguido por los astrocitos y la microglía. El cuarto tipo de célula glial, los oligodendrocitos, se ha visto ocasionalmente en la retina asociado con axones de células ganglionares mielinizadas, estas células se han podido observar en algunas especies como el conejo (Ehinger et al., 1994).

Las células de Müller fueron descritas como una fibra radial en la retina, por parte de Heinrich Müller en 1851 (Müller, 1856). Es sabido que las células de glía tienen sistemas de señalización que se pueden extender en forma de oleadas de  $Ca^{2+}$  y que se correlacionan con la liberación de glutamato (Vecino et al., 2015).

Entre otras funciones, las células de Müller están implicadas en la organización estructural de la BHR (Reichenbach and Bringmann, 2010). Los procesos de las células de Müller actúan como un sistema de comunicación para el intercambio metabólico entre la vasculatura y las neuronas. Es por ello, que algunos autores han planteado la posibilidad de que las células de Müller per se puedan ser un componente esencial de la BHR y como tal sean capaces de influir en su propia permeabilidad (Sarthy and Ripps, 2001). 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 and Ripps, 2001, Reichenbach and Bringmann, 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 GFAP (GFAP; glial fibrillary acidic protein).

Tanto las células de Müller como los astrocitos comparten propiedades como la habilidad para expandir y extender sus axones y de formar límites gliales entre la retina y los vasos sanguíneos (Hollander et al., 1991) siendo capaces de actuar e intercambiarse en algunos procesos (Vecino et al., 2015).

### 3. Fotoquímica de la visión

#### 3.1. La transducción visual

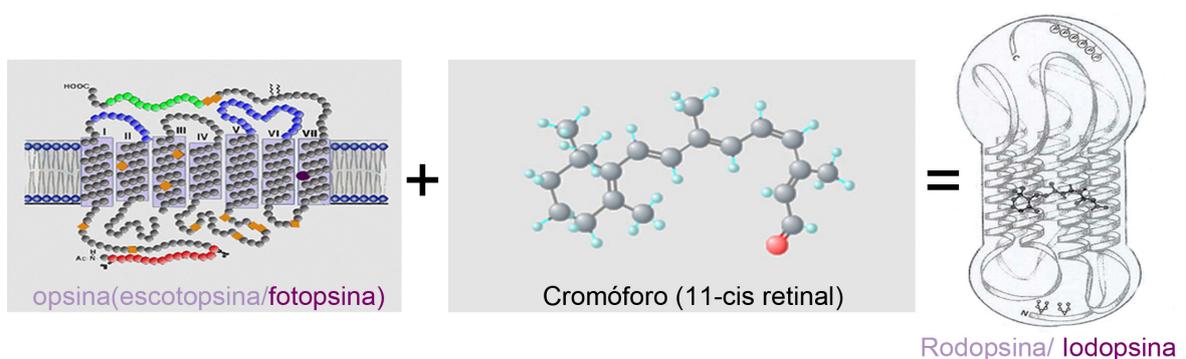
La luz está compuesta por fotones que son pequeñas partículas que representan unidades o cuantos de energía. La transducción visual o fototransducción es el proceso mediante el cual un fotón de luz genera una respuesta nerviosa en los fotorreceptores (Chabre and Deterre, 1989, Arshavsky et al., 2002).

Este proceso conlleva el cierre de los canales catiónicos de la membrana del fotorreceptor y finalmente su hiperpolarización. El sistema visual es único, debido a que en la membrana plasmática tiene lugar una hiperpolarización, en vez de una despolarización, dicha hiperpolarización implica que el potencial de membrana se vuelva más negativo (-70 a -80 mV) (Baylor, 1987). Posteriormente, la señal eléctrica se transmite hacia las células bipolares y ganglionares de la retina, para transferir estas señales al cuerpo geniculado lateral y de allí, a la corteza visual de los lóbulos occipitales del cerebro.

Sin embargo, para que esto suceda, primero la luz tendrá que pasar a través de las células ganglionares y atravesar todas las capas de la retina hasta alcanzar los segmentos externos de los fotorreceptores.

##### 3.1.1. Los pigmentos visuales

En la porción apical de los segmentos externos de los fotorreceptores se encuentran los pigmentos visuales (Figura 5). La rodopsina de los bastones y la iodopsina de los conos son moléculas de pigmento que generan una compleja cascada de reacciones enzimáticas y bioquímicas como respuesta a la luz (Chabre and Deterre, 1989).



**Figura 5.** Esquema de la composición de los pigmentos visuales en conos y en bastones. Adaptado de Dratz, Hargrave & Ncbi web (*pccompound*) (Dratz and Hargrave, 1983, Hargrave et al., 1984) y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>.

Los pigmentos visuales están formados por una proteína transmembrana llamada opsina (escotopsina en bastones y fopsina en conos) que está unida covalentemente a un cromóforo llamado retinal (11-cis retinal o retineno), derivado de la vitamina A.

El retinal es la parte sensible a la luz y está unido a una de las hélices de la opsina en el centro de la molécula y colocado perpendicularmente (Figura 5). Presenta dos conformaciones: una forma cis y una forma trans. En la oscuridad, el retinal se encuentra en la forma cis, pero cuando un fotón de luz es absorbido, rápidamente cambia a la forma trans o “todo-trans”, variando no solo la conformación del retinal sino también de la opsina. Así es como la forma cis del retinal se convertirá en una forma “todo-trans” con una estructura física diferente, mostrando una conformación recta en lugar de plegada. Este proceso se llama isomerización del retinal.

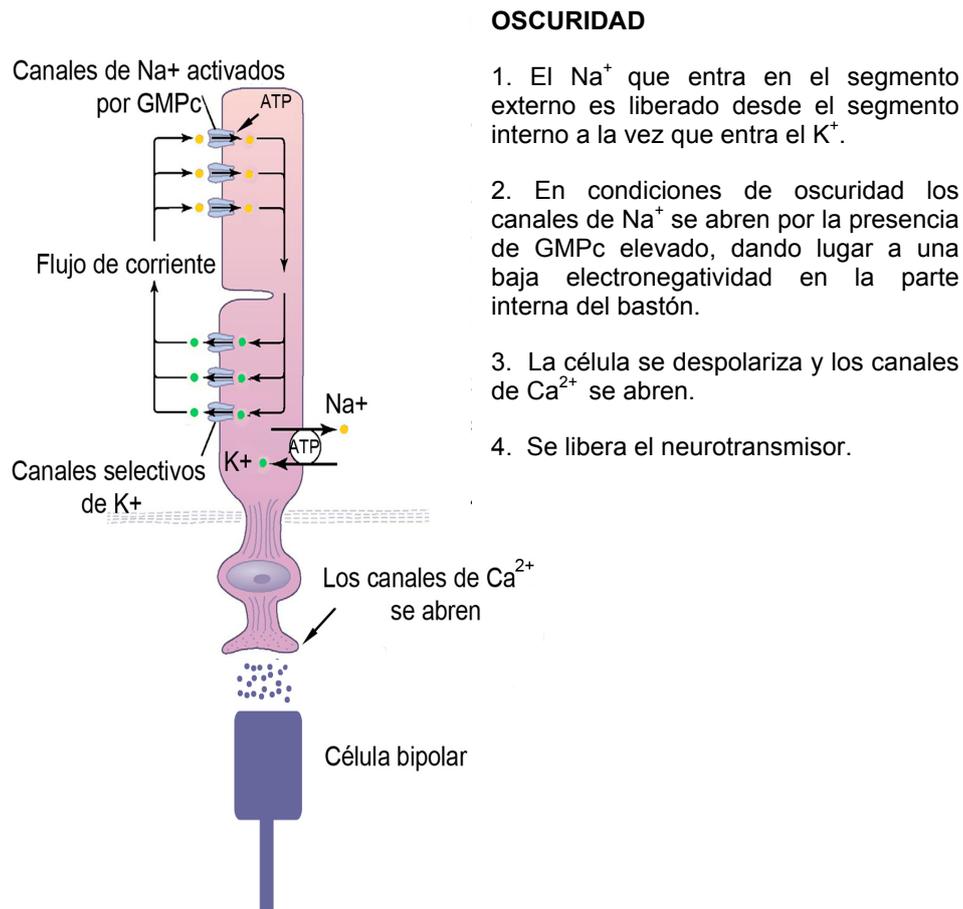
### **3.1.2. La cascada de fototransducción**

La mayor parte del conocimiento de la fototransducción procede de la información relativa a los bastones. Esto es porque se puede obtener mucho más material bioquímico de los bastones que de los conos puesto que los bastones son mucho más numerosos en la retina.

El guanosín monofosfato cíclico (GMPc; guanosine monophosphate cyclic) es una molécula central en la transducción visual que actúa como segundo mensajero. Todos los aspectos de señalización de esta cascada catalítica están dominados por el balance entre la síntesis y degradación de esta sustancia en el citoplasma del segmento externo del fotorreceptor. La cantidad de GMPc libre está constantemente monitorizada por unos canales catiónicos localizados en la membrana plasmática del segmento externo (Burns and Arshavsky, 2005), estos se encontrarán abiertos o cerrados en función de la cantidad de luz.

#### **3.1.2.1. Oscuridad**

En condiciones de oscuridad, el GMPc se une a la superficie interna de los canales de  $\text{Na}^+$  situados en la membrana de los discos del bastón y los abre. Se origina de esta forma la denominada “corriente oscura” que da como resultado la despolarización del fotorreceptor. Es decir, hace más positivo el potencial de membrana del fotorreceptor (-40 mV) y se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con la consiguiente entrada de estos iones en el interior celular (Baylor, 1987). La despolarización del fotorreceptor permite la liberación continua del neurotransmisor glutamato (Figura 6).



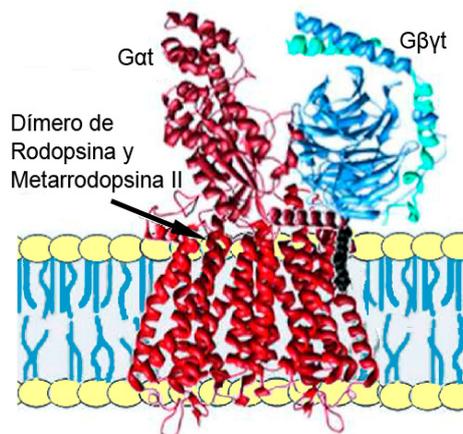
**Figura 6.** Cambios bioquímicos en el interior del bastón en condiciones de oscuridad. Despolarización del fotorreceptor. Adaptado de Guyton & Hall (Guyton and Hall, 2011).

### 3.1.2.2. Luz: activación y amplificación de la cascada

La absorción de luz causa un potencial negativo en el interior de la célula fotorreceptora, una hiperpolarización (Bortoff, 1964, Tomita, 1965, Werblin and Dowling, 1969). El evento molecular inicial consiste en la absorción de un fotón por la rodopsina, el cual causa la isomerización del retinal, produciéndose un cambio conformacional de la rodopsina a su estado activo, metarrodopsina II o rodopsina activada (Baylor, 1987, Chabre and Deterre, 1989, Rawn, 1989, Hargrave, 2001, Arshavsky et al., 2002, Goldstein, 2005, Alberts et al., 2008, Kono et al., 2008).

La rodopsina, excitada por la luz, cataliza el intercambio de los nucleótidos guanosín difosfato (GDP; guanosin diphosphate) por guanosín trifosfato (GTP, guanosin triphosphate) de una proteína G denominada transducina (Arshavsky et al., 2002, Alberts et al., 2008, Wensel, 2008, Nakao et al., 2012). Las proteínas G son un grupo de proteínas encargadas de enviar señales desde los receptores de membrana activados (en este caso la rodopsina) a las enzimas y a los canales en numerosos procesos

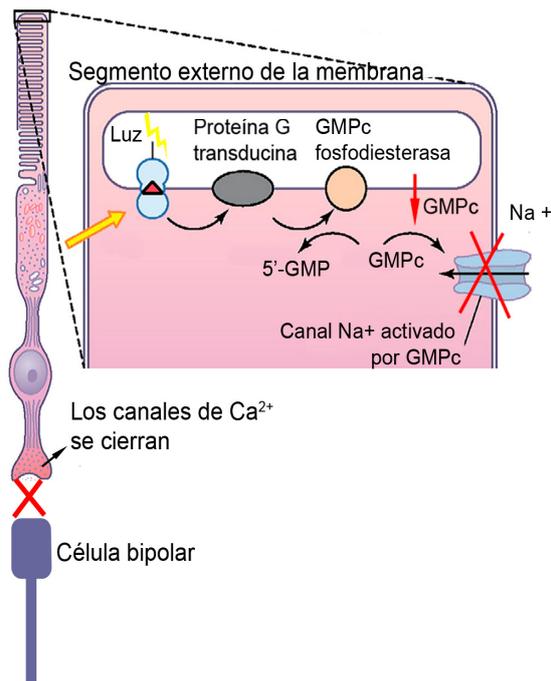
sensoriales y hormonales de los organismos eucariotas. La transducina consta de 3 subunidades (alfa, beta y gamma), siendo la subunidad alfa ( $G\alpha$ -GTP) la encargada de activar a otra enzima, la fosfodiesterasa 6 (PDE6; phosphodiesterase 6) (Figura 7). Como consecuencia de la activación de la PDE6 se estimula la degradación de una molécula de GMPc (Stryer and Bourne, 1986).



**Figura 7.** Modelo propuesto para el primer complejo formado en la fotoactivación de la rodopsina junto con la metarrodopsina II y la transducina. Adaptado de Wensel (Wensel, 2008).

Por tanto, en presencia de luz, los niveles de GMPc disminuyen como consecuencia de la activación de la PDE6, ocasionando el cierre de 250 canales de  $Na^+$  por un cuanto de luz absorbida. Todo ello dura alrededor de un segundo. De esta forma, se acumulan iones  $Na^+$  en el exterior de la membrana plasmática y el potencial del receptor se hiperpolariza (Stryer, 1991, Farber, 1995). Este cambio en el potencial de membrana conduce al cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje lo que a su vez conlleva una disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  en la sinapsis (Hodgkin et al., 1987, Nakatani and Yau, 1988). El resultado final es una disminución de la secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los fotorreceptores (Figura 8).

Existen evidencias de que cualquier alteración de las vías de fototransducción puede dirigir a la muerte celular de los fotorreceptores en humanos (Robinson et al., 1992, Rosenfeld et al., 1992). En células con una subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa 6 (PDE6 $\beta$ ; phosphodiesterase 6 subunit beta) que es defectiva hay un aumento de los niveles de GMPc que dirigen a la muerte celular en los fotorreceptores (Farber and Lolley, 1974, Lolley et al., 1977, Marigo, 2007, Sancho-Pelluz et al., 2008).



## LUZ

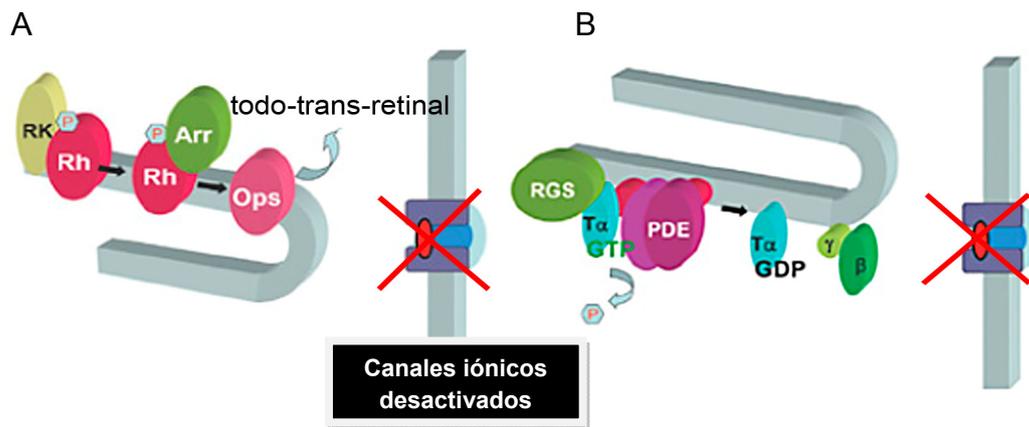
1. La luz es absorbida por el pigmento y activa la porción 11-cis-retinal de la rodopsina. Generando la metarrodopsina II o rodopsina activada. La transducina se activa.
2. La transducina estimula a las moléculas de fosfodiesterasa que hidrolizan el GMPc y lo destruyen.
3. Disminuyen los niveles de GMPc en el citosol.
4. Los canales de Na<sup>+</sup> se cierran.
5. Disminuye el Na<sup>+</sup> hacia el interior de la célula, tiene lugar la hiperpolarización.
6. Los canales de Ca<sup>2+</sup> se cierran.
7. La liberación del neurotransmisor disminuye.
8. La rodopsina quinasa desactiva el pigmento y los canales de Na<sup>+</sup> volverán a abrirse.

**Figura 8.** Cambios bioquímicos en el interior del bastón en condiciones de luz. Hiperpolarización del fotorreceptor. Adaptado de Guyton & Hall (Guyton and Hall, 2011).

### 3.1.3. Cascada de inactivación

Cada reacción de la cascada catalítica activada por la luz debe estar compensada por una reacción de inactivación correspondiente, con el fin de devolver el fotorreceptor a su estado de reposo después de que haya sido excitado por la luz. Este tiempo de recuperación es esencial para que el fotorreceptor pueda generar respuestas ante nuevos estímulos luminosos y cambios en los niveles de iluminación (Burns and Arshavsky, 2005, Alberts et al., 2008).

La inactivación de la rodopsina se lleva a cabo mediante su fosforilación por la rodopsina quinasa (RK; rhodopsine kinase) seguida de la posterior unión de la proteína arrestina (Arr) (Wilden et al., 1986, Kennedy et al., 2001). La inactivación de la PDE6 se consigue mediante la hidrólisis del GTP unido a la subunidad G $\alpha$ -GTP de la transducina junto con la unión de un complejo de multiproteínas denominado RGS9-1.G $\beta$ 5.R9AP (He et al., 1998, Makino et al., 1999, Hu and Wensel, 2002) (Figura 9).



**Figura 9.** Inactivación de la rodopsina y la PDE6 en la fototransducción. (A) Desactivación de la rodopsina (Rh). Primero la rodopsina se fosforila por la rodopsina quinasa (RK), así aumenta su afinidad por la arrestina (Arr) que al unirse desactiva la rodopsina, permitiendo que la opsina (Ops) libere su cromóforo, el todo-trans-retinal. (B) Desactivación del efector PDE6. La multiproteína RGS aumenta la actividad GTPasa de la  $G\alpha$ -GTP. La hidrólisis del GTP a GDP causa la disociación de la proteína G de la PDE6 y su inactivación. Adaptado de Dell'Orco (Dell'Orco and Koch, 2010).

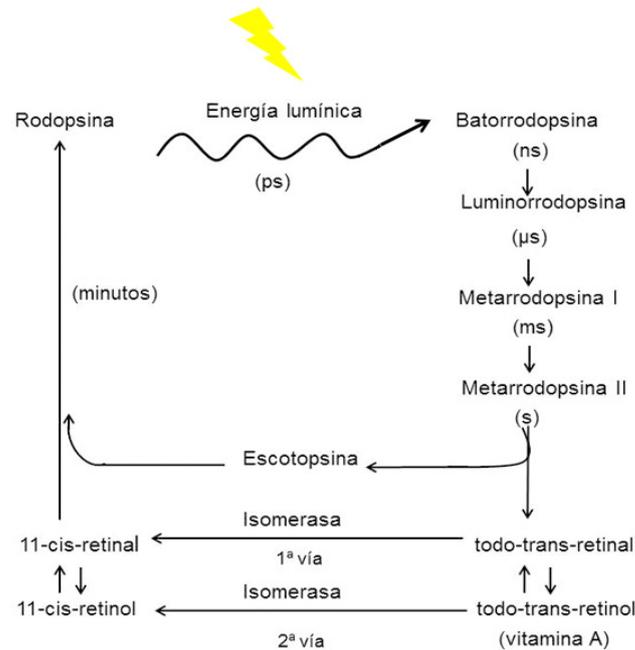
Por otro lado, la restauración de los niveles de GMPc citoplásmico a su nivel de oscuridad se lleva a cabo por medio de una enzima denominada guanilato ciclasa que se encarga de producir GMPc a partir de GTP (Pugh et al., 1997). La actividad de dicha enzima está estimulada por las proteínas GCAP (proteínas activadoras de la guanilato ciclasa) que detectan el descenso de  $Ca^{2+}$  intracelular secundario al cierre de los canales con la luz (Palczewski et al., 2004).

### 3.2. El ciclo visual

La habilidad de los fotorreceptores para trabajar durante muchas horas de iluminación requiere que los pigmentos visuales inactivos sean continuamente regenerados. La inactivación de la rodopsina mediante su fosforilación y la posterior unión de la arrestina provoca su descomposición, generándose en último término la opsina y el todo-trans-retinal (Burns and Arshavsky, 2005).

El todo-trans-retinal es transportado al EPR a través de la proteína transportadora de unión al adenosín trifosfato (ATP, adenosin triphosphate) codificada por un gen denominado ABCR. Posteriormente, el todo-trans-retinal se convierte en 11-cis-retinal que vuelve a los bastones para unirse a la opsina libre y regenerar el pigmento visual (Bessant et al., 2004).

Este proceso se denomina ciclo visual y requiere una secuencia de reacciones bioquímicas complejas en las que participan diferentes enzimas y proteínas que unen retinoides tanto en los discos de los fotorreceptores como en el EPR (Figura 10).

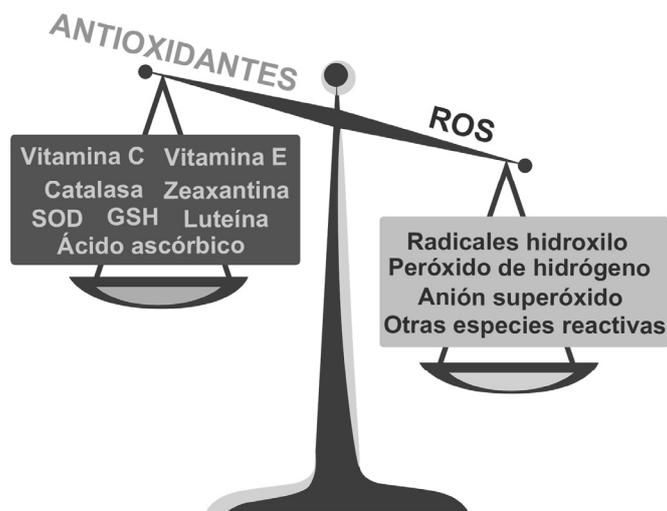


**Figura 10.** Fotoquímica de la visión y regeneración de la rodopsina. Esquema representativo de las reacciones enzimáticas que sufre la rodopsina desde que es activada por la luz hasta su regeneración. Adaptado de Guyton & Hall (Guyton and Hall, 2011).

#### 4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se ha definido como un “cambio en el equilibrio pro-oxidante-antioxidante en favor de los oxidantes, dirigiendo potencialmente a un daño en la célula” (Sies, 1991) (Figura 11).

Bajo condiciones fisiológicas normales, el tejido ocular posee varias enzimas antioxidantes intrínsecas para superar el estrés oxidativo que se forma como consecuencia de un metabolismo normal en la célula. Sin embargo, durante el daño ocular, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS; reactive oxygen species) y radicales libres sobrepasan los mecanismos intrínsecos antioxidantes resultando en un estrés oxidativo (Njie-Mbye et al., 2013). Dicho estrés modifica moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.



**Figura 11.** Principales especies reactivas de oxígeno y antioxidantes que forman parte del desequilibrio que representa el estrés oxidativo.

Existen evidencias de que los radicales libres como peróxidos y los metabolitos de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (PUFAs; poliunsaturated fatty acids) están implicados en las reacciones oxidativas en el ojo y juegan papeles principales en la patogénesis de la mayoría de enfermedades oculares (Greene and Paller, 1992, van Reyk et al., 2003, Shichi, 2004, SanGiovanni and Chew, 2005) entre ellas la retinosis pigmentaria (RP) (Carmody et al., 1999, Hackam et al., 2004).

#### 4.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado en su orbital más externo, de manera que el electrón desapareado es altamente reactivo para aparearse a otro electrón que esté libre.

Los radicales libres más comunes son:

**Especies reactivas de oxígeno (ROS):** anión superóxido ( $O_2^-$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ).

**Especies reactivas de nitrógeno (RNS; reactive nitrogen species):** óxido nítrico ( $NO$ ; nitric oxide) y dióxido nítrico ( $NO_2^-$ ; nitric dioxide).

**Especies reactivas del cloro (RCS; reactive chlorine species):** cloro atómico ( $Cl\cdot$ ).

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. Además, se sabe que otras moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), aunque no son radicales libres, pueden dar lugar a ellos a través de diversas reacciones químicas (Packer et al., 2000, Gilgun-Sherki et al., 2001).

Algunos de los procesos endógenos de las células que dan lugar a la formación de los radicales libres son: la cadena de transporte electrónico en la mitocondria (Kas and Blattna, 1986), la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman and Brent, 1990) o una reducida capacidad de los mecanismos antioxidantes protectores (Giugliano et al., 1996).

Sin embargo, también existen fuentes exógenas de radicales libres, como por ejemplo las radiaciones electromagnéticas o ionizantes (Fridovich, 1983) o la acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).

## 4.2. Antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que retrasa o previene significativamente la oxidación de un sustrato (Halliwell and Gutteridge, 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.

En el cuerpo humano las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la conversión de  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y las enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión (GSH) y la catalasa, que convierten el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno, participando todas ellas en una red preventiva de sistemas antioxidantes.

## 4.3. El sistema glutatión

### 4.3.1. Síntesis de GSH

El GSH es sintetizado en el citosol de todas las células (Meister and Anderson, 1983). La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes implica dos pasos enzimáticos que requieren de ATP:



El primer paso de la biosíntesis de GSH es considerado un paso limitante y está catalizado por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa o la glutamato cisteína ligasa (GCL), la cual muestra un requerimiento absoluto para el  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ .

La GCL está compuesta por dos subunidades; una pesada o catalítica (GCLC) y una subunidad ligera o modificadora (GCLM), ambas son codificadas por diferentes genes en especies tan dispares como los humanos y la mosca de la fruta (Yan and Meister, 1990, Gipp et al., 1992, Huang et al., 1993a, Gipp et al., 1995, Dalton et al., 2004).

La GCLC es la subunidad que demuestra poseer la actividad catalítica y puede existir una inhibición de retroalimentación por el GSH (Seelig et al., 1984). La subunidad GCLM es enzimáticamente inactiva pero tiene una importante función reguladora (Huang et al., 1993a, Huang 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 del GSH (Yang et al., 2002).

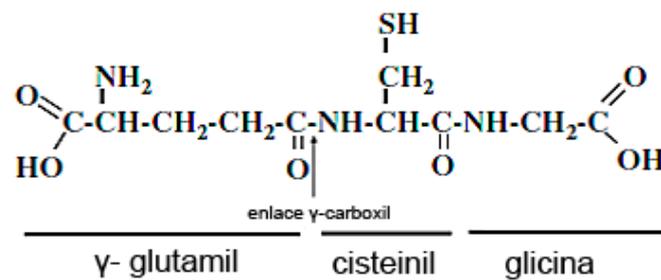
La GCL es específica para la fracción glutamil y está regulada fisiológicamente por: 1) un ciclo de retroalimentación competitivo no alostérico de inhibición por GSH, lo cual implica unir GSH al glutamato y a otro sitio de la enzima (Richman and Meister, 1975, Huang et al., 1988); 2) por la disponibilidad de su precursor, la L-cisteína (Meister and Anderson, 1983).

El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintetasa (GS). Esta enzima no se ha estudiado de forma tan amplia como la GCL. La GS purificada del hígado de rata está compuesta por dos subunidades aparentemente idénticas (Oppenheimer et al., 1979).

Debido al hecho que la  $\gamma$ -glutamil-L-cisteína (producto de la GCL) está presente a concentraciones excesivamente bajas cuando la GS está presente, la GCL se ha considerado como la enzima limitante para la síntesis del GSH (Dalton et al., 2004).

### **4.3.2. Funciones del GSH**

El GSH es un tripéptido, el C-L-glutamil-L-cisteinil-glicina (Figura 12), que se encuentra en todos los tejidos de los mamíferos y cuya concentración es especialmente elevada en el hígado. El GSH existe en la forma de tiol reducido (GSH), que es la que predomina en la célula, y de disulfuro oxidado (GSSG) (Kaplowitz et al., 1985).



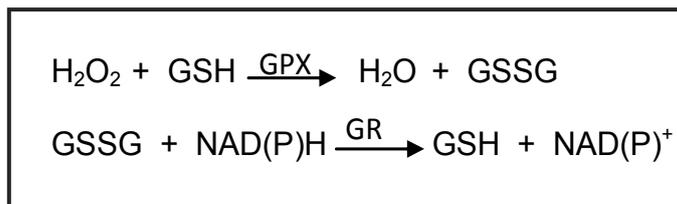
**Figura 12.** Estructura del GSH o C-glutamilcisteinil glicina, donde el glutamato N-terminal y la cisteína están unidos por el grupo carboxilo del glutamato. Adaptado de Lu (Lu, 2009).

Las funciones principales del GSH son: a) detoxificar electrófilos; b) neutralizar radicales libres; c) mantener el estado tiol esencial de las proteínas; d) servir de reservorio de cisteína; e) modular procesos celulares críticos tales como la síntesis de ADN, procesos relacionados con los microtúbulos y función inmune (Meister and Anderson, 1983, Kaplowitz et al., 1985, DeLeve and Kaplowitz, 1990, Suthanthiran et al., 1990, Ganea and Harding, 2006).

Además, se ha demostrado que el GSH regula la homeostasis del óxido nítrico (Hogg, 2002), modula la actividad de las proteínas por modificaciones post-traduccionales (S-glutationilación de las proteínas) (Pompella et al., 2003) y modula la actividad de los receptores de los neurotransmisores (Oja et al., 2000). A continuación, se detallarán un poco dos de las principales funciones del GSH relacionadas con el estrés oxidativo: la función antioxidante del GSH y su papel en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas.

#### **4.3.2.1. Función antioxidante del GSH**

Todos los organismos aeróbicos están sujetos a cierto nivel de estrés oxidativo por la respiración mitocondrial. Los intermediarios que se forman, tales como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el radical  $\text{O}_2^-$  pueden dar lugar a la producción de radicales de oxígeno tóxicos que pueden causar peroxidación lipídica y daño celular. Para prevenir que esto suceda, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido de forma endógena es reducido por el GSH intracelular en presencia de una peroxidasa de GSH dependiente de selenio, la glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 13, 1ª reacción).



**Figura 13.** Ciclo redox del GSH. El GSH reacciona con especies reactivas de oxígeno como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se oxida pasando a GSSG por la acción de la glutatión peroxidasa (GPx). En el segundo paso del ciclo, el GSSG será reducido a GSH por la GSSG reductasa (GR).

En el proceso, el GSH es oxidado a GSSG, el cual es reducido de nuevo a GSH por la GSSG reductasa (GR) con consumo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (Figura 13, 2ª reacción), formando todo ello un ciclo redox. Esta es una de las vías principales en muchas células para el metabolismo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ganea and Harding, 2006, Rahman et al., 2012). Además, los peróxidos orgánicos pueden ser reducidos por la GPx y también por la glutatión S-transferasa.

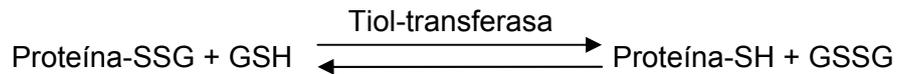
El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser reducido también por la catalasa, la cual tan solo se encuentra presente en los peroxisomas. En la mitocondria, el GSH es muy importante porque no hay catalasa. Por ello, el GSH mitocondrial es crítico en la defensa contra el estrés oxidativo (Fernandez-Checa et al., 1997, Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006).

El estrés oxidativo severo puede superar la habilidad de la célula para reducir el GSSG a GSH dando lugar a la acumulación de GSSG. Para proteger a la célula de una inversión en el equilibrio redox, el GSSG puede ser transportado de forma activa fuera de la célula o reaccionar con el grupo sulfhidrilo de una proteína dando lugar a la formación de un disulfuro mixto y disminuyendo el GSH celular (Lu, 1999).

#### **4.3.2.2. Mantenimiento del estado tiol en las proteínas**

El GSH es la forma predominante de tiol no proteico en las células de los mamíferos, es esencial para mantener el balance redox intracelular y el estado tiol de las proteínas (Lu, 1999). En particular su fracción tiol es un potente agente reductor (Apel and Hirt, 2004).

El GSH participa en el intercambio tiol-disulfuro en una reacción catalizada por la tiol-transferasa.



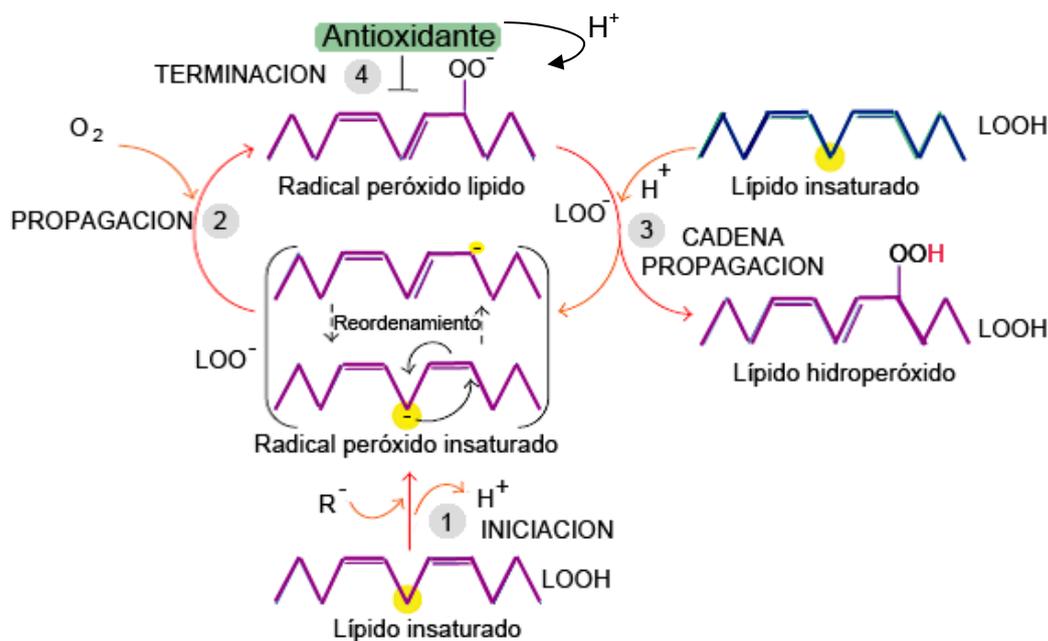
Se trata de una reacción reversible. El equilibrio está determinado por el estado redox de la célula, el cual depende de las concentraciones de GSH y GSSG (proporcional al logaritmo de  $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$ ) (Lu, 1999). Normalmente, el contenido celular de GSSG es extremadamente bajo para que la formación proteína-disulfuro esté limitada. Se sabe que el equilibrio tiol-disulfuro dentro de la célula regula un número diverso de procesos metabólicos incluyendo la actividad enzimática, la actividad de transporte, la señal de transducción y la expresión génica a través de la alteración de los factores de transcripción sensibles al estado redox (Hutter et al., 1997, Lu, 1999, Townsend et al., 2003).

#### 4.4. Peroxidación lipídica

Las especies ROS más prevalentes que pueden afectar más a los lípidos son el radical  $\cdot\text{OH}$  y el hidroperóxido ( $\text{HO}_2\cdot$ ). La peroxidación lipídica se describe como un proceso bajo el cual oxidantes como los radicales libres atacan a lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, especialmente los PUFAs (Yin et al., 2011).

En general el proceso de peroxidación lipídica tiene lugar en tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Kanner et al., 1987, Girotti, 1998, Yin et al., 2011) (Figura 14).

La iniciación consiste en la formación de un radical lipídico por la acción de pro-oxidantes como el radical  $\cdot\text{OH}$ . En la fase de propagación el radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido ( $\text{LOO}\cdot$ ) el cual toma un hidrógeno de otra molécula lipídica generando nuevos radicales  $\text{LOO}\cdot$  que continúan la reacción en cadena y la hidroxi-peroxidación lipídica ( $\text{LOOH}$ ). Finalmente, en la reacción de terminación, los antioxidantes como la vitamina E ceden un átomo de hidrógeno a las especies  $\text{LOO}\cdot$  y forman un hidroperóxido y por tanto productos no reactivos. Una vez se inicia la peroxidación, la propagación tendrá lugar hasta que los productos de terminación sean producidos (Figura 14).



**Figura 14.** Etapas que tienen lugar en la peroxidación lipídica. Iniciación, los prooxidantes extraen un  $H^+$  formando un radical lipídico que después tiende a ser estabilizado por un reordenamiento molecular y forma un dieno conjugado (paso 1). Propagación, en esta fase el radical lipídico reacciona con el oxígeno para formar un radical peróxido ( $LOO^\cdot$ ) (paso 2) el cual sustrae un  $H^+$  de otra molécula lipídica generando un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido (LOOH) (paso 3). En la reacción de terminación, los antioxidantes donan un  $H^+$  al radical peróxido lipídico, dando lugar a la formación de productos que ya no son reactivos (paso 4). Adaptado de Ayala (Ayala et al., 2014).

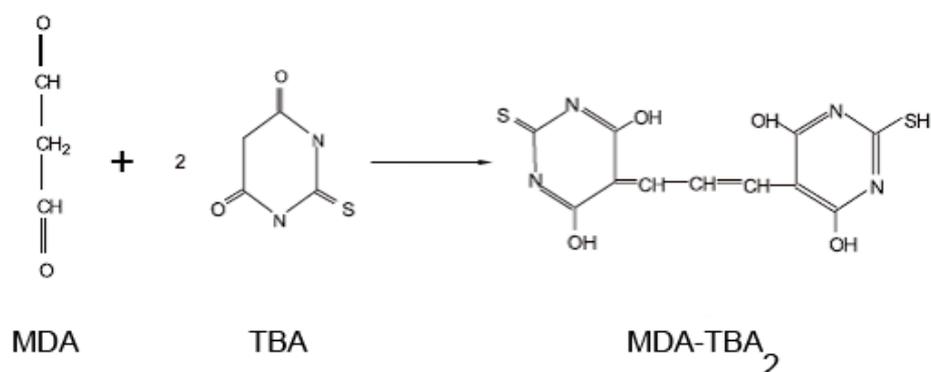
#### 4.4.1. Malondialdehído

La peroxidación lipídica produce una amplia variedad de productos de oxidación entre los que encontramos productos primarios como el LOOH y secundarios como el malondialdehído (MDA), propanal, hexanal y 4 hidroxinonenal (4-HNE) (Benedetti et al., 1980, Esterbauer et al., 1982, Esterbauer et al., 1984, Poli et al., 1985, Esterbauer et al., 1986, Cheeseman et al., 1988, Esterbauer and Cheeseman, 1990).

La descomposición del ácido araquidónico y de ácidos grasos poliinsaturados más grandes da lugar al MDA, uno de los productos finales de la citada descomposición (Esterbauer et al., 1991). Se cree que el MDA se origina bajo condiciones de estrés celular y tiene una alta capacidad de reaccionar con múltiples biomoléculas como las proteínas o el ADN y de formar aductos con estas moléculas (Luczaj and Skrzydlewska, 2003, Blair, 2008, Zarkovic et al., 2013). Además, una alta producción de MDA se ha asociado a diferentes estados patológicos (Merendino et al., 2003, Baskol et al., 2006, Sanyal et al., 2009, Bartoli et al., 2011, Li et al., 2012, Garcia et al., 2013). El MDA

parece ser el producto más mutagénico de la peroxidación lipídica pues contribuye de forma importante al daño y las mutaciones en el ADN (Niedernhofer et al., 2003, VanderVeen et al., 2003), mientras que el 4-HNE es el más tóxico (Esterbauer et al., 1990).

El MDA ha sido ampliamente usado como un marcador de peroxidación lipídica (Figura 15) y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría (Pryor, 1989, Esterbauer and Cheeseman, 1990). Además, el MDA es uno de los marcadores más populares y de confianza para determinar el estrés oxidativo (Moore and Roberts, 1998, Romero et al., 1998, Hakala et al., 1999, Marnett, 1999, Halliwell, 2000, Piconi et al., 2003, Cojocar et al., 2004, Giera et al., 2012).



**Figura 15.** Reacción entre el MDA y el TBA para formar el aducto MDA-TBA<sub>2</sub>. Adaptado de Grotto (Grotto et al., 2009).

Existe un consenso general acerca de que las determinaciones de MDA por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; high pressure liquid chromatography) (Chirico, 1994) son marcadores efectivos de la implicación del estrés oxidativo en una condición patológica y son útiles para evaluar el efecto de tratamientos con antioxidantes (Halliwell, 2000, Johnsen-Soriano et al., 2007).

## 5. Retinosis pigmentaria

### 5.1. Incidencia y fisiopatología de la enfermedad

La retinosis pigmentaria (RP) es la causa más común de ceguera de tipo hereditario (Berson, 1993, Bird, 1995, Klein et al., 1995, Klein et al., 1999, Hartong et al., 2006), con una prevalencia a nivel mundial de 1 cada 4.000 individuos (Hartong et al., 2006) y con un total de más de un millón de personas afectadas (Collin et al., 2010, Chang et al., 2011, Chizzolini et al., 2011). Los enfermos de RP constituyen del 85-90% de todos los casos de degeneración retiniana (Ayuso and Millan, 2010).

La enfermedad se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de los bastones con su consiguiente pérdida de función, seguida por la degeneración de los conos que también disminuyen su sensibilidad y viabilidad (Hamel, 2006, Hartong et al., 2006). A su vez, las principales características de esta enfermedad son la ceguera nocturna y la pérdida progresiva de visión periférica (visión en túnel), que suele aparecer en la edad adulta (Heckenlively, 1988) y que es debida a la citada pérdida progresiva de bastones. Además, también puede aparecer una eventual pérdida de visión central como resultado de la degeneración macular de los conos (Farrar et al., 2002, Tsui et al., 2007, Mitamura et al., 2012).

Los enfermos de RP también pueden presentar una atenuación de los vasos (Fishman, 1978), ya que la pérdida de vasculatura es una supuesta consecuencia metabólica de la degeneración de los fotorreceptores (Smith, 2004, Pennesi et al., 2008, Fernandez-Sanchez et al., 2012a). En estados tardíos los pacientes afectados muestran una acumulación anormal de pigmento (*clusters*) en la retina periférica media, debido a que el EPR se encuentra alterado en la mayoría de los casos. Las respuestas eléctricas a la luz registradas con electroretinograma (ERG), son anormales en los enfermos de RP (Karpe, 1945, Berson, 1976, Dryja et al., 1990).

Los síntomas comienzan de forma general en la adolescencia temprana y la disfunción visual severa sucede alrededor de los 40-50 años (Sahni et al., 2011). No obstante, en algunos casos existen pacientes de rápida evolución con una progresión de la enfermedad de alrededor de dos décadas. Por el contrario, otros muestran una progresión lenta que puede que no les cause nunca ceguera (Hamel, 2006).

### **5.2. Base genética de la retinosis pigmentaria**

Se ha descrito la naturaleza genéticamente compleja de esta enfermedad, encontrándose casos de RP autosómica recesiva (50-60%), autosómica dominante (30-40%) y ligada al cromosoma X (5-15%) (Boughman and Fishman, 1983, Wang et al., 2005) así como también casos sin patrón de herencia mendeliana, tales como herencia digénica, componentes de heterozigosidad y herencia materna (mitocondrial) (Hartong et al., 2006, den Hollander et al., 2007, Audo et al., 2011a, Audo et al., 2011b) .

La mayoría de los casos de RP son monogénicos. Se ha encontrado que mutaciones en casi 60 genes (<https://sph.uth.edu/retnet/>) pueden ser causantes de esta enfermedad, tales como mutaciones en el gen para la rodopsina (Dryja et al., 1990) o para la PDE6 $\beta$  de los bastones (Bowes et al., 1990). En pacientes que tienen mutaciones en el gen de la rodopsina, los conos degeneran a la vez que los bastones a pesar de que

los conos no contienen rodopsina (Heckenlively, 1988). La mayoría de mutaciones en el gen para la rodopsina y para el gen de la periferina o RDS (PRPH2; peripherin 2) (glicoproteína de membrana de los discos externos de los fotorreceptores con función estructural) (Travis et al., 1991), son probablemente la causa más común de RP autosómica dominante, con aproximadamente un 25% y 10% de los casos respectivamente (Fingert et al., 2008).

Además, la RP puede ser mayoritariamente no sindrómica (70 al 80%) (Ayuso and Millan, 2010) si únicamente se restringe a los ojos o puede formar parte de un síndrome más complejo, en la que los pacientes presentan otras enfermedades no oculares asociadas (20-30%) (Chang et al., 2011, Ferrari et al., 2011). Las formas más frecuentes de una RP sindrómica son las asociada al Síndrome de Usher (Keats and Savas, 2004, Daiger et al., 2007, Williams, 2008) y de Bardet-Biedl (Beales et al., 1999, Daiger et al., 2007).

La proporción de mutaciones que causan la enfermedad varía con la etnia y la geografía (Stone, 2003, Hamel, 2006, Daiger et al., 2007, Ferrari et al., 2011). Además, un 30-35% de las mutaciones de pacientes con RP no pueden ser identificadas (Berger et al., 2010, Sahel et al., 2010, Anasagasti et al., 2012), ya que casi la mitad de los casos de RP son esporádicos, sin ningún caso de degeneración retiniana en la familia (Ayuso and Millan, 2010). La mayoría de los casos de retinosis pigmentaria esporádica (SRP; sporadic retinitis pigmentosa) son RP de tipo autosómica recesiva (Hartong et al., 2006) y algunos otros con herencia dihíbrida (Loewen et al., 2001) y formas de herencia genética mitocondrial (Duno et al., 2013).

### **5.3. Muerte celular programada y autofagia**

#### **5.3.1. Apoptosis y retinosis pigmentaria**

La apoptosis o muerte celular programada, es un “suicidio” celular altamente regulado y ordenado. Constituye un proceso fisiológico esencial para el correcto desarrollo y homeostasis de un organismo (Danial and Korsmeyer, 2004). Típicamente durante la apoptosis, existe condensación del núcleo y de la cromatina, esta última se fragmenta, la célula se encoge y las enzimas caspasas degradan la célula (Kerr et al., 1972, Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2007). A su vez, durante la apoptosis se producen alteraciones del citoesqueleto y formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados evitando así desencadenar una reacción inflamatoria.

Durante el desarrollo del sistema nervioso tienen lugar numerosos procesos fisiológicos de muerte celular programada, lo que resulta esencial para su correcta morfogénesis y funcionalidad (Oppenheim, 1991, de la Rosa and de Pablo, 2000, Kuan et al., 2000, Boya and de la Rosa, 2005). En concreto, en la retina de los vertebrados, se producen al menos dos fases de muerte celular: a) una primera fase de muerte, que afecta a células neuroepiteliales en proliferación y neuroblastos recién diferenciados y que está poco caracterizada morfológicamente y funcionalmente (de la Rosa and de Pablo, 2000, Yeo and Gautier, 2004, Boya and de la Rosa, 2005) y b) una segunda fase más tardía que está mejor caracterizada, dicha fase tiene lugar en la segunda mitad del desarrollo de la retina y está asociada al proceso de diferenciación y maduración celular. Para la tercera semana de vida, la muerte total de la retina es casi imperceptible (Young, 1984, Mervin and Stone, 2002).

Sin embargo, a parte de la apoptosis típica por el desarrollo, también podemos encontrar una apoptosis desregulada o patológica. Este tipo de apoptosis está asociada con la neurodegeneración, el daño por isquemia-reperfusión y las enfermedades de la médula ósea (Thompson, 1995, Mattson, 2000).

En la RP, intervienen diversos procesos fisiológicos que conducen a la neurodegeneración, entre ellos se encuentran el estrés oxidativo (Komeima et al., 2007) y un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Doonan et al., 2005, Paquet-Durand et al., 2007), entre otros. Se cree que dichos procesos tienen un final en común que conduce a la muerte celular y a la pérdida de fotorreceptores por apoptosis (Chang et al., 1993, Farrar et al., 2002, Cottet and Schorderet, 2009).

El estrés oxidativo y los antioxidantes juegan un papel importante en el control de la muerte celular por apoptosis (Curtin et al., 2002). De modo que diversos autores han estudiado la relación de antioxidantes endógenos como el GSH con la apoptosis celular. El GSH modula la muerte celular, regulando el estado redox de residuos de tioles específicos de las proteínas, tales como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B; nuclear factor kappa B), quinasas de estrés y caspasas, que están implicadas en dicha muerte (García-Ruiz and Fernández-Checa, 2007). La disminución del GSH sucede durante la apoptosis en muchos tipos celulares, como reacción secundaria al aumento de las ROS, una salida intensificada de GSH de la célula y una disminución de la actividad de la GCL (Hall, 1999, Franklin et al., 2003). Además, se ha demostrado que el GSH puede tener una importante función en el paso de una célula de apoptosis a necrosis (Hall, 1999, García-Ruiz and Fernández-Checa, 2007), ya que ambas formas de muerte celular a menudo

coexisten y comparten vías comunes, como la implicación de la mitocondria (Lemasters, 2005).

De esta manera, la atenuación de la apoptosis representa una buena diana terapéutica en la RP (Doonan and Cotter, 2004, Cottet and Schorderet, 2009), pudiendo ser el estrés oxidativo uno de los procesos a tener en cuenta para paliar y/o prevenir la apoptosis patológica.

### **5.3.2. Autofagia y retinosis pigmentaria**

La muerte celular programada también puede ser activada por autofagia (Kunchithapautham and Rohrer, 2007, Boya and Kroemer, 2008). La autofagia lisosomal es uno de los procesos más importantes para el mantenimiento metabólico normal y la señalización redox celular pues se trata de un proceso que se realiza a través de la degradación de proteínas y orgánulos celulares dañados (Dodson et al., 2013).

Uno de los procesos fisiológicos normales en que la autofagia puede verse activada es por ejemplo, en casos de ayuno prolongado o de adaptación a este ayuno. En este proceso de ayuno la supervivencia celular puede verse prolongada gracias a la autofagia, debido a que cuando en primera instancia las reservas accesibles para la obtención de energía, como son los ácidos grasos y el glucógeno disminuyen, la célula comenzará a catabolizar sus componentes citoplasmáticos (Berridge, 2012).

La autofagia es la degradación a gran escala de los componentes citoplasmáticos. Durante un proceso de inducción de la autofagia como puede ser el citado ayuno, el retículo endoplásmico liberará protusiones de su membrana formando vesículas que pueden envolver a la mitocondria y a los ribosomas para formar una vacuola autofágica, esta vacuola será la que posteriormente se fusionará con un lisosoma para ser degradada por proteasas lisosomales, como por ejemplo las catépsinas, las principales proteasas lisosomales (Uchiyama, 2001, Boya and Kroemer, 2008). De este modo, la permeabilización parcial y selectiva de la membrana lisosomal inducirá el “desmantelamiento” controlado de la célula por apoptosis. Sin embargo, existen situaciones en que puede suceder la disrupción completa de los lisosomas, provocando una muerte celular descontrolada por necrosis.

Además, se sabe que la ausencia de autofagia puede causar enfermedades neurodegenerativas (Harris and Rubinsztein, 2012, Chen et al., 2013) y que su activación también puede dar lugar a apoptosis en algunas enfermedades, a través de la destrucción de componentes celulares (Codogno and Meijer, 2005). Es por ello que en

los últimos años, el estudio de mecanismos alternativos de muerte celular como la autofagia están recibiendo una atención creciente entre los posibles procesos implicados en las enfermedades degenerativas de la retina (Kunchithapautham and Rohrer, 2007, Murakami et al., 2013, Chinskey et al., 2014).

A su vez, la acumulación de ROS también puede inducir permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación de catepsinas (Sanvicens and Cotter, 2006, Boya and Kroemer, 2008, Metrailler et al., 2012), con lo que también resultará fundamental el estudio de la autofagia en enfermedades en las que el estrés oxidativo tiene un papel importante.

### **5.4. La inflamación en la retinosis pigmentaria**

El ojo es un órgano inmunoprivilegiado. El inmunoprivilegio es una característica de algunos órganos que comprende un conjunto de procesos moleculares complejos que controlan la inflamación para prevenir el daño en los tejidos especiales (Ono, 2003, Streilein, 2003). El ojo posee un sistema inmune especial que incluye reguladores e inhibidores de la respuesta inmune, lo que ayuda a modular la respuesta ante la presencia de un antígeno. Este inmunoprivilegio es expresado constitutivamente, tanto en la córnea, como en la retina y en la cámara anterior (Sun et al., 2003).

Se ha demostrado que la inflamación está relacionada con la patogénesis de muchas de las enfermedades de la retina, tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la RP, retinopatía diabética, etc (Gehrs et al., 2006, Yoshida et al., 2013a). En la RP se produce un daño en la BHR debido a la alteración en el EPR, por lo que los pacientes de RP pueden presentar células del sistema inmune y factores inflamatorios en el espacio subretiniano, como también en el humor vítreo y acuoso, de manera que la retina llega a ser mucho más pro-inflamatoria (Rutar et al., 2010, Chinnery et al., 2012, Mullins et al., 2012, Yoshida et al., 2013a). Por ejemplo, Newsome y Michels han demostrado que muestras de vítreo de pacientes con RP contienen muchas células del sistema inmune tales como varios tipos de linfocitos (Newsome and Michels, 1988).

Además, existen resultados que demuestran que la RP provoca una activación de la inflamación, ya que se han encontrado anticuerpos retinianos (probablemente frente a los fotorreceptores) en la circulación sistémica de los pacientes con RP (Rahi, 1970, Spalton et al., 1978). Estudios más recientes han resaltado la activación de la microglía precedente a la muerte celular de los fotorreceptores; dicha activación resulta de múltiples eventos bioquímicos, incluyendo la activación de citoquinas y quimioquinas (Gupta et al., 2003).

Sin embargo, no está claro si la inflamación tiene un papel crucial en la RP, ya que de los más de 100 ensayos clínicos para la RP (<https://www.clinicaltrials.gov/>) ninguno está dirigido al empleo de terapias antiinflamatorias.

### **5.5. Terapias en el tratamiento de la retinosis pigmentaria**

La combinación de las pruebas clínicas junto con las técnicas de diagnóstico molecular, son una poderosa aproximación para el diagnóstico de pacientes y familias con RP (Daiger et al., 2007).

Las técnicas más ampliamente empleadas para el diagnóstico molecular de la RP se pueden incluir en dos grandes grupos: tecnologías de secuenciación y las tecnologías especializadas en la detección de variantes genéticas.

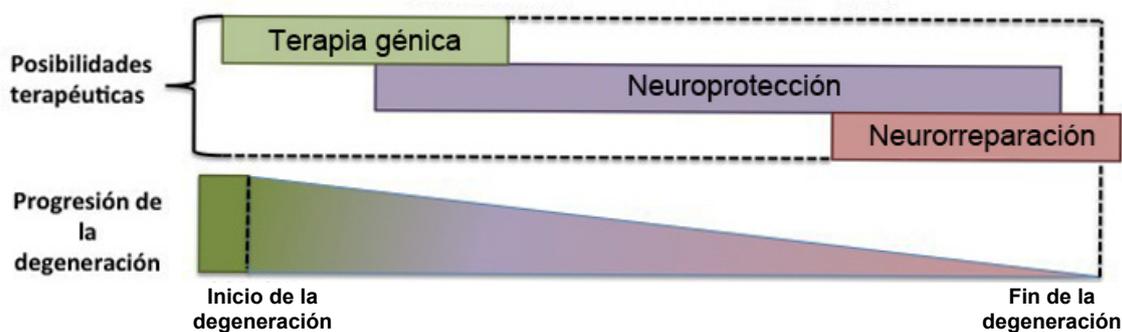
Aunque existen diversas aproximaciones para su diagnóstico, la naturaleza genéticamente compleja de la RP limita la detección de mutaciones, lo que contribuye a que actualmente no exista un tratamiento estandarizado y eficiente para esta enfermedad (Ayuso and Millan, 2010, Anasagasti et al., 2012).

Las líneas más avanzadas en investigación en el tratamiento de la RP incluyen: terapias neuroprotectoras mediante el uso de factores neurotróficos o suplementos dietéticos (Nguyen et al., 2008, Radu et al., 2008, Tsubura et al., 2009, Trifunovic et al., 2012, Zhang et al., 2012), terapia génica (Maguire et al., 2009, Allocca et al., 2011, Pang et al., 2011, Jacobson et al., 2012), estrategias de reemplazo celular (Girman et al., 2003, MacLaren et al., 2006, Pearson et al., 2012, West et al., 2012) y prótesis electrónicas (Zrenner et al., 2011, Barry et al., 2012, Kusnyerik et al., 2012) (Figura 16).

Según el estado más o menos avanzado en que se encuentre la enfermedad, existirá un tipo de terapia más conveniente que otro, tratando de adaptar el tratamiento al estado de la enfermedad. De una forma generalizada:

Las prótesis de retina, la optogenética y la terapia de reemplazo celular, son las alternativas más adecuadas para distrofias retinianas en estadio tardío (Jones et al., 2012).

La terapia génica también es dependiente del estadio de la enfermedad por lo que es necesaria una detección temprana, ya que es menos efectiva a medida que la enfermedad progresa. Sin embargo, el diagnóstico temprano de casos de SRP no es fácil, ya que puede requerir *screening* pediátrico o secuenciación de los genes de la RP en ADN fetal de sangre materna (Kitzman et al., 2012).



**Figura 16.** Principales estrategias para el tratamiento de degeneraciones hereditarias de fotorreceptores como la RP. La terapia génica requiere de un diagnóstico y tratamiento tempranos, así como de la existencia de unos fotorreceptores todavía viables en el momento de la intervención. La estrategia de neuroreparación puede ser aplicada solo cuando todos o casi todos los fotorreceptores han degenerado o desaparecido. Una de las mayores ventajas de la neuroprotección es el amplio rango de tiempo que puede ser aplicada, desde los primeros síntomas hasta un estado muy avanzado de la degeneración. Adaptado de Trifunovic (Trifunovic et al., 2012).

### 5.5.1. Terapia génica

La terapia génica se ha demostrado que mejora la función visual en la RP (Cideciyan et al., 2013, Wert et al., 2013).

Existen dos estrategias principales para la terapia génica en la RP: la corrección del defecto genético y por otra parte la neuroprotección mediante la introducción de genes que contrarresten o mejoren el defecto genético. En cuanto a la primera estrategia, los estudios realizados en modelos de ratón con RP autosómica recesiva han demostrado que la terapia de reemplazo génico es una gran promesa para tratar desórdenes de tipo monogénicos (Fletcher et al., 2011, Smith et al., 2012, Chang et al., 2013, Sahel and Roska, 2013). Además, se ha observado que esta terapia génica es más efectiva cuando el tratamiento se inicia antes del comienzo de la muerte celular de los fotorreceptores (Rolling, 2004, Colella and Auricchio, 2012). La segunda estrategia, aplicable tanto en la RP autosómica recesiva como dominante, consiste en introducir genes que contrarresten o mejoren las consecuencias del gen mutado, sin corregir el defecto genético subyacente.

Muchas de las mutaciones relacionadas con la RP están asociadas a compuestos enzimáticos y estructurales de la maquinaria de fototransducción, como es el caso de la PDE6 $\beta$ . Los progresos recientes que han tenido lugar empleando la terapia génica para la deficiencia en la PDE6 $\beta$  han sido prometedores (Davis et al., 2008, Pang et al., 2008a, Allocca et al., 2011, Petit et al., 2012).

El uso de los virus adeno-asociados (AAV; adenoassociated virus) recombinantes como vectores génicos ha demostrado ser uno de los más efectivos para la transducción de varios tipos celulares retinianos *in vivo* (Vandenberghe and Auricchio, 2012). Especialmente, el uso de un nuevo AVV como vector, el AAV8 (Petr-Silva et al., 2009, Pang et al., 2011, Wert et al., 2013). Algunos autores han demostrado que con una terapia génica *in vivo* los fotorreceptores pueden ser rescatados tanto en el modelo de ratón rd1 (Han et al., 2013) como en el modelo de ratón rd10 (Pang et al., 2008a).

No obstante, la terapia génica presenta algunas limitaciones como son: a) la mayor o menor efectividad asociada al sitio de inyección de los vectores de AAV, según sea inyección intravítrea o subretiniana; b) la expresión a corto plazo del gen transducido, debido a la respuesta inmune del organismo receptor contra el vector de AVV y c) el daño que el empleo de estas inyecciones puede provocar (Pang et al., 2008b).

Actualmente, el gran objetivo es desarrollar vectores de AAV altamente eficientes y que mediante inyección intravítrea sean capaces de entrar en las células, de manera que produzcan la expresión de sus genes en las células fotorreceptoras de toda la retina (Petr-Silva et al., 2009, Petr-Silva et al., 2011). De este modo, se pretende evitar el daño asociado a los procedimientos de las inyecciones subretinianas, especialmente alrededor de la fovea (Jacobson et al., 2012).

En un futuro, se pretende que la terapia génica sea diseñada a medida para cada paciente, con la finalidad de adecuar de manera óptima el estado de la degeneración al tipo de tratamiento (Petr-Silva and Linden, 2014).

## **5.5.2. Neuroreparación**

### **5.5.2.1. Terapia celular**

La terapia celular consiste en el empleo de células madre y progenitoras que pueden ser aisladas de un número diverso de fuentes incluyendo tejido embrionario, cerebro adulto e incluso la retina, con la finalidad de generar células retinianas para el trasplante (Ong and da Cruz, 2012, Ramsden et al., 2013). De forma más concreta encontramos las siguientes fuentes celulares para la terapia neuroreparadora:

1. Células madre de retinas fetales o neonatales (Reh, 2006, Tian et al., 2011) o células madre embrionarias (ESC; embryonic stem cells) que derivan de la masa interna del embrión en estado de blastocisto (Thomson et al., 1998, Lamba et al., 2006, Gonzalez-Cordero et al., 2013).

2. Células madre pluripotentes inducidas (iPS; induced pluripotent stem cells), que gracias a su pluripotencialidad presentan la capacidad de generar la mayoría de tejidos y se reprograman *in vitro* a partir de células somáticas (Yu et al., 2007).

Este tipo celular podría ayudar a disminuir algunos de los problemas éticos que están asociados al uso de las ESC y a suprimir el posible rechazo inmunológico por trasplante, al tratarse de células que proceden del propio individuo. Con el empleo de estas células se pretende generar de forma *ex vivo* células pluripotentes que corrijan de forma individualizada cualquier defecto genético (Wright et al., 2014).

3. Células madre mesenquimales (MSC; mesenchymal stem cells), procedentes de células derivadas de la médula ósea y que tienen la capacidad de auto-renovarse y dar lugar a múltiples tipos de tejidos (Friedenstein et al., 1976, Otani et al., 2004). Otras fuentes de MSC son el tejido adiposo, la placenta y la sangre del cordón umbilical (In 't Anker et al., 2004, Lee et al., 2004, Ghorbani et al., 2014, Secunda et al., 2014) .

4. Células progenitoras neurales multipotentes, estas células pueden derivar del hipocampo (Takahashi et al., 1998, Young et al., 2000) o del margen periférico de la retina o zona marginal ciliar (CMZ; ciliar marginal zone), que se encuentra en la unión entre el epitelio ciliar y la retina. La CMZ es análoga a otras zonas de células madre neurales en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados; en las que las células progenitoras pueden persistir a lo largo de la vida del animal pudiendo generar todos los tipos de neuronas y glía que se encuentran presentes normalmente en la retina (Hollyfield, 1968, Reh, 1987).

En la RP, algunos autores han demostrado que el trasplante de fotorreceptores es viable en varios modelos animales en diferentes estados de degeneración, incluyendo el ratón rd1 (Barber et al., 2013, Singh et al., 2013). Además, por lo que a las MSC de la médula ósea autólogas se refiere, se han llevado a cabo ensayos clínicos en fase I (NCT01068561) con pacientes de RP, usando inyecciones cerca de la córnea o intravítreas (Siqueira et al., 2011).

Uno de los problemas del reemplazo celular es el posible rechazo inmunológico, dando lugar a una baja tasa de supervivencia de las células trasplantadas, un gran problema en la terapia celular con células madre (Klassen et al., 2004). Además, otra limitación es que se ha demostrado que las células trasplantadas tienen una reducida capacidad de migración (He et al., 2014). Por ello, se ha planteado el uso de biomateriales que sirvan como “andamio” o soporte para la migración y sostén de estas

células (Sodha et al., 2011, Ong and da Cruz, 2012, McHugh et al., 2013) aunque los resultados son todavía insatisfactorios.

Además, existen otros obstáculos que superar antes de poder aplicar estas técnicas de reemplazo celular, como son el pobre rendimiento de diferenciación de las células madre exógenas y la complejidad de conexiones sinápticas que son necesarias entre el trasplante y las células retinianas endógenas. Los avances en este campo requerirán una mejor comprensión de la biología celular, así como resolver algunos problemas de bioseguridad para que este tipo de terapia pueda ser aplicada clínicamente (He et al., 2014).

#### **5.5.2.2. Implantes de retina**

Se ha planteado el uso de implantes como medio para tratar a los pacientes con RP que han perdido gran parte de la visión, permitiendo restaurar habilidades visuales específicas como la percepción de la luz y el reconocimiento de objetos (Kusnyerik et al., 2012, Stingl et al., 2013, Light et al., 2014).

Estos implantes estimulan eléctricamente las células supervivientes de la retina y pueden insertarse en la superficie interna de la misma, para estimular las células ganglionares (implantes epirretinales) o en la superficie externa, entre la capa de los fotorreceptores y el EPR (implantes subretinales).

Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios entre algunos de los mecanismos empleados para los implantes y los pacientes, debido principalmente a la existencia de pacientes con cursos de la degeneración retiniana altamente variables y con patrones irregulares de degeneración en la retina (Yanai et al., 2007, Roessler et al., 2009, Fujikado et al., 2011, Klauke et al., 2011, Weiland et al., 2011, Zrenner et al., 2011).

#### **5.5.2.3. Optogenética**

La optogenética, es una técnica de ingeniería genética que consiste en introducir en las neuronas de las capas internas de la retina un gen (optogen) que exprese una proteína fotosensible (*channelrhodopsin-2*, *halorhodopsin*...) en la superficie celular. Cuando dicha proteína recibe luz, se activa y modula la actividad neuronal iniciando una señal nerviosa equivalente a la generada por los fotorreceptores (Busskamp et al., 2012, Roska et al., 2013). La razón de haber incluido esta estrategia dentro de la terapia génica neuroreparadora, es que la optogenética se plantea para tratar estadios

avanzados de RP (Cronin and Bennett, 2011) como sucede con las estrategias de neuroreparación.

### 5.5.3. Neuroprotección

Podríamos clasificar las estrategias de neuroprotección para el tratamiento de la RP en dos tipos: a) aquellas cuyo objetivo es fortalecer las vías de supervivencia de los fotorreceptores y b) aquellas cuyo principal objetivo es prevenir el inicio y ejecución de los mecanismos de muerte celular en los fotorreceptores.

Desde el punto de vista de la neuroprotección se han desarrollado varios tratamientos farmacológicos para retrasar temporalmente la degeneración en los modelos de ratón causados por una deficiencia en la PDE6 $\beta$  (Sahni et al., 2011), entre los más estudiados encontramos:

1. El D-cis-diltiazem, un bloqueante de los canales de Ca<sup>2+</sup> que también actúa a nivel de los canales de GMPc sensibles a la luz y aunque con controversia por parte de otros autores (Bush et al., 2000, Pearce-Kelling et al., 2001, Pawlyk et al., 2002) se ha descrito que rescata a los fotorreceptores y preserva la función visual en los ratones rd1 (Frasson et al., 1999b, Takano et al., 2004).

2. La vitamina A, cuyo empleo ha dado buenos resultados en modelos animales (Li et al., 1998) y en ensayos clínicos (Berson et al., 1993). Actualmente, el único tratamiento recomendado para la RP es la suplementación con vitamina A, sola o combinada con el ácido docosahexanoico (DHA) para retrasar de forma modesta la muerte de los fotorreceptores (Berson et al., 2004). Sin embargo, su administración en pacientes de degeneraciones retinianas como la RP requiere de supervisión médica, debido a su toxicidad a dosis elevadas y con un consumo prolongado (Penniston and Tanumihardjo, 2006).

3. Los factores de crecimiento, cuyo uso persigue evitar la muerte celular asociada al proceso neurodegenerativo. En este sentido, se han probado diferentes formas de administración de estos factores a través de inyecciones intravítreas o subretinianas, en varios modelos animales con degeneración de retina.

La inyección intravítrea de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; brain-derived neurotrophic factor), neurotrofina-3, neurotrofina-4 y el factor neurotrófico ciliar (CNTF; ciliary neurotrophic factor) en varios modelos de degeneración retiniana, incluido el ratón rd1, puede enlentecer la progresión

de la muerte celular de los fotorreceptores (LaVail et al., 1998). Especialmente, el CNTF sólo o combinado con BDNF, parece ser neuroprotector aumentando la supervivencia de los fotorreceptores (Tao et al., 2002, Azadi et al., 2007, Rhee and Yang, 2010, Wen et al., 2012). Por ello, se han realizado ensayos clínicos de fase II y III administrando CNTF en estadios temprano y tardío de la RP (MacDonald et al., 2007) con resultados esperanzadores.

Las inyecciones subretinianas también han demostrado ser efectivas en algunos casos. La liberación subretiniana del factor neurotrófico derivado de la línea celular de glía (GDNF; glial cell line-derived neurotrophic factor), ha evidenciado que tiene un efecto protector temporal frente a la pérdida de los fotorreceptores en los ratones rd1 (Frasson et al., 1999a) y rd10 (Ohnaka et al., 2012). A su vez, los factores para la viabilidad de los conos derivados de los bastones (RdCVFs; rod-derived cone viability factors) se han empleado como estrategia protectora para preservar la visión central dependiente de los conos, tras la muerte de los bastones (Leveillard et al., 2014).

A pesar de mostrar unos buenos resultados, el mantenimiento de la eficacia a largo plazo usando la inyección simple de factores neurotróficos es difícil, tanto por la corta vida media de las proteínas recombinantes, como por el riesgo de infección existente después de repetidas inyecciones (Lenzi et al., 2005, Schallenberg et al., 2012, Qi et al., 2015).

Finalmente, existen formas indirectas de alargar la supervivencia de los fotorreceptores sin tratamiento farmacológico, como se ha demostrado en los ratones rd10, a través del enriquecimiento ambiental. Esta estrategia puede producir un aumento de los niveles endógenos de factores tróficos potencialmente beneficiosos como el CTNF (Barone et al., 2012).

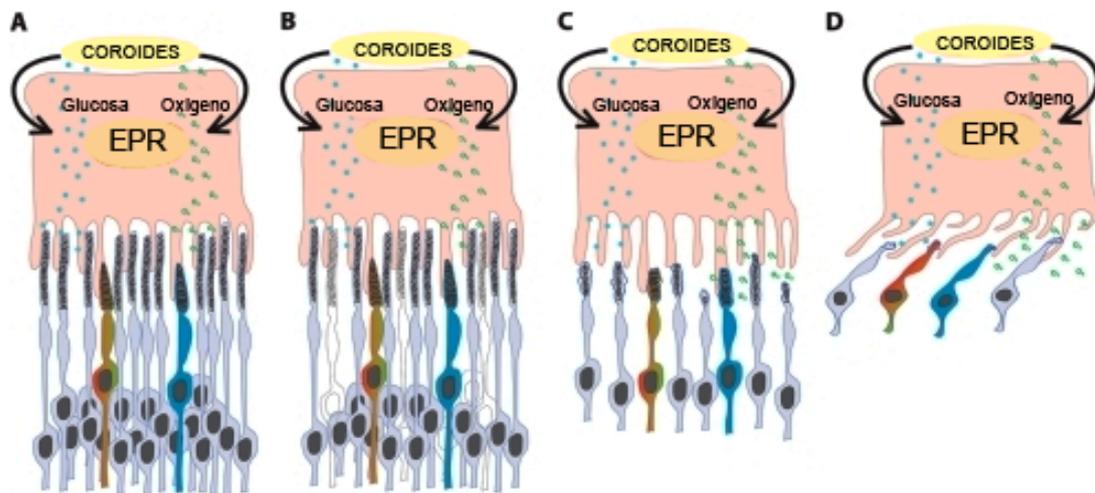
## **5.6. Estrés oxidativo y retinosis pigmentaria**

De acuerdo con Komeima y colaboradores, aunque la RP es comúnmente considerada como una enfermedad genética, el estrés oxidativo juega un importante papel en su patogénesis (Komeima et al., 2007).

Los bastones, son células metabólicamente muy activas con un elevado consumo de oxígeno. Durante la progresión de la RP, cuando estos bastones mueren como consecuencia de una mutación genética, el consumo de oxígeno en la retina disminuye y debido a que la circulación sanguínea en los vasos de la coroides no se autorregula (Bill and Sperber, 1990), se puede producir una situación de hiperoxia que originaría daño

oxidativo (Figura 17). Este daño afectaría a la supervivencia de las células de la retina, entre ellas los conos, que sufren un daño oxidativo progresivo que en un último punto desencadena en apoptosis (Usui et al., 2009b) 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, causarían importantes daños a lípidos, proteínas y al ADN (Usui et al., 2011, Punzo et al., 2012). A este fenómeno se le conoce como hipótesis de la toxicidad por el oxígeno en la RP.



**Figura 17.** Representación esquemática de la pérdida de los bastones durante la progresión de la RP que conlleva cambios en la citoarquitectura de la retina. (A) Antes del comienzo de la muerte de los bastones existe una importante interacción entre los segmentos externos de los fotorreceptores y el EPR. (B) Cuando los bastones empiezan a morir dichas interacciones todavía persisten. (C) Conforme la enfermedad progresa la pérdida de fotorreceptores se evidencia más y los conos que sobreviven comienzan su colapso. (D) La pérdida de los bastones da lugar a unos elevados niveles de oxígeno que pueden resultar tóxicos, a su vez las pocas interacciones entre el EPR y los fotorreceptores que quedan pueden causar una caída del flujo de nutrientes. Adaptado de Punzo (Punzo et al., 2012).

De este modo, el estrés oxidativo se ha relacionado con la patogénesis de la RP, existiendo estudios que demuestran la existencia de estrés oxidativo también en la degeneración de los conos (Shen et al., 2005, Cingolani et al., 2006, Miranda et al., 2010).

Diversos autores demostraron un temprano y considerable aumento de las ROS, acompañado por una rápida disminución del GSH intracelular en un modelo *in vitro* de apoptosis para fotorreceptores. Estos autores sugieren que los cambios tempranos en el estado redox preceden una interrupción del potencial de membrana mitocondrial, condensación nuclear, cortes en el ADN, pérdida de células, además de sucesos de

apoptosis muy bien caracterizados (Kerr et al., 1972, Carmody et al., 1999). En ratas P23H (mutación autosómica dominante en la rodopsina) se ha demostrado que la muerte de los fotorreceptores inducida por la hiperoxia incrementaba el estrés oxidativo en la retina externa y aceleraba la muerte de los fotorreceptores que sobrevivían (Yu et al., 2000, Yu et al., 2004).

### **5.6.1. Peroxidación lipídica y retinosis pigmentaria**

Los productos derivados de las reacciones con los radicales libres del oxígeno, tales como peróxidos y los metabolitos de los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (PUFAs; poliunsaturated fatty acids) están implicados en reacciones de oxidación en el ojo y podrían jugar un importante papel en la fisiopatología de la mayoría de enfermedades oculares. En el ojo, la deficiencia del DHA, el PUFA más abundante, está asociado con anomalías en el sistema visual, incluyendo RP, desórdenes de los peroxisomas y problemas de desarrollo en niños (SanGiovanni and Chew, 2005).

El alto contenido en lípidos en la retina y en el cerebro es importante para la alta vulnerabilidad de estos tejidos al estrés oxidativo. Esto es porque la acción de los peróxidos en los lípidos de membrana conlleva muchos daños, como por ejemplo disminución en la fluidez de la membrana, elevada sensibilidad al estrés oxidativo y cambios en la actividad de enzimas antioxidantes (Inoue et al., 1993, Kovacs et al., 1996, Liu et al., 1996, Liu and Mori, 1999). Por tanto, la peroxidación lipídica se considera como la mayor alteración bioquímica subyacente al daño oxidativo inducido en la célula en estrés en diversas enfermedades (Shaheen et al., 1993, Liu et al., 1994, Olivenza et al., 2000, Zaidi and Banu, 2004). Además del papel patológico, estos metabolitos lipídicos oxidados pueden ejercer acciones farmacológicas en tejidos de la úvea anterior y la retina, como por ejemplo, en la regulación de la neurotransmisión de aminoácidos como el glutamato (Njie-Mbye et al., 2013).

En la RP se han encontrado alteraciones de diversos marcadores de estrés oxidativo (Shen et al., 2005). Elevados niveles de MDA se han correlacionado con un estrés oxidativo en la sangre de pacientes con RP bajo un estado de activación de sus plaquetas o hiper-coagulación (Guo et al., 1994) en las que el estrés oxidativo cambia la estructura y la actividad de lipoproteínas y promueve la activación de células, incluidas las propias plaquetas. Además, en enfermedades como el glaucoma también se han visto aumentados los niveles del MDA en el vítreo y la retina, sugiriendo la presencia de estrés oxidativo en estos tejidos (Ko et al., 2005, Yucel et al., 2005).

Por otra parte, algunos autores asocian la existencia de inflamación a una elevada peroxidación lipídica en cultivos celulares en los que se había inducido peroxidación lipídica mediante el sistema Fe/ácido ascórbico (Yara et al., 2013). Diversos autores proponen una estrecha relación entre la inflamación y el estrés oxidativo en diversas enfermedades como son el Parkinson, la diabetes, la DMAE o la RP (Sasaki et al., 2009, Mohamed et al., 2012, Soufi et al., 2012, Martínez-Fernández de la Cámara et al., 2013, Martínez-Fernández de la Cámara et al., 2014, Hytti et al., 2015, Sharma and Nehru, 2015). No obstante, aunque tanto el estrés oxidativo y la inflamación se producen a raíz de la situación patológica, no está claro si el estrés oxidativo es una causa de la inflamación que aparece en enfermedades como la RP, o por el contrario es una consecuencia de ella.

En la presente tesis doctoral se estudiarán las concentraciones de MDA en un ensayo de peroxidación lipídica *ex vivo* (inducción de peroxidación con Fe y ácido ascórbico) en el que se incubarán diferentes concentraciones de progesterona (P4). También se analizarán las concentraciones de MDA *in vivo* tras un tratamiento con 150 mg/kg de P4 en los modelos de ratón rd10 y C57BL/6J.

### **5.6.2. Antioxidantes presentes en la retina**

En condiciones fisiológicas, la retina se caracteriza por una alta tasa de consumo de oxígeno y por encontrarse expuesta a agentes pro-oxidantes como la luz (De La Paz and Anderson, 1992, Glickman and Lam, 1992, Liang and Godley, 2003), es por ello que es especialmente susceptible al estrés oxidativo. A su vez, los fotorreceptores también son sensibles a altos niveles de ROS y a la peroxidación lipídica, debido a la gran superficie de membranas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados presentes en los fotorreceptores (Winkler et al., 1999, Panfoli et al., 2012).

Por ello, la retina dispone de sustancias antioxidantes como los pigmentos visuales o las vitaminas C y E que contrarrestan estos efectos nocivos (Garland, 1991, Stoyanovsky et al., 1995, Rozanowska et al., 2012). Las vitaminas C y E bloquean los radicales libres y la oxidación y degradación de la zeaxantina (Rozanowska et al., 2012). El  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E está presente en los segmentos externos de los fotorreceptores donde ayuda a prevenir la peroxidación lipídica. También encontramos carotenoides tales como la luteína que se encuentra de forma abundante en los fotorreceptores y en la retina periférica y la zeaxantina, que está concentrada en la mácula (Widomska and Subczynski, 2014).

Además, en otras partes del globo ocular como el humor acuoso, hay elevados niveles de ácido ascórbico o vitamina C y de GSH (Umaphathy et al., 2013) que protegen al ojo del daño oxidativo, neutralizando los radicales libres y las ROS (Ringvold, 1996).

El hipotético papel de la oxidación en el desarrollo de las enfermedades oculares ha dado pie a la investigación en el uso de antioxidantes como agentes neuroprotectores en terapia ocular. Aunque el uso de antioxidantes parece prometedor para mejorar los resultados en los desórdenes oculares, son necesarias más investigaciones para estandarizar las indicaciones para su uso, composición y dosis (Njie-Mbye et al., 2013).

### **5.6.3. Los antioxidantes en el tratamiento de la retinosis pigmentaria**

Como se ha mencionado en el apartado 5.5.3. de la introducción, la neuroprotección constituye una de las posibles vías de tratamiento frente a la RP. Dentro de la terapia neuroprotectora, el empleo de antioxidantes ha ido ganando importancia como una alternativa a considerar en el tratamiento de la RP. Han sido varios los compuestos que se han estudiado como posibles candidatos para una terapia neuroprotectora con antioxidantes en la RP, entre los más importantes destacan:

1. El ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA; tauroursodeoxycholic acid) es un compuesto activo con propiedades antioxidantes (Gaspar et al., 2013), presente en la bilis del oso y el cual se ha demostrado que tiene propiedades neuroprotectoras para los fotorreceptores en los ratones rd10 (Boatright et al., 2006, Phillips et al., 2008, Oveson et al., 2011, Drack et al., 2012) y en modelos de rata P23H (Fernandez-Sanchez et al., 2011).

2. La curcumina es un polifenol procedente de la cúrcuma con propiedades antitumorales, antioxidantes y antiinflamatorias, cuya administración mejora la morfología y fisiología de la retina en el modelo de rata P23H (Vasireddy et al., 2011), dando lugar a buenos resultados en la inhibición del estrés oxidativo *in vitro* (Gaspar et al., 2013).

3. Antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y el ácido  $\alpha$ -lipoico, han demostrado tener capacidad para enlentecer el proceso de degeneración en los modelos de ratón rd1 y rd10 tras ser administrados de forma sistémica (Komeima et al., 2006, Komeima et al., 2007). Asimismo, la luteína ha mostrado dar buenos resultados en su empleo en ensayos clínicos con enfermos de RP (Berson et al., 2010).

Además, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la combinación de luteína, zeaxantina, ácido  $\alpha$ -lipoico y GSH era capaz de retardar la degeneración en los

ratones rd1 tras su administración temprana mientras los bastones están muriendo (Sanz et al., 2007). Un tratamiento similar incrementaba la actividad de la GPx y las concentraciones de GSH y disminuía las concentraciones de cistina en ratones rd1 (Miranda et al., 2010).

4. La nilvadipina (antagonista de los canales de calcio) (Nakazawa et al., 2011) o el ácido clorogénico (Shin and Yu, 2014) parecen tener efectos beneficiosos al retrasar la pérdida del campo visual en pacientes con RP. A su vez también se está estudiando el efecto del DHA aunque, por el momento, no parece mejorar el estado antioxidante en sangre periférica de pacientes con RP (Hughbanks-Wheaton et al., 2014).

5. La N-acetilcisteína, un antioxidante biodisponible oralmente, ha sido empleado recientemente en los modelos de ratón rd1 (Lee et al., 2011b) y rd10 (Yoshida et al., 2013b). En el modelo rd10 estos autores demostraron que había una disminución de células marcadas con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP (TUNEL; terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) en los animales tratados con el antioxidante, con una reducción de la muerte celular que estaba asociada a una fuerte supresión de la expresión de diversas citoquinas, interleuquina (IL) 1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor alpha) y quimioquinas como las proteínas quimioatrayentes de monocitos 1 y la quimioquina reguladora de la activación del timo.

6. Otras aproximaciones se han realizado con estudios dirigidos a la modulación de la maquinaria antioxidante endógena. Por ejemplo, algunos autores han demostrado en un modelo de ratón transgénico con expresión inducible de la GPx tipo 4, que el aumento de su expresión conseguía proteger la estructura y función de los fotorreceptores (Lu et al., 2009). Usui y colaboradores han probado en ratones rd10, que el incremento simultáneo de la expresión de SOD2 y de catalasa en el mismo compartimento subcelular (mitocondria), reduce los radicales superóxido y el daño oxidativo en la retina (Usui et al., 2009a, Usui et al., 2011), mejorando la funcionalidad de los conos y reduciendo la muerte celular.

Estos estudios apoyan la hipótesis de la toxicidad por el oxígeno de la RP, sugiriendo que los marcadores de estrés oxidativo, así como las enzimas antioxidantes, pueden ser importantes dianas terapéuticas para la terapia neuroprotectora en la RP.

Sin embargo, es necesario destacar las desventajas que supone el uso de antioxidantes endógenos; por ejemplo la limitada penetrabilidad a través de la BHE y de

la BHR, el rápido metabolismo e inestabilidad del compuesto, la estrecha “ventana” terapéutica y el limitado rango de dosis para su uso terapéutico (Gilgun-Sherki et al., 2001, Rigg et al., 2005). A pesar de estas limitaciones, los antioxidantes naturales y modificados, son candidatos prometedores para su futuro uso en diferentes enfermedades en las que el estrés oxidativo tiene un papel importante.

### **5.7. Modelos animales en la retinosis pigmentaria**

El ratón (*Mus musculus*) es un buen modelo de vertebrado para estudios fisiológicos y patológicos en la retina, en especial gracias a la facilidad para generar animales transgénicos y mutantes para la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la muerte de los fotorreceptores. El desarrollo embrionario del ratón dura aproximadamente 20 días, dependiendo de la estirpe. Como mamífero que es, el ratón no nace totalmente maduro, sino que continúa su maduración a lo largo de las tres primeras semanas postnatales. La retina de los ratones presenta ciertas diferencias estructurales con respecto a la retina humana, como la ausencia de mácula o el menor porcentaje de conos.

Asimismo, se han propuesto modelos alternativos de mamíferos superiores como son modelos de RP autosómica dominante en cerdos transgénicos con una mutación en el gen de la rodopsina, la mutación P23H (Ross et al., 2012), perros *rcd1* (Suber et al., 1993, Tuntivanich et al., 2009) o gatos (May et al., 2005). No obstante, estos animales precisan de tiempos de experimentación más largos y de un mayor coste para su mantenimiento.

Por ello, la disponibilidad de modelos animales de ratón, primero espontáneos y luego experimentales ha posibilitado el empleo de los mismos como modelo de degeneración retiniana asociada a la RP. Se han empleado numerosos modelos de ratón con defectos en los genes causantes de algunas formas de RP como las mutaciones en el gen de la PDE6 $\beta$  (Baehr and Frederick, 2009, Pennesi et al., 2012) debido a que la degeneración selectiva de los fotorreceptores en estos ratones es similar a la que tiene lugar en la RP en humanos.

Keeler en 1924 describió la primera degeneración de retina en ratón (Keeler, 1924). Después se identificó la mutación que coincidía con la descripción de Keeler, era la mutación de degeneración de retina 1 (*rd1*; retinal degeneration 1) (Pittler et al., 1993) o PDE6 $\beta$ <sup>*rd1*</sup>. Este tipo de roedor ha sido empleado ampliamente como modelo de la enfermedad en humanos (Karli, 1952-1953, Sidman and Green, 1965, LaVail and Mullen,

1976, Farber et al., 1994) y constituye el modelo mejor caracterizado. La transmisión de la mutación en los ratones rd1 tiene carácter recesivo (Keeler, 1924) y se localiza en el cromosoma 5 del gen que codifica para la PDE6 $\beta$  (Sidman and Green, 1965). Dicha mutación da lugar a una severa y temprana degeneración de la retina. Su aparición es debida a la inserción de un virus murino que introdujo una mutación sin sentido en el exón 7 del gen (Pittler and Baehr, 1991, Bowes et al., 1993), dando lugar a un defecto en la PDE6 $\beta$  (Bowes et al., 1990, Pittler and Baehr, 1991, Chang et al., 2002). Se han descrito dos características resultantes de la mutación: una deficiencia en la actividad catalítica de la PDE6 $\beta$  y una subsiguiente acumulación del GMPc (Farber and Lolley, 1974, 1976, Beavo et al., 1994).

La mutación de la PDE6 $\beta$  también se encuentra en los humanos (OMIM 180072) y se ha relacionado con los casos de RP autosómica recesiva (McLaughlin et al., 1993, Danciger et al., 1995, McLaughlin et al., 1995, Wang et al., 2001) que suponen aproximadamente un 5% de los casos de RP en humanos (Danciger et al., 1995, McLaughlin et al., 1995).

Existen otras cepas de ratón que muestran una degeneración retiniana y anomalías en la secuencia del gen PDE6 $\beta$ , estas son el ratón con degeneración de retina 10 (rd10; retinal degeneration 10) o PDE6 $\beta$ <sup>rd10</sup> (Chang et al., 2002, Chang et al., 2007) y el ratón nmf137 o PDE6 $\beta$ <sup>nmf137</sup> (Chang et al., 2007) entre otras. Los dos fenotipos mutantes (rd10 y nmf137) se heredan como genes autosómicos recesivos. La mutación en los ratones rd10 también se localiza en el cromosoma 5, al igual que en los ratones rd1 y es causada por una mutación de sentido erróneo en el exón 13 del gen de la PDE6 $\beta$ , mientras que en los ratones nmf137 la misma mutación tiene lugar en el exón 16 (Chang et al., 2007).

La degeneración de los fotorreceptores sucede de forma distinta en el ratón rd1 y rd10. En el modelo rd1 se ha demostrado una rápida degeneración que se inicia en el momento o un poco antes de que se formen los segmentos externos de los fotorreceptores (Bennett et al., 1996, Jomary et al., 1997, Takahashi et al., 1999). El modelo de ratón rd10 simula mejor que el rd1 la progresión típica de una RP del tipo autosómica recesiva (Chang et al., 2002, Chang et al., 2007, Gargini et al., 2007) ya que la pérdida de células fotorreceptoras sucede después de la diferenciación terminal de la retina. La tasa de pérdida de fotorreceptores es más lenta que la observada en la retina de los ratones rd1. Esto es debido a que la degeneración retiniana en el modelo de ratón rd10 no está causada por la ausencia de la proteína PDE6 $\beta$  sino a una expresión insuficiente y/o baja actividad de esta unidad enzimática, lo que podría dar lugar a un

acúmulo de GMPc, de forma más lenta pero similar a la encontrada en la retina de los ratones rd1, con la eventual muerte celular. Por ello, el ratón rd10 puede proporcionar un mejor modelo para estudiar la patogénesis de la RP autosómica recesiva así como para la terapia experimental con fármacos, debido a su inicio más tardío y una degeneración más “suave”, comparado con los modelos rd1 y nmf137 (Chang et al., 2007).

Las mutaciones en los modelos de ratón de rd1 y rd10 mimetizan ciertos rasgos del fenotipo clínico de la RP autosómica recesiva encontrada en humanos con mutaciones en la PDE6 $\beta$ . Sin embargo, los descubrimientos puede que no sean ampliamente aplicables a la enfermedad en humanos (Buch et al., 2008).

Actualmente, como alternativa al empleo de animales *in vivo* se han planteado modelos *ex vivo* para la RP (Lipinski et al., 2011, Fernandez-Bueno et al., 2012) e *in vitro* (Carmody and Cotter, 2000, Kaempfer et al., 2008).

## 6. Esteroides y neuroprotección

Los esteroides son un grupo de compuestos relacionados estructuralmente y ampliamente distribuidos en animales y plantas. Ejemplos de esteroides son la vitamina D, el colesterol, las hormonas sexuales como el estradiol, la progesterona (P4) y la testosterona entre otras.

Durante la última década se han encontrado evidencias significativas en referencia a las acciones neuroprotectoras que juegan los esteroides tales como la dehidroepiandrosterona (DHEA); la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), los lazaroides (aminoesteroides), la progesterona (pregn-4-ene-3, 20-diona), la testosterona y el estradiol (Schumacher et al., 2000, Garcia-Segura et al., 2001, Stein, 2001, Wise et al., 2001, McEwen, 2002, Gahm et al., 2005). Se ha demostrado que los esteroides pueden prevenir la muerte celular desencadenada por diferentes estímulos incluyendo la excitotoxicidad y cambios en el ambiente esteroideo que pueden influenciar el destino neuronal en varios desórdenes neurológicos y mentales (Guarneri et al., 2003).

Los estrógenos previenen o retrasan el inicio de la enfermedad del Alzheimer y el déficit cognitivo (Garcia-Segura et al., 2001, Wise et al., 2001) y la síntesis local de P4 promueve la formación de mielina durante los procesos regenerativos después de un daño en los nervios periféricos (Schumacher et al., 2000).

*In vitro*, los estrógenos protegen a las neuronas contra insultos inducidos por el glutamato (Sribnick et al., 2004), la privación de glucosa o el péptido beta amiloide (Yao

et al., 2007). Otros estudios sugieren que los esteroides de tipo estrogénico pueden suprimir la activación de la microglía, un efecto que podría ayudar a mediar la neuroprotección por estrógenos (Mor et al., 1999), de forma que dicha neuroprotección puede suprimir las reacciones inflamatorias (Liu et al., 2010) y disminuir el estrés oxidativo modulando el GSH y las enzimas con capacidad antioxidante como la SOD y la catalasa (Sayeed et al., 2007).

Otros estudios han demostrado que el estradiol o 17 $\beta$ -estradiol (estrógeno predominante en la vida fértil de la mujer) protege contra la muerte celular tras la privación de oxígeno y glucosa en cultivos primarios, y que la protección por parte de los estrógenos es dosis-dependiente (Takao et al., 2004, Gerstner et al., 2009).

En los últimos años se está dando importancia a los estrógenos en algunas formas de degeneración primaria y secundaria de la retina. Se cree que estos esteroides juegan un papel, según la edad y el sexo, en enfermedades oculares y en prevenir el daño en la retina por isquemia-reperfusión (Sator et al., 1997, Ogueta et al., 1999, Nonaka et al., 2000, Wickham et al., 2000, Munaut et al., 2001). El DHEA, DHEAS, P4 y 17 $\beta$ -estradiol protegen contra la excitotoxicidad de la retina (Cascio et al., 2000, 2002). La administración de P4 vía intraperitoneal protege la CNV y las fibras nerviosas en un modelo de isquemia retiniana en ratas (Lu et al., 2008a). Sin embargo, ni la administración de 60 mg/kg ni una dosis diaria de P4 (2,5 mg/día) protegía los fotorreceptores de la muerte celular en modelos de daño por luz en ratas (O'Steen, 1977, Kaldi and Berta, 2004). Por el contrario, otros estudios han demostrado que la administración de norgestrel (progestágeno o progestina sintética que tiene efectos similares a la P4 usada en anticonceptivos hormonales) protege a los fotorreceptores en modelos de daño por luz en ratón o en un modelo de degeneración retiniana como es el ratón rd10 (Doonan et al., 2011, Doonan and Cotter, 2012).

Con todo ello, en la presente tesis se plantea el uso de P4 como posible tratamiento antioxidante y neuroprotector frente a la RP en el modelo de ratón rd10.

### **6.1. Neuroesteroides y progesterona**

Baulieu y colaboradores acuñaron el término neuroesteroides para referirse a aquellos esteroides capaces de ser sintetizados en el SNC y de afectar a la neurotransmisión (Baulieu et al., 1996), aunque los neuroesteroides también se pueden sintetizar en el sistema nervioso periférico. Los neuroesteroides incluyen tanto hormonas esteroideas, las cuales son sintetizadas de *novo* en las neuronas y las células gliales,

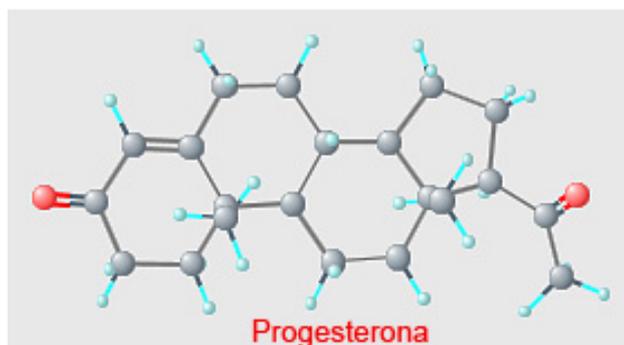
como a sus metabolitos que actúan en el SNC (Compagnone and Mellon, 2000, Baulieu et al., 2001).

Existen evidencias que sugieren una estrecha relación entre la disponibilidad de los esteroides y la susceptibilidad neuronal, la tasa de ataques de epilepsia, el daño traumático o isquémico, la enfermedad del Alzheimer y también la probabilidad de envejecimiento cognitivo (Garcia-Segura et al., 2001, Stein, 2001, Wise et al., 2001, McEwen, 2002, Stein et al., 2008), además de su relación con algunas enfermedades oculares como la DMAE y la isquemia en la retina (Ogueta et al., 1999, Nonaka et al., 2000, Wickham et al., 2000, Munaut et al., 2001).

### 6.1.1. Síntesis de progesterona

La progesterona se sintetiza durante la fase lútea del ciclo menstrual en las mujeres, mientras que durante el embarazo es producida principalmente por la placenta (Arensburg et al., 1999, Tuckey, 2005). Es por ello que es una hormona que es sintetizada primariamente en el ovario de las mujeres aunque también está presente en los hombres en la corteza adrenal y en los testículos (Singh and Su, 2013).

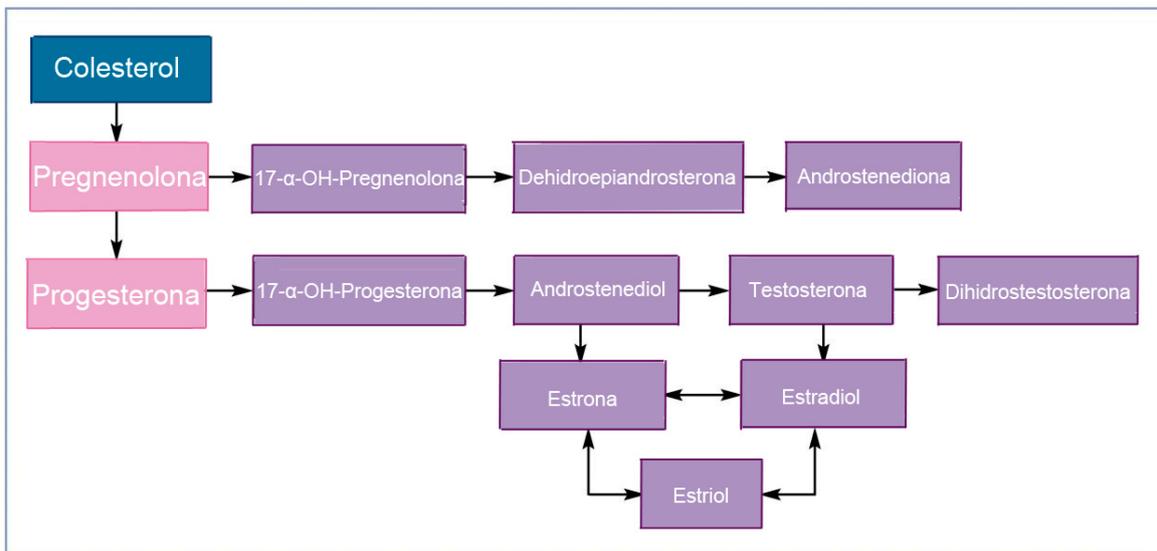
Los neuroesteroides son hormonas esteroideas que se sintetizan a partir de un mismo precursor, el colesterol (Rupprecht et al., 1996); también se pueden sintetizar *in situ* a partir del metabolismo de los precursores transportados por la sangre (Baulieu, 1997). Uno de estos neuroesteroides, la P4 es una hormona esteroidea de 21 carbonos (Figura 18), cuya biosíntesis comprende un proceso con múltiples pasos (Garcia-Segura and Melcangi, 2006) (Figuras 19 y 20).



**Figura 18.** Estructura tridimensional de la progesterona. Adaptado de Ncbi web (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>).

En el SNC, el primer paso en la síntesis de todas las hormonas esteroideas es la síntesis de pregnenolona (PREG) a partir del colesterol, que es transformado en

diferentes productos esteroideos a través de diversas reacciones enzimáticas (Le Goascogne et al., 1987, Baulieu, 1997, Miller and Auchus, 2011, Li et al., 2014). La PREG se convertirá en P4 mediante dos reacciones catalizadas por la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) (Cherradi et al., 1995) (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema de la síntesis de la progesterona y otros neuroesteroides. Se detalla por colores: en azul el precursor de la síntesis de los neuroesteroides, el colesterol, en rosa la vía de síntesis de la progesterona y en morado el resto de hormonas esteroideas. Adaptado de Cekic & Conaway (Cekic et al., 2009, Conaway, 2011).

La retina también es capaz de transformar el colesterol en PREG, progestágenos, corticosteroides y esteroides sexuales ya que se la considera como una auténtica estructura esteroidogénica dentro del SNC, en la que la síntesis de esteroides se integra en sus circuitos con un posible papel en la función visual (Guarneri et al., 2003). Se ha demostrado en diversos trabajos que la retina aparte de recibir el aporte por parte de la circulación sanguínea, es capaz de sintetizar colesterol (Fliesler et al., 1993, Fliesler and Keller, 1995) ya que la retina requiere de la biosíntesis endógena del colesterol para su correcta estructura y funcionamiento. En ratas adultas, se ha demostrado que el colesterol es usado para la esteroidogénesis. La transformación del colesterol en PREG parece ser que sucede en las células ganglionares y las células amacrinas, donde se localiza el citocromo p450<sub>scc</sub> de las mitocondrias (Guarneri et al., 1994), que se encarga de la conversión del colesterol a PREG.

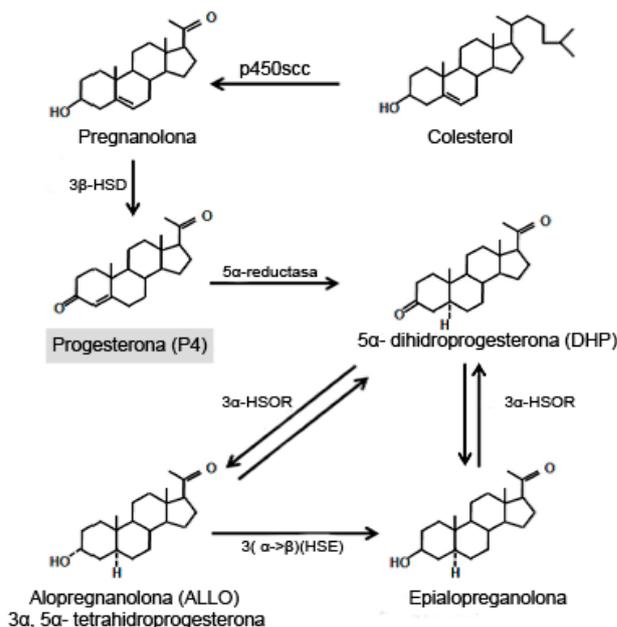
En los nervios periféricos del cerebro, el citocromo p450<sub>scc</sub> se expresa principalmente en las células de glía (Baulieu, 1997). Además de ser una fuente de P4 las células gliales también son diana de moléculas esteroideas como esta (Feesser and Loria, 2011), de modo que diversos estudios han demostrado la importancia de las células de glía como diana para las acciones anti-inflamatorias y neuroprotectoras de la

P4 (Cekic et al., 2009, De Nicola et al., 2009, Kipp and Beyer, 2009). Sin embargo, en la retina, las células de Purkinje del cerebelo y las neuronas del hipocampo, el citocromo p450scc no se expresará principalmente en la glía pues disponen de una síntesis de PREG neuronal (Compagnone and Mellon, 2000).

### 6.1.2. Metabolismo de la progesterona

Diversos autores destacan el importante papel de la P4 y sus metabolitos para el desarrollo normal y reparación del SNC (McCullough and Hurn, 2003, Gibson et al., 2008, Stein et al., 2008, Stein and Hurn, 2009, Liu et al., 2010, Stein and Wright, 2010, Junpeng et al., 2011). Se cree que algunos de los efectos de la P4 en el SNC, incluyendo sus acciones neuroprotectora y psicofarmacológica, son mediados por sus metabolitos neuroactivos y en particular por la alopregnanolona (ALLO) (Griffin et al., 2004, Belelli and Lambert, 2005, Sayeed et al., 2006, Wang et al., 2008).

La progesterona es rápidamente metabolizada en el cerebro a 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona (DHP) (Figura 20) y más tarde tras la acción de las enzimas 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidoreductasas (3 $\alpha$ -HSORs) es reducida a ALLO (Celotti et al., 1992, Guarneri et al., 1998, Mellon and Vaudry, 2001, Stoffel-Wagner, 2001, Belelli and Lambert, 2005, Rone et al., 2009, Gunn et al., 2011). Sin embargo, las 3 $\alpha$ -HSORs pueden actuar de manera reversible, de forma que la ALLO puede volver a convertirse en DHP (Belelli and Lambert, 2005). El otro metabolito de la P4 es la epialopregnanolona, que tiene funciones inhibitoras del ácido gamma aminobutírico A (GABA; gamma aminobutyric acid) (Backstrom et al., 2005, Belelli and Lambert, 2005).



El colesterol es convertido a pregnanolona por el citocromo p450scc.

La enzima 3 $\beta$ -HSD convertirá la pregnanolona a progesterona. La acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa dará lugar a la 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona.

Las actividades enzimáticas 3 $\alpha$ -HSORs se encargan de la transformación de la dihidroprogesterona en alopregnanolona o epialopregnanolona.

La 3( $\alpha$ -> $\beta$ ) hidroxiesteroide epimerasa (HSE) cataliza la epimerización de alopregnanolona a epialopregnanolona.

**Figura 20.** Metabolismo de la progesterona. Adaptado de Schumacher (Schumacher et al., 2012).

Se ha visto que de forma natural la síntesis de ALLO está aumentada en el SNC tras un estrés metabólico (Izumi et al., 2013, Tokuda et al., 2013) o comportamental (Purdy et al., 1991). Es por ello, que podría ser de importancia encontrar un posible tratamiento dirigido a aumentar la cantidad de estos metabolitos neuroprotectores ante una situación de estrés celular patológica. De este modo, se plantea que la ALLO puede ser un mediador clave de las respuestas al estrés neuronal y puede servir para restaurar los mecanismos homeostáticos interrumpidos por estrés agudo (Crawley et al., 1986, Vallee et al., 2000). Aunque se desconoce de qué forma el estrés agudo promueve la neurosteroidogénesis, varias vías de señalización pueden estar implicadas (Do Rego et al., 2012, Izumi et al., 2013).

Se ha postulado que el efecto de la ALLO se produce por su acción sobre el ligando para el receptor de GABA<sub>A</sub> y algunas de sus isoformas (Frye, 2008, Reddy and Rogawski, 2009). Además, se ha sugerido que la ALLO y la P4 pueden actuar a través de diferentes receptores (Stein, 2011). Sin embargo, existen numerosas evidencias de que dependiendo de la dosis y tiempo de administración estos mismos tratamientos con P4 y ALLO pueden ser capaces de resultar beneficiosos o tener síntomas negativos en personas que son tratadas con ellos en desórdenes del tipo de la ansiedad y la depresión (Turkmen et al., 2011).

El descubrimiento de la desregulación de la ALLO en varios desórdenes neurológicos ha supuesto que dicho metabolito y sus análogos sintéticos hayan sido considerados por su potencial terapéutico (Brinton, 2013).

### **6.1.3. Biodisponibilidad y toxicidad de la progesterona**

La P4 es una hormona natural que se une a receptores específicos para inducir efectos gestacionales también específicos. Como resultado de esta unión entre la P4 y su receptor, esta será capaz de interferir con los sitios de unión de otros esteroides. Por lo tanto, la hormona natural presenta actividad antiestrogénica, antiandrogénica y también antimineralocorticoide.

En las últimas décadas, se han estado usando de forma amplia en diversos países los progestágenos o progestinas, compuestos con efectos similares a la P4. Estos compuestos se han empleado dirigidos a tratar desórdenes menstruales en mujeres premenopáusicas, enfermedades benignas de ovarios, útero y mama, así como también han sido empleados como anticonceptivos (Lowy and Weisz, 2005). No obstante, en los últimos años se está empleando de forma extensa, la combinación de estrógenos y P4 como terapia de reemplazo hormonal.

Es de gran importancia conocer la biodisponibilidad y toxicidad de la P4 y sus derivados sintéticos. La P4 natural puede ser inactivada rápidamente cuando es administrada por vía oral, debido al amplio metabolismo hepático e intestinal que presenta la molécula, estimándose su biodisponibilidad por vía oral en aproximadamente un 25% (Orizaba-Chávez et al., 2013). Este es uno de los principales motivos por el que los derivados sintéticos fueron desarrollados, para mejorar su biodisponibilidad en los tejidos. No obstante, su biodisponibilidad mejora notablemente si se trata de P4 micronizada en combinación con un vehículo lipofílico. Además, se sabe que la ingestión con los alimentos aumenta su absorción. Benítez y colaboradores establecieron que el pico de absorción de P4 micronizada, se encontraba alrededor de las 3 horas para una dosis de 200 mg. No obstante, hay diferencias en la capacidad de absorción de todos los individuos que podrían deberse a un porcentaje variable de absorción, aclaramiento y diferente distribución en el tejido graso (Benítez et al., 2001). Resultados similares fueron obtenidos por Andreen y colaboradores en su estudio de la farmacocinética de la P4, estableciendo también una media de 3 horas para su pico de absorción máxima (Andreen et al., 2006).

El mecanismo de acción de la P4 es similar al de todos los esteroides a nivel celular. Para su transporte por vía sanguínea, la P4 se une a una globulina transportadora y una vez en las células diana se acopla al receptor celular, desencadenando un estímulo en el mecanismo de cascada de la fosforilación y formando un complejo hormona-receptor. Este complejo activa los receptores nucleares de la adenilciclase nuclear, produciendo una defosforilación y translocación a nivel nuclear, modificando las proteínas del ADN con activación de la ARN polimerasa, lo cual inicia el fenómeno de transcripción produciendo la respuesta deseada (Daniel et al., 2010, Rekawiecki et al., 2011).

La mayor parte de la P4 y sus metabolitos que alcanzan la circulación general son excretados por los riñones. La segunda vía más importante de excreción es la biliar y las heces.

La dosis letal 50 (DL50) en rata es de 5.000 mg/kg oral (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Y la dosis terapéutica utilizada en la mujer (tomando como ejemplo cápsulas de 100 mg/día) es 50 veces inferior a la dosis tóxica (toxicidad aguda) (1.500 mg) (Orizaba-Chávez et al., 2013).

En cuanto a su toxicidad, el informe sobre carcinógenos emitido por el departamento de salud de los Estados Unidos, lo incluye dentro de los compuestos que

pueden ser carcinógenos (Burwell, 2014). Estudios como el de Fabre y colaboradores en el año 2007 estudiaron el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres premenopáusicas mayores de 40 años que tomaron progestágenos de forma oral. Estos autores observaron una correlación significativa entre el riesgo de padecer este tipo de cáncer y la duración del tratamiento con P4 partir de los 4-5 años (Fabre et al., 2007). Sin embargo, existen resultados contradictorios respecto del empleo de la P4, pues algunos autores sugieren que las progestinas tienen tanto efectos inhibitorios como estimuladores en las células en el cáncer de mama (Musgrove et al., 1991). Además, distintos progestágenos pueden tener un riesgo diferente (Pasqualini et al., 1998). A su vez, los estudios epidemiológicos han dado lugar a resultados poco consistentes y a esto se suma el hecho de que la terapia de reemplazo hormonal con P4 y diversos esteroides ha mejorado la supervivencia en mujeres con cáncer de mama (Eden, 2003).

#### 6.1.4. Funciones de la progesterona

Los neuroesteroides actúan en el SNC de forma autocrina/paracrina (Plassart-Schiess and Baulieu, 2001, Schumacher et al., 2012), pudiendo regular la expresión génica o afectar a la neurotransmisión (Mellon et al., 2001, Plassart-Schiess and Baulieu, 2001). Además, poseen otras funciones biológicas en el SNC como la regulación de la neuroprotección, neuroplasticidad, neurogénesis y neuroinflamación (Petersen et al., 2013, Lei et al., 2014).

Parece ser que la P4 actúa a múltiples niveles para interrumpir o enlentecer procesos celulares destructivos, disminuyendo la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, limitando la liberación de citoquinas inflamatorias y disminuyendo la apoptosis celular (Stein et al., 2008, Stein, 2011), etc (Tabla 2). Además, se sabe que la P4 tiene efecto contra la toxicidad del glutamato en neuronas primarias del hipocampo vía activación de ERK1/2 (Nilsen and Brinton, 2002, 2003).

<b><u>Principales efectos de la administración de progesterona</u></b>	
o	Neuroprotección: aumento de la supervivencia y proliferación celular
o	Atenuación apoptosis: acción en genes antiapoptóticos como el Bcl-2
o	Modulación receptores GABA <sub>A</sub>
o	Antioxidante: neutralización radicales libres mediante diferentes mecanismos
o	Antiinflamatorio: supresión de citoquinas proinflamatorias y reducción de gliosis

**Tabla 2.** Principales efectos de la administración de progesterona como terapia neuroprotectora.

Se detallan a continuación los principales efectos de la administración de P4 citados previamente en la tabla número 2:

#### **6.1.4.1. Neuroprotección**

Se han descrito numerosas funciones que tienen que ver con la neuroprotección y la P4 en el SNC. Diversos autores sugieren que la P4 promueve la supervivencia celular y la proliferación, además de tener efectos paliativos y de regresión de la enfermedad en tejido no neural (Rider and Psychoyos, 1994, Makrigrannakis et al., 2000, Svensson et al., 2000, Olive and Pritts, 2001, Lange, 2008).

Diversos autores han demostrado los efectos beneficiosos de la P4 en el daño cerebral traumático (TBI, Traumatic brain injury) tanto en roedores como en humanos (Xiao et al., 2008, Baykara et al., 2013), así como en estudios de daño en médula espinal (Labombarda et al., 2009), modelos experimentales de encefalomiélitis autoinmune (Yates et al., 2010) o en la enfermedad del Alzheimer (Carroll et al., 2010) entre otras condiciones patológicas.

Sin embargo, existen estudios en los que la terapia con P4 exógena se plantea como inefectiva en términos de neuroprotección, como por ejemplo, casos en que la administración crónica de P4 ha exacerbado el daño del cuerpo estriado por derrame cerebral (Murphy et al., 2000).

#### **6.1.4.2. Disminución de apoptosis**

Se sabe que la P4 induce la expresión de genes antiapoptóticos como el Bcl-2 (Yin et al., 2007) y reduce la apoptosis neuronal (He et al., 2004, Shahrokhi et al., 2010). El NF- $\kappa$ B se ha relacionado con el inicio de la inflamación neuronal, la necrosis y la apoptosis después de un TBI (Stein, 2008, Stein et al., 2008). La P4 reduce tanto la concentración nuclear del NF- $\kappa$ B como su expresión. Se ha demostrado que después del tratamiento con P4, el ARN mitocondrial y las proteínas para los factores de regulación inflamatoria del NF- $\kappa$ B como la IL-1 $\beta$ , C3, iNOS y ciclooxigenasa-2 están significativamente reducidos (Djebaili et al., 2004, He et al., 2004, Djebaili et al., 2005, Pettus et al., 2005, Cutler et al., 2006, Stein et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que la P4 protege frente a la apoptosis por unión a diferentes tipos de receptores (Friberg et al., 2009, Peluso et al., 2009).

#### **6.1.4.3. Modulación de los receptores GABA<sub>A</sub>**

Actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios en los que la ALLO, el mayor metabolito de la P4, podría ser el causante de algunos de los efectos neuroprotectores de la P4 (Ciriza et al., 2004).

Uno de los mecanismos que se han estudiado es el efecto que la ALLO puede ejercer a través de su interacción con los receptores GABA<sub>A</sub> (Deutsch et al., 1992). Se ha confirmado que la isquemia puede causar en la reperusión una desregulación de los receptores GABA<sub>A</sub> que es prevenida por la ALLO (Kelley et al., 2008).

En conjunto, los diferentes estudios confirman que la P4 es protectora y tal protección puede ser promovida por múltiples mecanismos (Singh and Su, 2013).

#### **6.1.4.4. Antioxidante**

A pesar de que la P4 no tiene una estructura química característica de molécula antioxidante, reduce el daño inducido por radicales libres (Roof et al., 1996, Roof et al., 1997, Pajovic et al., 1999, Roof and Hall, 2000). A su vez, existen estudios que han demostrado que la P4 aumenta la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD (Pajovic et al., 1996).

Además, se ha podido observar que la administración de P4 tiene efectos beneficiosos, al reducir de una forma dosis-dependiente, una de las alteraciones celulares derivadas del daño oxidativo, como es la peroxidación lipídica, en diferentes sistemas *in vitro* que generan radicales libres (Sugino et al., 1996, Vedder et al., 1999) e *in vivo* (Roof et al., 1997, Ozacmak and Sayan, 2009). Todos estos estudios sugieren que la P4 reduce la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, probablemente a través de la disminución de la generación de radicales libres e intensificando los sistemas endógenos de neutralización de estos radicales (Stein et al., 2008).

#### **6.1.4.5. Antiinflamatorio**

Existen numerosos estudios que demuestran el papel antiinflamatorio de la P4 (Pan et al., 2007, Chen et al., 2008a, Stein et al., 2008, Anderson et al., 2011, Sarkaki et al., 2013). En particular, se ha observado que la P4 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 et al., 2005) y TNF- $\alpha$  (Aggarwal et al., 2008). Además, la P4 puede disminuir la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS; inducible nitric oxide synthase) *in vivo* (Coughlan et al., 2005,

Gibson et al., 2005) y también *in vitro* (Coughlan et al., 2005, Muller and Kerschbaum, 2006). A su vez, existen estudios que han demostrado una disminución de la gliosis gracias a la acción de la P4 (Djebaili et al., 2004, He et al., 2004, Djebaili et al., 2005).

Se ha demostrado que la P4 puede reducir la inflamación en tejidos distintos al SNC. La P4 puede reducir la inflamación en corazón, hígado, bazo e intestino (Chen et al., 2007, Chen et al., 2008b, Jiang et al., 2009), mostrando el mismo efecto protector y antiinflamatorio en enfermedades inmunes como la encefalomiелitis autoinmune (Garay et al., 2007).

## 6.2. La progesterona en la retina

Al igual que sucede con el cerebro, la retina es una diana de acción de esteroides pero también de su síntesis (Guarneri et al., 1994).

Estudios recientes han demostrado la existencia de receptores de hormonas y enzimas esteroideas para la formación de esteroides *ex novo* o neuroesteroides. Además, se ha probado la implicación de estos neuroesteroides en la fisiología y patología de la función visual (Guarneri et al., 2003, Cascio et al., 2007).

Las evidencias confirman que hay neurosteroidogénesis en la retina, particularmente la producción de *nov*o de pregnenolona (Guarneri et al., 1994). En la retina y en la coroides se ha identificado el ARNm del receptor nuclear de la P4 (Wickham et al., 2000) mientras que el componente 1 del receptor de P4 asociado a membrana se ha identificado en los fotorreceptores y en las células de Müller (Swiatek-De Lange et al., 2007).

Existe controversia sobre los efectos beneficiosos de la P4 en las enfermedades retinianas. Algunos estudios en la retina no han conseguido demostrar los efectos beneficiosos de la P4, por ejemplo en un modelo de daño en células ganglionares de retina (Nakazawa et al., 2006), así como en otros estudios que intentaban demostrar sus efectos protectores contra el estrés inducido por luz (O'Steen, 1977, Kaldi and Berta, 2004). Por el contrario, Lu y colaboradores encontraron el efecto beneficioso de la P4 en un modelo de presión intraocular en ratas (Lu et al., 2008a).

Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero esencial que media múltiples respuestas celulares a varios estímulos celulares en las neuronas, incluyendo la proliferación celular, neurotransmisión y muerte celular (Berridge et al., 2000, Berridge et al., 2003). Un estrecho control de la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto espacial como temporal,

posibilita a las neuronas llevar a cabo dichas tareas de una forma apropiada. La P4 está implicada en múltiples procesos en las neuronas, incluyendo la neuroprotección (Roof et al., 1994, Asbury et al., 1998, Nilsen and Brinton, 2002, Nilsen and Diaz Brinton, 2003, Kaur et al., 2007) y hay una creciente evidencia de que en modelos de células no neurales la P4 está implicada en la señalización intracelular de  $Ca^{2+}$  (Wasserman et al., 1980, Kirkman-Brown et al., 2000).

Por lo que a los modelos de degeneración retiniana se refiere, la literatura apoya fuertemente una aproximación terapéutica con antioxidantes en modelos rd (Komeima et al., 2007, Usui et al., 2009a, Miranda et al., 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos de las hormonas esteroideas en la progresión de las enfermedades de la retina y sobre su posible papel antioxidante en la misma.

No obstante, los resultados están siendo bastante prometedores, pues estudios recientes en modelos de ratón de degeneración retiniana como es el ratón rd10, han demostrado que la apoptosis y la muerte celular se retrasan y las vías endógenas de supervivencia se activan en respuesta al norgestrel (progestina empleada en anticonceptivos hormonales) (Doonan et al., 2011). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente en el ratón rd1 la protección ejercida por la P4 a través de diversos mecanismos, entre ellos el de defensa antioxidante (Sánchez-Vallejo et al., 2015).

### **6.3. Situación actual de tratamientos neuroprotectores con progesterona**

La progesterona reúne los requisitos inicialmente propuestos por la mesa redonda académica de la industria para la terapia del ictus (STAIR; stroke therapy academic industry roundtable), para estudios preclínicos en TBI y en el derrame cerebral y también cumple varios criterios para el tratamiento del daño en médula espinal, daño en nervios periféricos, enfermedad motoneuronal, enfermedad desmielinizante y ataques epilépticos (Deutsch et al., 2013).

Se ha estudiado el efecto de la P4 en ensayos clínicos en humanos y se ha demostrado su seguridad y eficacia en estos ensayos (Feaser and Loria, 2011). Sin embargo, debido a la escasez de estudios de investigación básica oftalmológica con tratamientos con P4, ninguno de estos ensayos se ha llevado a cabo para hacer frente a las degeneraciones en la retina. Los resultados han sido satisfactorios en estudios de fase II para el uso de la P4 en TBI de moderado a severo (PROTECT II; Progesterone for Traumatic Brain Injury, Experimental Clinical Trial II) (Wright et al., 2007, Xiao et al., 2008, Stein, 2011, Aminmansour et al., 2012).

Además, también se han realizado ensayos clínicos en fase III, el PROTECT III en EE.UU. (NCT00822900), empleando P4 para tratar el TBI, cuyas conclusiones han sido la obtención de resultados de poca utilidad debido a las limitaciones del estudio (pocos participantes y problemas técnicos). Así como también estudios a nivel de la empresa privada como es el SYNAPSE (Study of the Neuroprotective Activity of Progesterone in Severe Traumatic Brain Injuries) (NCT01143064) (Stein, 2013), con resultados que no han sido publicados. También se está usando la P4 en ensayos clínicos de fase I/II con niños con daño cerebral (Stein, 2011).

La razón principal para el uso de P4 como potencial tratamiento para el derrame cerebral son la seguridad y las evidencias de su eficacia en ensayos con animales y humanos (Stein, 2011). Si los resultados de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo son satisfactorios, la P4 será el primer tratamiento de éxito para el TBI de moderado a severo, de manera que también abrirá la puerta a estudios en el uso de la P4 en otras enfermedades neurológicas (Deutsch et al., 2013).



# HIPÓTESIS

---



Las hipótesis que se proponen en este trabajo son las siguientes:

**Hipótesis 1.**

El uso de la progesterona, aplicado como tratamiento preventivo frente a la degeneración retiniana en ratones rd10, es capaz de aumentar la capacidad de supervivencia celular en el momento de la degeneración, pudiendo enlentecer los efectos derivados de esta.

**Hipótesis 2.**

La administración de progesterona en el modelo de ratón rd10 modula diversos efectos característicos de la degeneración, como son la apoptosis, peroxidación lipídica, alteración del equilibrio GSH/GSSG y gliosis reactiva.



## **OBJETIVOS**

---



Por todo ello, en el presente trabajo se plantean cuatro objetivos:

1. Caracterizar la progresión de la degeneración retiniana en el modelo de ratón rd10, a nivel histológico y de muerte celular.
2. Determinar *in vivo* la dosis más efectiva de progesterona como posible tratamiento frente a la degeneración histológica y muerte celular en la retina de ratones rd10.
3. Analizar *in vivo* el posible efecto neuroprotector de la progesterona en la retina de ratones rd10 tras la administración oral de la dosis más efectiva de progesterona a diferentes días post natales para estudiar el posible mecanismo de acción por el que la progesterona tiene un efecto neuroprotector.
4. Evaluar el efecto *in vitro* y *ex vivo* de la progesterona en situación de estrés oxidativo inducido en células ARPE-19 y en tejido celular respectivamente.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **1. Tratamiento y manejo de los animales de experimentación**

Para los estudios *in vivo* se emplearon ratones rd10 y C57BL/6J empleados como controles de los anteriores, ambos donación de la Universidad de Alicante.

### **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 al agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan Ibérica S.L. (Barcelona, España).

### **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.

El día del nacimiento fue considerado como día post-natal 0 (PN0). Las crías fueron sacrificadas por decapitación para los ensayos en que las crías tenían menos de 15 días o fueron decapitadas tras exponerlas a una cámara de CO<sub>2</sub> a partir del día PN15.

## **2. Diseño experimental**

### **2.1. Caracterización histológica y muerte celular en un modelo de ratón rd10**

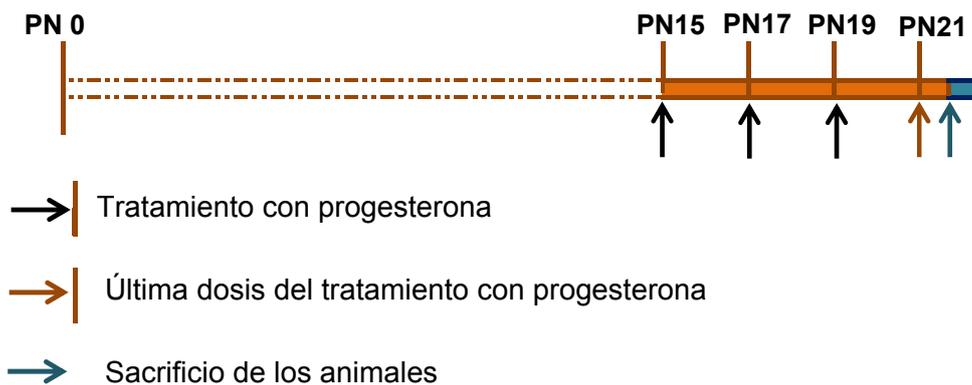
De forma general, estudios previos han detectado que la degeneración de los fotorreceptores en la retina de los ratones rd10 se produce de forma drástica entre los días PN20 a PN25, cuando tiene lugar el pico de muerte celular (Gargini et al., 2007).

Con la finalidad de caracterizar la degeneración histológica de la retina y la muerte de los fotorreceptores que tienen lugar en nuestro modelo de ratón rd10, se realizó la caracterización de la degeneración mediante la tinción de hematoxilina-eosina (HE) y la técnica de marcaje con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP (TUNEL; terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling).

Para ello se recogieron muestras de ojos de ratón de las cepas C57BL/6J y rd10 a los días PN5, PN13 y PN21, con una n de al menos 3 y se realizaron las técnicas citadas con anterioridad.

### **2.2. Tratamiento con progesterona**

El día del nacimiento fue considerado el día PN0. De este modo, se eligió el día PN15 como el día de inicio para el tratamiento con progesterona (P4) a diferentes dosis, esta se administró en días alternos únicamente a los ratones del modelo rd10, siendo el día PN21 el último día del tratamiento, y procediéndose al sacrificio de los ratones 5 horas después de la última administración de P4 (Figura 21). Las diferentes dosis de P4 que se administraron a los ratones rd10 fueron las siguientes: 50 mg/kg (n=7), 100 mg/kg (n=6), 150 mg/kg (n=7) y 200 mg/kg (n=6) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), diluida en aceite de oliva y se compararon los resultados obtenidos del estudio histológico con HE, con los valores del mismo estudio para ratones rd10 sin tratar (n=7). De este modo, se determinó la dosis más efectiva de P4 con la que proseguir el proyecto.



**Figura 21.** Diseño experimental para el tratamiento con progesterona de los ratones rd10 y C57. Se indican con flechas los días a los que se da el tratamiento a los ratones, la última dosis de progesterona y el día de sacrificio de los animales.

Una vez determinada la dosis más efectiva (150 mg/kg) se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1; C57: los ratones C57BL/6J fueron tratados en días alternos con un vehículo de aceite de oliva oral. El primer día del tratamiento fue el día PN15 y los ratones fueron sacrificados el día PN21. Los animales se distribuyeron de la siguiente manera: para el estudio histológico y de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=6. Para el estudio de inmunofluorescencia se usó una n=4 y se empleó una n de al menos 4 para los estudios de western blot (WB) a día PN21. Además, se utilizó una n=3 en el estudio de la proteína iNOS por WB que se realizó también a PN13 y PN18, aparte del correspondiente estudio a PN21. A su vez, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP también a día PN23 (n=4), dos días tras el fin del tratamiento con P4, para el estudio de la evolución del marcaje de GFAP. Finalmente, para el estudio bioquímico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; High pressure liquid Chromatography) se utilizó una n=5 para la determinación del glutatión (GSH), disulfuro de glutatión (GSSG) y glutamato y para la determinación del malondialdehído (MDA) se empleó una n=6.

- Grupo 2; C57 tratado: se administró oralmente una dosis de P4 de 150 mg/kg diluida en aceite de oliva, a ratones C57BL/6J. El tratamiento se dio en días alternos, el primer día del tratamiento fue el día PN15 y los ratones fueron sacrificados el día PN21. Los animales se distribuyeron de la siguiente manera: para el estudio histológico y de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=6. Para el estudio de

inmunofluorescencia se usó una n=4 y para los estudios de WB se empleó una n de al menos 4. Además, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP a día PN23 (n=4), dos días tras el fin del tratamiento con P4, para el estudio de la evolución del marcaje de GFAP. Finalmente, para el estudio bioquímico por HPLC se utilizó una n de al menos 6 para la determinación del GSH, GSSG y glutamato y se empleó una n=6 para la determinación del MDA.

- Grupo 3; rd10: los ratones rd10 fueron tratados en días alternos con un vehículo de aceite de oliva oral. El primer día del tratamiento fue el día PN15 y los ratones fueron sacrificados el día PN21. Los animales se distribuyeron de la siguiente manera: para el estudio histológico y de muerte celular (TUNEL) se utilizó una n=7. Para el estudio de inmunofluorescencia se usó una n=4 y se utilizó una n de al menos 4 para los estudios de WB a PN21. Además, se utilizó una n=3 en el estudio de la proteína iNOS por WB a PN13 y PN18, a parte del correspondiente estudio a día PN21. A su vez, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP a día PN23 (n=4), dos días tras el fin del tratamiento con P4, para el estudio de la evolución del marcaje GFAP. Finalmente, para el estudio bioquímico por HPLC se empleó una n de al menos 6 para el GSH, GSSG y glutamato y una n=7 para el MDA.

- Grupo 4; rd10 tratado: se administró de forma oral una dosis de P4 de 150 mg/kg diluida en aceite de oliva a ratones rd10. El tratamiento se dio en días alternos, el primer día del tratamiento fue el día PN15 y los ratones fueron sacrificados el día PN21. Para el estudio histológico se utilizó una n=7 y para el de muerte celular (TUNEL) se usó una n=5. Para el estudio de inmunofluorescencia se empleó una n=4 y para los estudios de WB se empleó una n de al menos 4. Además, se recogieron muestras para realizar la inmunofluorescencia de GFAP a día PN23 (n=4), dos días tras el fin del tratamiento con P4, para el estudio de la evolución del marcaje GFAP. Por último, para el estudio bioquímico por HPLC se usó una n=6 para la determinación del GSH, GSSG y glutamato y una n=7 para la determinación del MDA.

### **3. Obtención y procesado de muestras**

Las muestras se obtuvieron y se procesaron en función del tipo de determinación que se fuera a realizar.

### **3.1. Estudio *in vivo***

#### **3.1.1. Estudio histológico y de inmunofluorescencia**

Los globos oculares fueron fijados, crioprotegidos y crioseccionados. Para ello, se realizó la extracción de los globos oculares a día PN21 y se fijaron por inmersión en 4% de paraformaldehído durante 2 horas, después se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino a 0,1 M pH 7,2 (PBS; phosphate buffer saline) durante 10 minutos cada lavado y finalmente se crioprotegieron usando PBS-sacarosa en concentraciones crecientes de sacarosa (10-20-30%) a 4 °C.

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

#### **3.1.2. Análisis bioquímico**

##### ***3.1.2.1. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia de glutamato, glutatión, disulfuro de glutatión y determinación del malondialdehído***

Para el estudio de los parámetros bioquímicos, tras el sacrificio, los ojos fueron rápidamente enucleados y las dos retinas de cada animal fueron diseccionadas y homogenizadas a 13.000 rpm durante 1 minuto con un ultraturrax T25 (Labortech, Staufen, Alemania) en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,2 (PB; phosphate buffer). A continuación, el homogenado fue centrifugado a 6.000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Inmediatamente después, 180 µl del sobrenadante fueron acidificados con 20 µl de ácido perclórico al 20% (Panreac, Barcelona, España). El resto de sobrenadante se empleó para la determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) y para la determinación del MDA. Todo el homogenado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

##### ***3.1.2.2. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot***

Tras el sacrificio, los ojos fueron rápidamente enucleados y las dos retinas de cada animal fueron diseccionadas y homogenizadas con 50 µL de tampón de ensayos para radio-inmunoprecipitación (RIPA; Radio-Immunoprecipitation Assay) que contenía: 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 1% Nonidet P40 *substitute* (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 0,1% Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 50 mM de Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 0,5% desoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Además, al

tampón RIPA dicho se le añadió un cóctel con 1 mM Ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Madrid, España) e inhibidores de proteasas al 1X (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania) y de fosfatasa (10 mM NaF (Sigma Aldrich, Madrid, España), 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sigma Aldrich, Madrid, España).

La homogenización se realizó mecánicamente con un pistilo para tubos cónicos de 1,5 ml. Se homogenizaron las muestras durante 2 minutos cada una y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se separó el sobrenadante para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **3.2. Estudio *ex vivo***

#### **3.2.1. Inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de tejido de ratón**

Para este ensayo se emplearon ratones C57BL/6J (n=5), tras su sacrificio se extrajo el hígado en frío para realizar posteriormente su homogenado. Para los homogenados se añadieron 10 ml de PB 0,1 M a un recipiente estéril (Falcón) de 50 ml que contenía previamente los dos hígados. El homogenado se realizó con un ultraturax T25 a 13.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugó el homogenado a 6.000 rpm durante 5 minutos y del sobrenadante se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). A continuación, el sobrenadante restante se congeló alicuotado a -20 °C hasta su utilización.

### **3.3. Estudio *in vitro***

#### **3.3.1. Determinación de la viabilidad celular de un cultivo de células ARPE-19**

Tras realizar la puesta a punto del cultivo de células ARPE-19 las células recibieron distintos tratamientos con sulforafano (10 $\mu\text{M}$ ) y progesterona (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), para posteriormente inducirles estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a diferentes concentraciones (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$ ), se les aplicó a. Las muestras finalmente fueron procesadas para realizar la determinación de viabilidad celular mediante la técnica del 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-tetrazolio (MTT).

## 4. Procedimientos y técnicas

### 4.1. Estudio *in vivo*

#### 4.1.1. Estudio histológico: tinción de hematoxilina-eosina

- Fundamento del método:

La tinción de hematoxilina y eosina (HE) es la técnica de coloración más empleada en histología, es una tinción topográfica que sirve para el estudio de la estructura general de los tejidos. Se basa en la diferente afinidad que presentan los dos colorantes por las estructuras celulares ácidas o básicas. El colorante básico, la hematoxilina, colorea de azul púrpúreo las estructuras ácidas como la cromatina (material nuclear de la célula). La eosina, por el contrario al ser ácida tiñe estructuras básicas, estas estructuras aparecen de una tonalidad rosácea, la mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas y por ello el citoplasma aparece con dicha coloración.

- Soluciones y reactivos empleados:

- Hematoxilina de Harris (Química Clínica Aplicada, Tarragona, España).
- Eosina (Química Clínica Aplicada, Tarragona, España).
- Etanol absoluto cosmético (Guinama, La Pobla de Vallbona, España).
- Xileno (WWR International, Fontenay sous Bois, Francia).
- *Diamount* (medio de montaje libre de xileno) (Diapath, Martinengo, Italia).

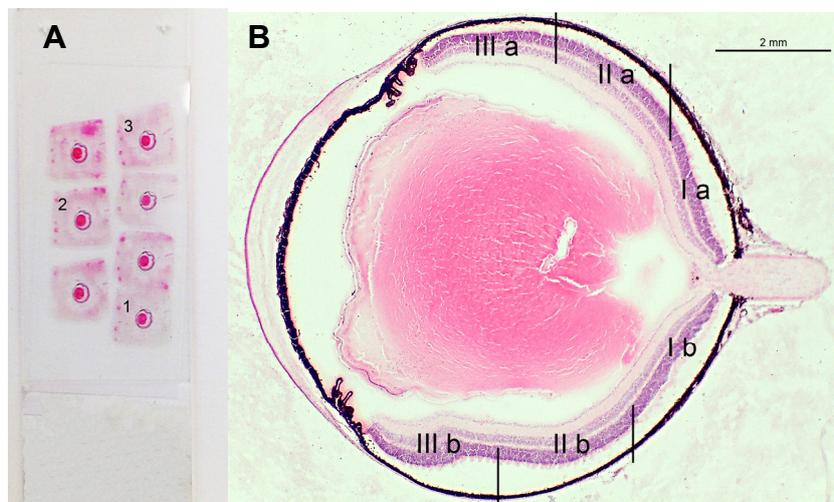
-Procedimiento experimental:

Primero se atemperan los cortes de retina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se cubren los cortes con unas gotas de hematoxilina durante 3 minutos. Posteriormente, se aclaran con agua corriente del grifo durante 5 minutos y se cubren los cortes con eosina durante 1 minuto. Después se aclaran con agua corriente del grifo durante 5 minutos y seguidamente, se procede a la deshidratación de los cortes por sucesivos baños en etanol de concentraciones crecientes: 70% (1 minuto), 96% (2 minutos), 100% (dos lavados de 1 minuto). *A posteriori*, se sumergen los cortes en xileno, un baño de 5 minutos y otro de 2 minutos. Finalmente, se montan las muestras con medio de montaje *Diamount*.

-Contaje celular al microscopio:

Para analizar el espesor de la 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 de P4, se requiere de la observación y contaje del número de filas de fotorreceptores en cada una de las zonas de la retina en al menos tres cortes de ojo por animal (Figura 22 A). 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 22 B): 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 22.** Tinción de retinas con hematoxilina-eosina. (A) Disposición de las retinas en cada porta donde se realizará el contaje. (B) Representación de las zonas a contar 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.

Se realizaron contajes en 3 retinas por animal/porta (Figura 22 A), concretamente se contó el número de filas de fotorreceptores en la capa nuclear externa (CNE) de cada una de las 6 zonas citadas anteriormente (Figura 22 B). Los

datos de los contajes representan las medias y el error estándar de la media para cada grupo.

#### **4.1.2. Detección mediante la técnica de marcaje con la técnica TUNEL**

##### **- Fundamento del método:**

Durante el proceso de apoptosis, sucede en la célula 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 también 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 et al., 1992), posteriormente se ha demostrado que también marca diversos tipos de muerte celular como la necrosis (Grasl-Kraupp et al., 1995).

##### **- Soluciones y reactivos empleados:**

- PBS 0,01 M pH 7,2.
- Solución de bloqueo: NGS diluido al 20% en PBS con BSA al 1%.
- Kit de detección de muerte celular *in situ* con fluoresceína (Roche, Mannheim, Alemania).
- Vectashield con DAPI.

##### **- Procedimiento experimental:**

Primero se atemperan 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 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).

Las células TUNEL positivas se contaron manualmente en la CNE 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 retinas por cada animal de cada grupo. Los contajes se realizaron a aumentos de 20 X y el número de células se refirió al área de la CNE en que se había realizado el contaje.

### **4.1.3. 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 detectada 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™ 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, EE.UU.) 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. Tras esto, 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 3), diluido en solución de bloqueo, la incubación tiene lugar durante toda la noche a 4 °C.

	Anticuerpo	Nombre	Descripción	Dilución	Casa comercial	Referencia
PRIMARIO	GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Policlonal de conejo	1:500	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca	Z0334
	nNOS/NOS I	Óxido nítrico sintasa neuronal	Policlonal de conejo	1:200	Santa cruz biotechnology, Dallas, EE.UU.	sc-8309
SECUNDARIO	Alexa Fluor @488	Cabra anti-conejo IgG (H+L)	Policlonal de cabra	1:200	Invitrogen, Life technologies, Madrid, España	A11008

**Tabla 3.** 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.

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 (Tabla 3). 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.

- 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 20X. Posteriormente, para el análisis de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP; glial fibrillary acidic protein) se midió en toda la retina el porcentaje de área ocupada por el marcaje correspondiente al anticuerpo. En el caso de NOS I o la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS; nitric oxide synthase) se contaron el número de células nNOS positivas por área seleccionada. Para ello, se realizaron mediciones en 3 retinas por porta, en cada una de las 6 zonas de la retina citadas anteriormente para el resto de contajes. Dichas medidas se realizaron con el programa de procesamiento de imágenes Image J 1.45s.

#### 4.1.4. Análisis bioquímico

##### 4.1.4.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry

###### - Fundamento del método:

La determinación se realizó según el procedimiento descrito por Lowry et al. (Lowry et al., 1951) con las modificaciones utilizadas de forma habitual en nuestro laboratorio (Peterson, 1977).

El método consiste en la realización de una curva patrón de concentraciones crecientes de BSA. Tras la adición de las soluciones de trabajo y del reactivo de Folin, se mide la absorbancia ( $\Delta$ ) de cada uno de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 696 nm. La  $\Delta_{696}$  es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de modo que con los valores de absorbancia obtenidos para los distintos estándares se obtiene la recta patrón y por interpolación se cuantifican las concentraciones de proteínas de las muestras que están siendo analizadas.

###### - Soluciones y reactivos empleados:

- Solución 1:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 4% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + NaOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,8%, en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 2a:  $\text{CuSO}_4$  a 1,25 mM (Guinama, Valencia, España), en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 2b:  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  a 1,42 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España), en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 3: Reactivo de Folin (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluido a 1N.
- Solución 4: Estándar de 1mg/ml de BSA (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La solución 1+2 se prepara en el momento previo a su uso:

- Solución 1+2 = solución 1: solución 2a: solución 2b (2:1:1) y solución 3: diluida 1:2 a 1N.

###### - Procedimiento experimental:

Primero, se preparan los tubos de ensayo de la curva patrón con cantidades diferentes de la solución 4 (0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{l}$ ) y se añade agua bidestilada hasta un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . Los tubos de ensayo donde se añaden las muestras

contendrán 25  $\mu$ l de muestra y 175  $\mu$ l de agua bidestilada. Tanto la curva patrón como las muestras se realizan por duplicado. Posteriormente, a cada tubo de ensayo se le añade 1 ml de la solución 1+2. Tras agitar, se deja reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden a cada tubo 100  $\mu$ l de la solución 3, se agita bien y a continuación, se espera durante 25-30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se medirá la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro, Genesys™ 20 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) a una longitud de onda de 696 nm. La  $\Delta_{696}$  es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Es posible interpolar la concentración de proteínas en la muestra de homogenado de retina, hay que tener en cuenta que el valor de concentración obtenido de la recta se tiene que corregir por el volumen de muestra empleado para obtener la concentración de proteínas en  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### **4.1.4.2. Determinación de las concentraciones de glutamato, glutatión y disulfuro de glutatión**

##### **- Fundamento del método:**

El método se realizó siguiendo el método de Reed et al. (Reed et al., 1980) según el cual el ácido iodoacético reacciona con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos, a lo que le sigue una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) dando lugar a derivados 2,4-dinitrofenil derivados (DNP; 2,4-dinitrophenyl). Estos derivados son rápidamente separados por HPLC, lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de glutamato o ácido glutámico, GSH y GSSG. Los valores de glutamato, GSH, y GSSG serán referidos a las concentraciones de proteína determinadas por el método de Lowry et al. (Lowry et al., 1951).

##### **- Equipo y soluciones empleadas:**

Se ha empleado un equipo de HPLC (Gilson, Middleton, EE.UU.) que consta de los siguientes componentes:

- Bombas para cromatografía: bombas Gilson 322.
- Detector: Gilson 156UV/VIS.
- Lámpara UV y visible.

- Desgasificador: Gilson 864.
- Autoinyector: Gilson 234 con bucle de 100 µl.
- *Gilson serial Input/ Output Chanel (GSIOC)*.
- Ordenador: 486/50 Hz.
- Programa informático: *Unipoint TM System*.

La columna empleada para la determinación cromatográfica ha sido la Kromasil Amino 5 µm, 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones iniciales del flujo empleadas son de 1,0 ml/min, con 80% de fase A y 20% de fase B. Estas condiciones iniciales se mantienen durante 10 minutos, seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante los 10 minutos previos al análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda empleada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta es de 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos. Finalmente, la inyección de cada muestra se realiza de forma automática con un autoinyector con capacidad para 45 muestras.

La preparación de las soluciones empleadas se realiza del siguiente modo:

- Fase móvil A: 80% de metanol HPLC (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda) + 20% agua HPLC (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda).
- Fase móvil B: acetato de sodio 5 M (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + ácido acético glacial (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda) + agua calidad HPLC. Una vez disuelto lo anterior se diluye todo en 80% de fase A.

Posteriormente, ambas fases se filtran a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Madrid, España).

La solución madre de calibración se prepara diariamente. Dicha solución madre consiste en una concentración de 10 mM de glutamato (Sigma-Aldrich, Madrid, España), GSH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y GSSG (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluida en agua calidad HPLC.

- Soluciones para la derivatización:

- Solución 1: 100 mM de ácido iodoacético (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 0,2 mM de m-cresol (Acros Organics, New Jersey, EE. UU.). Esta solución permanece estable dos semanas tras su preparación y se mantiene a 4 °C protegida de la luz.

- Solución 2: 10 M de KOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 3 M KHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Madrid, España), solución estable a 4 °C.

- Solución 3: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 15% v/v en etanol absoluto HPLC (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda), se prepara previamente a su uso y se conserva a 4 °C protegida de la luz.

- Procedimiento experimental:

Para cada una de las determinaciones, se preparan en tubos de 1,5 ml, un blanco y una curva de calibración de estándares: 0 – 20 – 40 – 60 – 800 y 100 µM para las dos formas del glutatión; GSH y GSSG y de 0 – 200 – 400 – 600 – 800 y 1000 µM para el glutamato. Se acidifican 90 µl de cada estándar con 10 µl de ácido perclórico al 20% (Panreac, Barcelona, España). Posteriormente, se añaden 20 µl de la solución 1 a 100 µl de muestra y de los estándares. El pH se ajusta a 8,5-9 al añadir 30 µl de la solución 2, tras este paso se incuban los tubos 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 µl de la solución 3 para formar los derivados DNP, que requieren de un mínimo de 4 horas a 4 °C en oscuridad para formarse.

En caso de que las muestras no vayan a ser analizadas tras un tiempo de incubación de 24 horas a 4 °C, se almacenarán a -20 °C durante un máximo de 20 días.

Tras el tiempo de incubación, los tubos se centrifugan a 13.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se utiliza para ser analizado en el equipo de HPLC. La cantidad mínima de muestra inyectada debe ser de 115 µl para tener la seguridad de llenar el bucle de 100 µl.

**4.1.4.3. Determinación de la concentración de malondialdehído**

- Fundamento del método:

Para la cuantificación del MDA de las muestras de homogenado de retina y del ensayo de peroxidación lipídica, se ha utilizado una modificación del método de

Richard y colaboradores (Richard et al., 1992), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA; thiobarbituric acid) en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA.

- Equipo y soluciones empleadas:

Para la determinación de la concentración de MDA se ha empleado un equipo de HPLC (Waters, Middleton, EE.UU.) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 *binary* HPLC *Pump*.
- Detector: Waters 2475 *Multi  $\lambda$  fluorescence*.
- Inyector: Waters 717 *plus Autosampler* con bucle de 50  $\mu$ L.
- Controlador: *Multiport* modelo RS.232.
- Ordenador: IBM *Windows*.
- Programa informático: *Data System MT2*.

La columna empleada ha sido la Kromasil C18 Amino 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones del flujo son de 1,0 ml/min. La longitud de onda de excitación es de 532 nm y la de emisión de 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 voltios y el tiempo de respuesta de 2 segundos. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector.

La preparación de las soluciones empleadas se realiza del siguiente modo:

La fase móvil se prepara con PB 50 mM a pH 6 y metanol (mezclados en proporción 580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, la fase móvil se filtra a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2  $\mu$ m.

La solución madre de calibración se prepara previa a su uso y se conserva a 4 °C. Dicha solución madre consiste en 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (precursor del MDA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en etanol absoluto para HPLC.

La solución de trabajo consiste en una preparación de TBA al 0,37% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y ácido perclórico al 6,4%, 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria previa a su uso.

- Procedimiento experimental:

Se preparan en tubos con tapa de rosca de 2 ml un blanco y una curva de calibración de estándares con las siguientes concentraciones: 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 y 4  $\mu\text{M}$ . Se toman 100  $\mu\text{l}$  de los patrones y de las muestras y se mezclan bien con 750  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo en tubos de 2 ml. A continuación, se incuban los tubos que se sellan con teflón en un baño con agua a 95 °C. Para detener la reacción se enfrían los tubos 10 minutos en un baño con hielo (se mantienen en hielo hasta el siguiente paso). Posteriormente, se centrifugan 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. El aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro, por ello cada muestra y patrón se neutraliza 10 minutos antes de cada inyección.

De este modo, se neutralizan 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante obtenido en el paso anterior con 0,7 M hidróxido potásico (Sigma-Aldrich, Madrid, España), hasta obtener un pH de 6, que se comprueba aplicando unos microlitros de muestra en tiras de papel indicadoras de pH universal pH 1-11 (Macherey-Nagel, Hoerd, Francia).

Una vez se ajusta el pH, se centrifugan las muestras durante 1 minuto a 12.000 rpm, con la finalidad de precipitar las sales insolubles que podrían interferir en la determinación. Finalmente, se filtran 100  $\mu\text{l}$  de muestra con filtros de jeringa no estériles de 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech, Madrid, España) y se inyectan en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra inyectada es de aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  para tener la seguridad de llenar el bucle de 50  $\mu\text{l}$ .

**4.1.4.4. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot**

**4.1.4.4.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford**

- Fundamento del método:

Este método se emplea para cuantificar las proteínas de las muestras destinadas a WB, está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

El método consiste en la realización de una curva patrón de concentraciones crecientes de BSA. Tras la adición de las soluciones de trabajo, se mide la  $\Delta_{595}$  de cada uno de los tubos de ensayo. La  $\Delta_{595}$  es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de este modo, con los valores de absorbancia obtenidos para los distintos estándares, se obtiene la recta patrón y por interpolación se cuantifican las concentraciones de proteínas de las muestras que están siendo analizadas.

### - Soluciones y reactivos empleados:

- Estándar de 5 µg/µl de BSA (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para desarrollar el protocolo se realizarán diluciones de este estándar.
- Dilución del estándar de 5 µg/µl de BSA a una dilución de 0,5 µg/µl.
- Reactivo de trabajo: Bio-Rad *protein assay* (Bio-Rad, Hercules, EE.UU) diluido 1:5 en agua bidestilada.

### - Procedimiento experimental:

La recta patrón de BSA y las muestras problema se preparan por duplicado directamente en placas de lectura de 96 pocillos.

En primer lugar se realiza una recta patrón de concentraciones conocidas (0 – 0,5 – 1 – 5 – 10 – 20 y 50 µg) de la proteína BSA. Para ello se mezcla agua bidestilada hasta 20 µl con la cantidad de proteína correspondiente. Para cuantificar las proteínas de las muestras se añade 1 µl de muestra y hasta 20 µl de agua bidestilada. Posteriormente se añaden 200 µl del reactivo de trabajo a todos los pocillos y se espera 5 minutos para que tenga lugar la reacción. Finalmente, se realiza la lectura en un lector de placas VICTOR™X3 (PerkinElmer, Waltham, EE.UU.) a  $\Delta_{595}$ . Con los valores de absorbancia obtenidos, se cuantifican las concentraciones de proteínas de las muestras, dado que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

### **4.1.4.4.2. Técnica de Western blot**

#### - Fundamento del método:

La metodología de western blot empleada está descrita en el libro *Current Protocols in molecular Biology* (Gallagher et al., 2008). Este procedimiento consiste en la migración de proteínas del tejido fraccionado por medio de una electroforesis desnaturante en geles de acrilamida (SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Estas proteínas una vez que se han separado por su tamaño en el gel, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de las proteínas se pone de manifiesto por medio de anticuerpos específicos ligados a un sistema de detección y visualización.

- Equipo, soluciones y reactivos empleados:

Para el revelado del western blot se empleó el equipo *ImageQuant*<sup>™</sup> LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) cuyas bandas se cuantificaron después con el programa informático de análisis de imagen *ImageQuant*<sup>™</sup> TL (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España).

- Soluciones y reactivos:

- Acrilamida: solución de 40% de acrilamida y bis-acrilamida, 37,5:1 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- SDS (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Glicina para electroforesis (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Persulfato amónico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris + Glicina 1,92 M + SDS al 0,1%.
- Tampón de transferencia: 20% de metanol+ 25 mM de Tris + Glicina 0,92 M
- Tampón de carga 1 X: 15% SDS, 50% glicerol (Sigma Aldrich, Madrid, España) y 0,1% azul de bromofenol (Sigma Aldrich, Madrid, España).
- Marcador de peso molecular: SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 *pre-stained* estándar (Invitrogen, Lifetech, Madrid, España).
- Colorante de proteínas: rojo *Ponceau S* (Sigma Aldrich, Madrid, España).
- PBS 0,01 M pH 7, 2.
- PBS-tween 20 al 0,1% (Q BIO gene, Carlsbad, EE.UU.).
- PBS-BSA 3%-azida sódica al 0,01% (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Solución de bloqueo: 5 g de leche descremada en 100 ml de PBS-tween 20 al 0,1%.
- Kit de revelado: Pierce<sup>®</sup> ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).
- Solución de *stripping*: 200 mM de glicina para electroforesis con SDS al 0,4%.

### - Procedimiento experimental:

1. Se preparan los geles de acrilamida al porcentaje adecuado en función del peso molecular de la proteína a analizar. En nuestro caso se han empleado geles del 10-15% de acrilamida y de 1 mm de grosor.
2. Las muestras se preparan en función de la cantidad de proteínas obtenida por el método de Bradford descrito anteriormente (apartado 4.1.4.4.1.). De este modo, se emplea más o menos cantidad de muestra para finalmente cargar 75 µg de proteína total por cada una de las muestras. Se añade a las muestras tampón de carga 1 X y a continuación, las muestras se hierven a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugan durante 1 minuto a 13.000 rpm.
3. Las muestras se cargan en los pocillos y la electroforesis vertical se realiza durante 60 minutos a 200 V con el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).
4. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España), se realiza con un equipo Mini PROTEAN 3 durante 60 minutos a 300 mA. Para comprobar el éxito en la transferencia, las membranas se tiñen con la solución de rojo *Ponceau*, y después se lavan 3 veces durante 10 minutos con PBS 0,01 M pH 7,2.
5. Las membranas se incuban con solución de bloqueo durante 1 hora en agitación. A continuación, se lavan con PBS-tween 20 al 0,1%, 3 veces durante 10 minutos (excepto el último lavado que se realiza con PBS 0,01 M pH 7,2) y se incuban de nuevo las membranas, esta vez con el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en PBS-BSA 3%-azida sódica 0,01%, durante toda la noche a 4 °C en reposo.
6. Al día siguiente, las membranas se lavan de nuevo 3 veces durante 10 minutos con PBS-tween 20 al 0,1% en agitación y se incuban durante 1 hora en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente que va unido a peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase) diluido en solución de bloqueo (Tabla 4). Posteriormente, se realizan de nuevo lavados en las mismas condiciones de los lavados previos a la incubación con el anticuerpo primario.

	Anticuerpo	Dilución	Nombre	Especie huésped	Casa comercial	Referencia
PRIMARIOS	pCREB	1:1000	Elemento fosforilado de unión y respuesta al cAMP	Policlonal de conejo	Merck Millipore™, Temecula, EE.UU.	# 06-519
	CREB1	1:1000	Elemento de unión y respuesta al cAMP	Policlonal de conejo	Santa cruz biotechnology, Dallas, EE.UU.	sc-186
	iNOS	1:500	Óxido Nitrico Sintasa inducible	Policlonal de conejo	Abcam, Cambridge, Inglaterra	ab3523
	BDNF	1:500	Factor neurotrófico derivado del cerebro	Policlonal de conejo	Santa cruz biotechnology, Dallas, EE.UU.	sc-546
	LC3B	1:1000	Cadena ligera 3	Policlonal de conejo	Cell signaling technology®, Danvers, EE.UU.	#2775
	GCLC	1:1000	Glutamato cisteína ligasa catalítica	Policlonal de conejo	Abcam, Cambridge, Inglaterra	ab53179
SECUNDARIO	Goat anti-conejo IgG,F(ab') <sub>2</sub> -HRP	1:5000	Anticuerpo secundario de conejo con peroxidasa	F(ab') <sub>2</sub> de cabra	Santa cruz biotechnology, Dallas, EE.UU.	sc-3837

**Tabla 4.** Lista de anticuerpos utilizados para la técnica de western blot. Se detallan su nombre comercial completo, la dilución a la que se ha usado, la especie donde se ha producido, la casa comercial y su referencia en el catálogo.

7. Finalmente, se procede a la detección por quimioluminiscencia con el kit de revelado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas han sido analizadas con un lector de imágenes por quimioluminiscencia (*ImageQuant™* LAS 4000) y con el correspondiente programa informático de análisis de imagen (*ImageQuant™* TL).

En caso que se quiera emplear de nuevo la misma membrana para detectar una proteína diferente a la ensayada: tras el revelado se realizan lavados con PBS 0,01 M pH 7,2 y las membranas se incuban durante 20 minutos en suave agitación con la solución de *stripping*. A continuación, se puede proceder con las membranas para su lavado, bloqueo y pasos siguientes.

## 4.2. Estudio *ex vivo*

### 4.2.1. Inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de hígado de ratón

#### - Fundamento del método:

Se realizó el estudio *ex vivo* del tratamiento con P4 en una situación de estrés oxidativo provocada mediante la inducción de la peroxidación lipídica por sales de Fe (II) y ácido ascórbico. Para este procedimiento se siguió el modelo experimental modificado de Fraga y colaboradores (Fraga and Tappel, 1988) que se detalla a continuación:

## Material y métodos

---

### - Soluciones y reactivos empleados:

- PB 0,1 M a pH 7,2.
- Sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Guinama, Valencia, España): Se preparó una concentración *stock* de 1,5 mM.
- Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich, Madrid, España): Se preparó una concentración *stock* de 7,9 mM.
- Butil hidroxitolueno (BHT) al 4% (Guinama, Valencia, España) en metanol.
- Disolución de 5 mM de P4 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### - Procedimiento experimental:

Preparación de las diferentes concentraciones de P4: se prepara una concentración *stock* de 5 mM de P4 disuelta en DMSO, y a partir de aquí se preparan concentraciones intermedias de 0 – 50 – 100 – 200 – 400 y 1000  $\mu\text{M}$  de la P4 diluida en DMSO (Tabla 5):

[Progesterona] final ( $\mu\text{M}$ )	[Progesterona] intermedia ( $\mu\text{M}$ )	Volumen Progesterona 5 mM ( $\mu\text{L}$ )	Volumen DMSO ( $\mu\text{L}$ )
0	0	0	500
0,5	50	5	495
1	100	10	490
2	200	20	480
4	400	40	460
10	1000	100	400

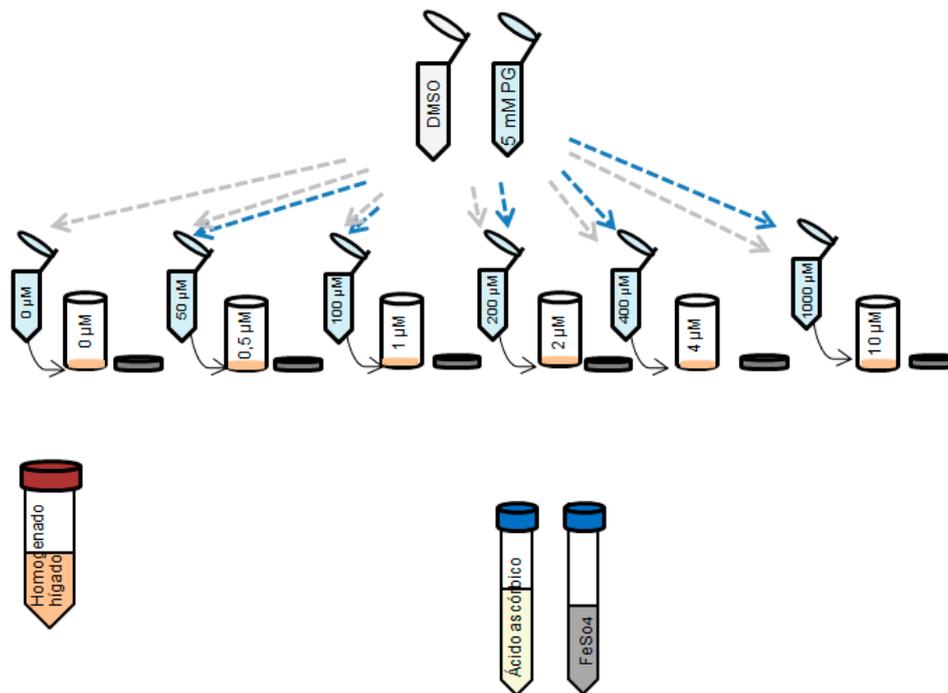
**Tabla 5.** Volumen de progesterona 5 mM y DMSO necesario para la preparación de las concentraciones intermedias de progesterona y las correspondientes concentraciones finales para el ensayo de inducción de la peroxidación lipídica.

### - Preparación de las muestras para la incubación:

En primer lugar, se añaden 268  $\mu\text{L}$  de homogenado de hígado de ratón (7,46 mg/ml) a un vial de rosca, al homogenado se le adicionan 3  $\mu\text{L}$  de P4 a las diferentes concentraciones intermedias para obtener la concentraciones finales de 0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 y 10  $\mu\text{M}$  (Tabla 5) (Figura 23). A su vez, se ensaya del mismo modo que con el resto de viales con un blanco, ya que debido al carácter oxidante del DMSO el valor

obtenido de este vial servirá para corregir la peroxidación basal en las muestras, este vial contiene lo mismo que los otros viales pero sin el citado volumen de P4.

A continuación, se añaden 19  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (para tener una concentración final en el vial de 0,50 mM en 300  $\mu\text{L}$  totales). Luego se adicionan 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  para tener una concentración final de 0,05 mM. Se incuban las muestras a 37 °C durante dos horas con los viales abiertos. Y finalmente, se detiene la reacción de peroxidación añadiendo a cada uno de los viales 10  $\mu\text{L}$  de BHT para después congelar las muestras a -80 °C hasta la cuantificación del MDA por HPLC.



**Figura 23.** Desarrollo experimental del modelo de la peroxidación lipídica en homogenado de hígado de ratón.

### 4.3. Estudio *in vitro*

#### 4.3.1. 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 et al., 1996), para inducir posteriormente un estrés oxidativo a las células mediante la aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a diferentes concentraciones. Previamente a la inducción del estrés oxidativo, a las células se les ha aplicado sulforafano o P4 como pre-tratamiento para tratar de reducir dicho estrés.

### - Soluciones y reactivos empleados:

- Medio para cultivo celular: *Dulbecco's eagle medium and Ham's F12 medium* (Gibco, Lifetech, Madrid, España).
- Suero fetal bovino (FBS; fetal bovine serum) (Gibco, Lifetech, Madrid, España).
- Penicilina-estreptomicina (Pen/Strep) (Gibco, Lifetech, Madrid, España).
- Glutamina (Gln) (Gibco, Lifetech, Madrid, España).

### - Procedimiento experimental:

Las células ARPE-19 donación del laboratorio de Julie Sanderson (*East Anglia University*) se cultivan a una densidad alta (100.000 células/cm<sup>2</sup>) en *flask* T75 y se mantienen en cultivo a 37 °C y a un 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. Los cultivos se mantienen en medio 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.

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 50.000 células/pocillo con un medio suplementado con FBS al 10%, Pen/Strep al 1% y Gln a 2 mM durante 24 horas. Tras estas 24 h se procede a la adición del antioxidante.

#### **4.3.2. Administración de progesterona y sulforafano como pre-tratamiento frente a la inducción de estrés oxidativo en células ARPE-19 con peróxido de hidrógeno**

Tras la incubación de las células durante 24 horas en placas de 96 pocillos, en los pocillos del grupo 1 (Figura 24) se cambió el medio (10% FBS-Pen/ Strep-Gln), por medio nuevo (10% FBS-Pen/Strep-Gln) sin sulforafano ni P4. Mientras que en el resto de pocillos se procede a reemplazar el medio por medio nuevo con sulforafano a 10 µM o progesterona a 1 µM o 10 µM, todos los pocillos se mantendrán en estas condiciones durante 24 horas. Los grupos experimentales establecidos en función del tipo de pre-tratamiento se detallan a continuación:

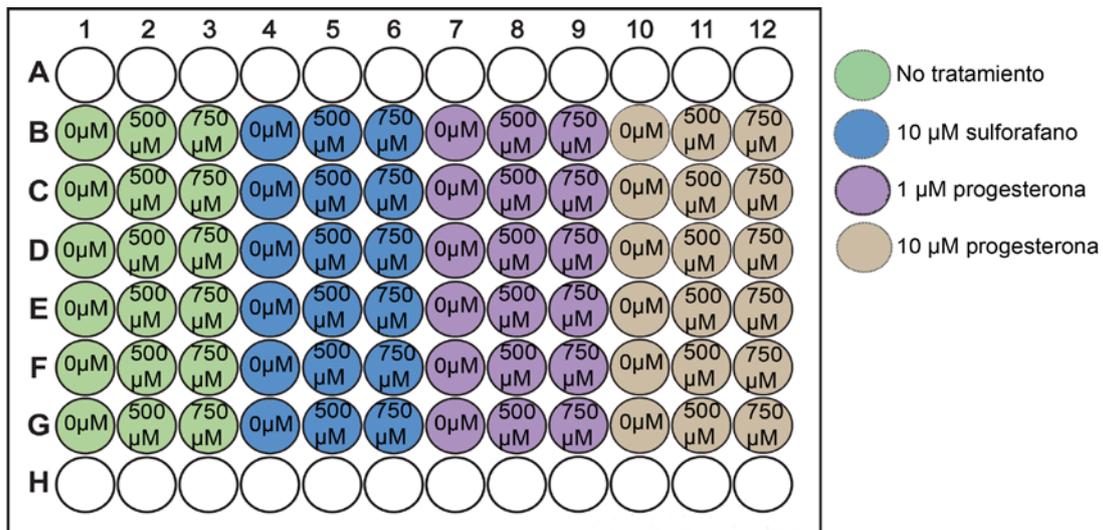
**Grupo 1.** Cultivo sin tratamiento de sulforafano ni P4 (18 pocillos).

**Grupo 2.** Cultivo con 10 µM de sulforafano (18 pocillos).

**Grupo 3.** Cultivo con 1  $\mu\text{M}$  de P4 (18 pocillos).

**Grupo 4.** Cultivo con 10  $\mu\text{M}$  de P4 (18 pocillos).

Al día siguiente, se procede a incubar las células durante 24 horas con medio nuevo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Panreac, Barcelona, España), diluido a tres concentraciones distintas (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$ ) en los diferentes pocillos. Se aplica cada una de las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 6 pocillos de una placa de 96 pocillos para cada uno de los grupos a estudio (Figura 24), el ensayo se realizará por duplicado.



**Figura 24.** Procedimiento experimental para la inducción de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$ ) y la utilización de los tratamientos con sulforafano (10  $\mu\text{M}$ ) y progesterona (1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.3.3. Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-tetrazolio

##### - Fundamento del método:

Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-tetrazolio (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas, el producto de esta reacción metabólica es el formazán, un compuesto coloreado azul. De este modo, esta técnica permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y puede cuantificarse por espectrofotometría (Park et al., 2010).

### - Soluciones y reactivos empleados:

- MTT (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- DMSO (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### - Procedimiento experimental:

Tras 24h después de la aplicación de las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (detallado previamente en el apartado 4.3.2. de material y métodos), se lleva a cabo la técnica de MTT para determinar la viabilidad celular mediante el siguiente protocolo:

Primero, se cambia el medio de los pocillos por medio nuevo (10% FBS-Pen/Strep-Gln). A continuación, se añaden 20 µL de MTT a cada uno de los pocillos y se ponen las células en el incubador durante 4 horas. Posteriormente, se elimina el medio y se añaden 50 µL de DMSO para lisar las células. Finalmente, tras 15 minutos de espera se lee la placa en el espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, USA) ( $\lambda=550\text{nm}$ ).

## 5. Tratamiento estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado usando 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 las correlaciones realizadas durante la tesis (apartado 2.2 y 7.3.2. de los resultados) se ha llevado a cabo el análisis de regresión lineal entre las variables. Del resumen del modelo de regresión lineal se obtiene el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) y además, se realiza un ANOVA para conocer la significatividad de la correlación.

En el estudio de la caracterización del modelo de ratón rd10 (HE y TUNEL) y del modelo C57BL/6J, se han realizado comparaciones de los valores para cada una de las zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de retina) entre los diferentes grupos de animales (PN5 C57, PN5 rd10, PN13 C57, PN13 rd10, PN21 C57 y PN21 rd10), se ha realizado el análisis ANOVA de dos vías. El primer factor ha sido la “zona de la retina estudiada” y el segundo factor la variable “grupo animal”. Tras

realizar la comprobación de la normalidad de los datos con el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov también se estudió la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, para después poder aplicar el test ANOVA. Si el estadístico del test mostraba diferencias estadísticamente significativas, se procedió a analizar tales diferencias empleando el post-hoc de Fisher's LSD *test* (para el caso de varianzas homogéneas) o el test Games-Howell (para el caso de varianzas no homogéneas).

También se ha utilizado el análisis de varianza ANOVA de dos vías para analizar los resultados del estudio de la viabilidad del cultivo de células ARPE-19 con sulforafano, P4 y diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El primer factor ha sido la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 µM, 500 µM y 750 µM) y como segundo factor se ha dispuesto el tipo de tratamiento aplicado a las células (no tratamiento, sulforafano 10 µM, progesterona 1 µM y progesterona 10 µM). Tras comprobar la normalidad de los datos con el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene, se ha empleado el post-hoc correspondiente, Fisher's LSD *test* o el de Games-Howell.

Se han analizado con el test-t las comparaciones realizadas para estudiar la evolución del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína GFAP entre los días PN21 y PN23 para cada uno de los grupos, todo ello tras comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas con los test citados con anterioridad para tal fin.

Finalmente, para realizar el análisis estadístico del resto de estudios, tras comprobar la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos, se ha utilizado el test ANOVA de una vía con el post-hoc Fisher's LSD *test* o el de Games-Howell.



# RESULTADOS

---



## 1. Caracterización de la degeneración a nivel histológico y de muerte celular en un modelo de ratón rd10 y en ratones C57

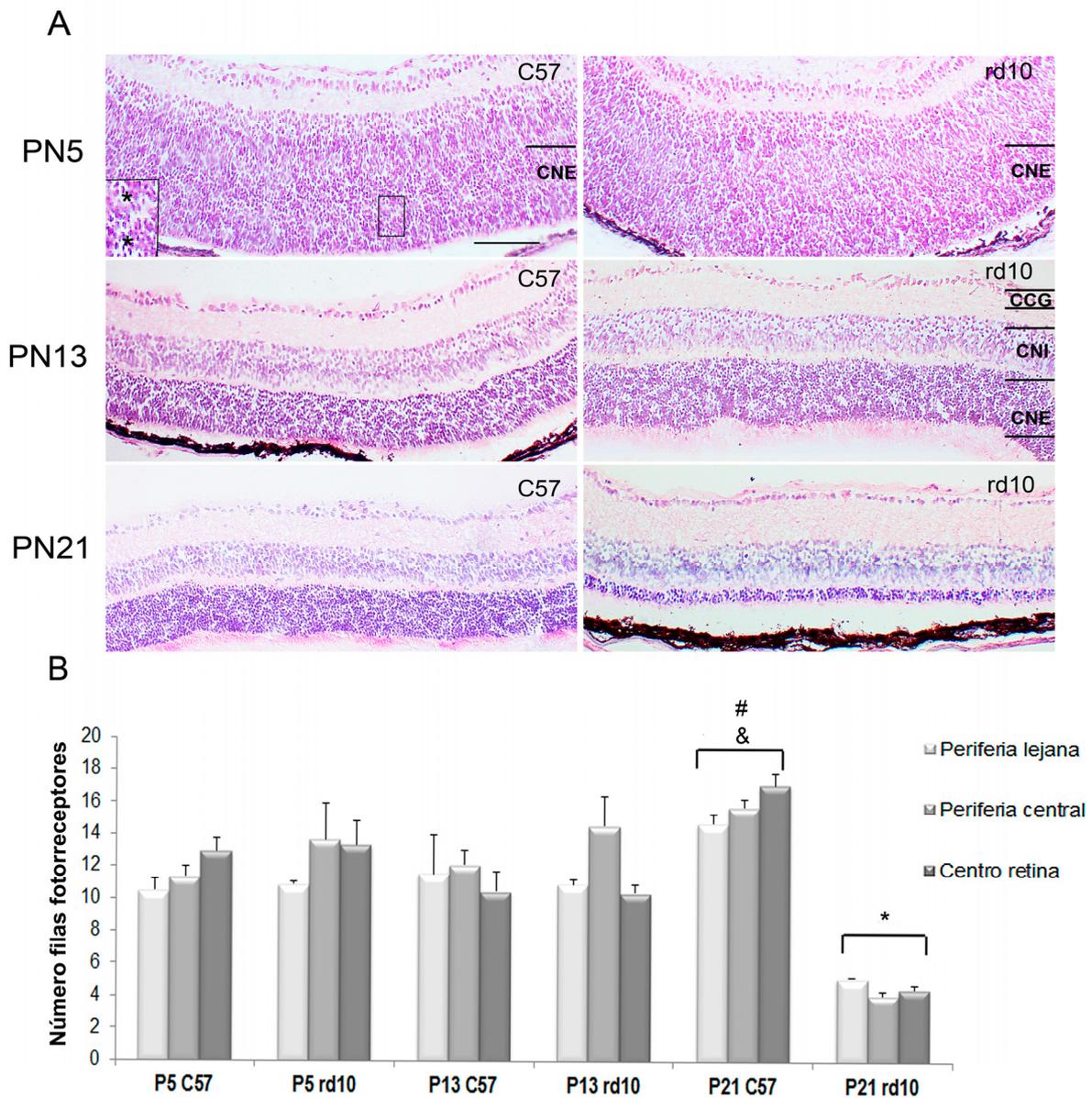
Con la finalidad de caracterizar la degeneración de la retina de nuestro modelo de ratón rd10, se realizaron estudios de retinas de ratones C57BL/6J (controles) y de los ratones rd10 con la tinción de hematoxilina-eosina (HE) y de muerte celular mediante la técnica de marcaje con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal con biotina-dUTP (TUNEL; terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling).

### 1.1. Caracterización histológica

En la figura 25 se puede observar el número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de la retina), a las diferentes edades post-natales estudiadas para las cepas de ratón C57 y rd10. Las imágenes se muestran a modo de ejemplo y todas corresponden a la periferia central. A día PN5 se muestra la zona equivalente a la futura CNE, en la que se pueden observar núcleos de células que se han contado para la caracterización.

Se observa en la figura 25 la existencia de una gran reducción en el número de filas de fotorreceptores en los ratones rd10 a día post-natal (PN)21 respecto a todos los grupos representados (P5 C57, P5 rd10, P13 C57, P13 rd10 y P21 C57) (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos), según nuestros resultados esta disminución sucede desde el día PN13 al día PN21. Mientras que en los controles (C57) el número de filas de fotorreceptores aumenta a día PN21 respecto de los ratones C57 a día PN5 y PN13 (& $p < 0,05$  vs PN5 C57 y PN13 C57) y dicho aumento en PN21 C57 también es estadísticamente significativo respecto a PN13 rd10 (# $p < 0,05$  vs PN13 rd10);

Al realizar el estudio estadístico se estudió la posibilidad de la existencia de interacción entre los factores estudiados (grupo de animal y zona de la retina estudiada). De este modo, se obtuvo que hay una interacción estadísticamente significativa entre los citados factores ( $F=2,587$ ;  $p < 0,05$ ), con lo que el número de filas de fotorreceptores en una zona concreta de la retina depende del tipo de animal del que se trate.

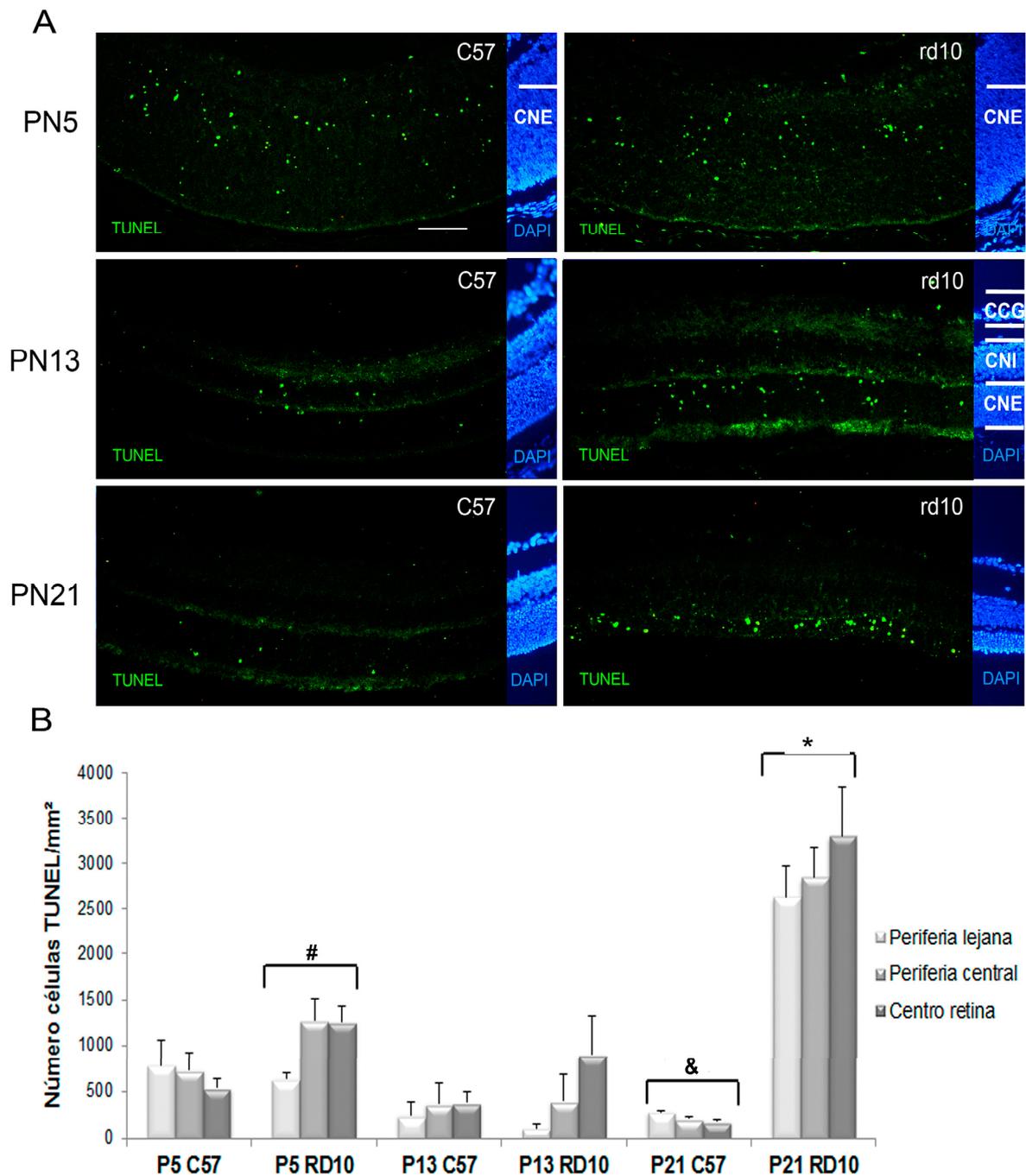


**Figura 25.** Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, a los días PN5, PN13 y PN21. (A) Hematoxilina-eosina de la periferia central de la retina a los citados días para los grupos rd10 y C57. A día PN5 se muestra la ampliación al doble de tamaño de la zona seleccionada en la CNE, las células que se han contado como fotorreceptores aparecen marcados con \*. Escala 50  $\mu$ M. (B) Las barras del gráfico representan el número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina (al menos n=3 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media (\*p< 0,05 vs todos los grupos; #p<0,05 vs PN13 rd10; &p< 0,05 vs PN5 C57 y PN13 C57).

## 1.2. Caracterización de la muerte celular

La figura 26 muestra el número de células TUNEL positivas en la retina de los ratones C57 y rd10 a los diferentes días estudiados; PN5, PN13 y PN21. Las imágenes se muestran a modo de ejemplo y todas corresponden a la periferia central.

En la figura 26 se observa un elevado número de células TUNEL positivas en los ratones rd10, sobre todo a los días PN5 ( $\#p < 0,05$  vs PN13 C57 y PN21 C57) y también a día PN21 ( $*p < 0,05$  vs todos los grupos). A su vez en los controles el número de células TUNEL disminuye significativamente a día PN21 respecto de PN5 ( $\&p < 0,05$  vs PN5 C57).



**Figura 26.** Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, a los días PN5, PN13 y PN21. (A) TUNEL de la periferia central de la retina. Escala 50  $\mu$ m. (B) Las barras del gráfico representan el número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina (al menos n=3 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media ( $*p < 0,05$  vs todos los grupos;  $\#p < 0,05$  vs PN13C57 y PN21 C57;  $\&p < 0,05$  vs PN5 C57).

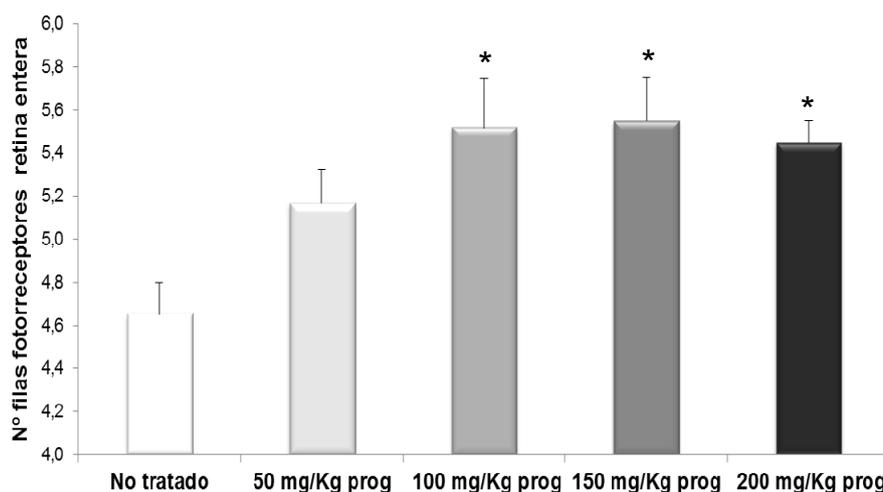
## 2. Determinación de la dosis óptima para el tratamiento con progesterona

### 2.1. Efecto de las diferentes dosis de progesterona en la degeneración de la retina de ratones rd10

Debido a que la degeneración de los fotorreceptores en el modelo de ratón rd10 se produce de forma distinta en las diferentes zonas de la retina, mostrando un gradiente del centro a la periferia (Chang et al., 2007, Gargini 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).

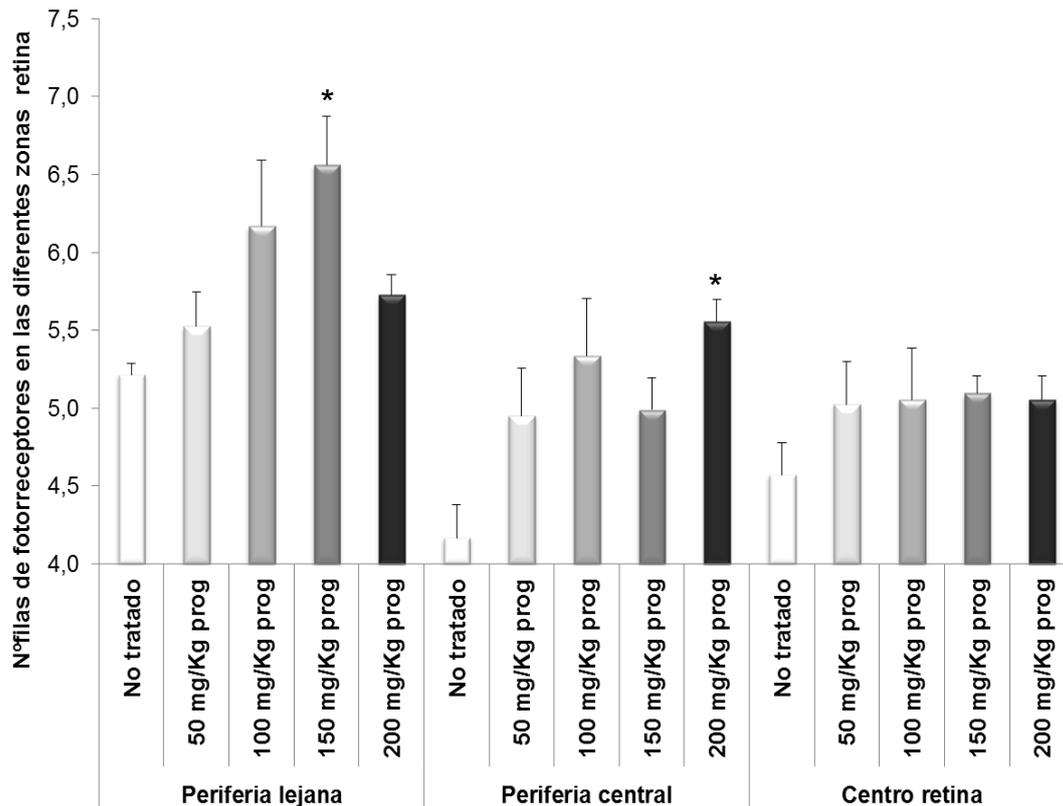
La figura 27 representa el número medio de filas de fotorreceptores en la retina entera tras los diferentes tratamientos con progesterona (P4) en los ratones rd10. Se ha estudiado el posible efecto de la P4 en esta cepa de ratón a diferentes concentraciones, disponiendo de las siguientes agrupaciones: rd10 sin tratamiento y rd10 con tratamiento a las siguientes dosis de P4: 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg y 200 mg/kg de P4.

El número de filas de fotorreceptores en la retina entera se ha calculado realizando el promedio de los contajes para todas las zonas de la retina de un mismo animal y de todos los animales de un mismo grupo. El gráfico de barras muestra que el efecto de la P4 parece ser dosis-dependiente, encontrando diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo rd10 no tratado en las dosis de 100 mg/kg, 150 mg/kg y la dosis de 200 mg/kg de P4, (\* $p < 0,05$  vs rd10 no tratado).



**Figura 27.** Representación gráfica del número de filas de fotorreceptores en la retina entera de los ratones rd10 en los diferentes grupos según la dosis de progesterona. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs no tratado).

La figura 28 muestra las diferencias existentes entre el número de filas de fotorreceptores para las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de la retina) y para los diferentes grupos (rd10 no tratado, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg y 200 mg/kg de P4). La dosis de 150 mg/kg en la periferia lejana es la más efectiva respecto del grupo no tratado (\* $p < 0,05$  vs rd10 no tratado), mientras que en la periferia central la dosis de 200 mg/kg es la dosis que resulta más beneficiosa (\* $p < 0,05$  vs no tratado).

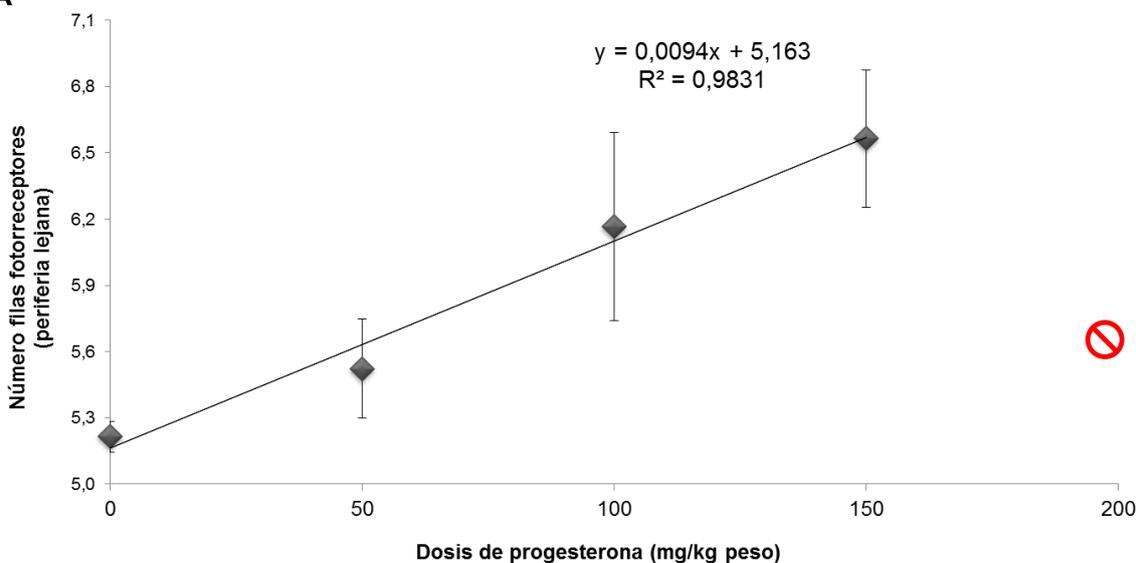


**Figura 28.** Representación gráfica del número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 en los diferentes grupos según la dosis de progesterona. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs no tratado).

## 2.2. Correlaciones del número de filas de fotorreceptores con la dosis creciente de progesterona

En la figura 29 se muestran los resultados del número de filas de fotorreceptores para la periferia lejana, en esta zona de la retina observamos que hay una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la dosis de P4 administrada (teniendo en cuenta hasta la dosis de 150 mg/kg) y el número de filas de fotorreceptores ( $R^2=0,9831$ ). Se observa que a mayor dosis de progesterona existe un mayor número de filas de fotorreceptores.

**A**



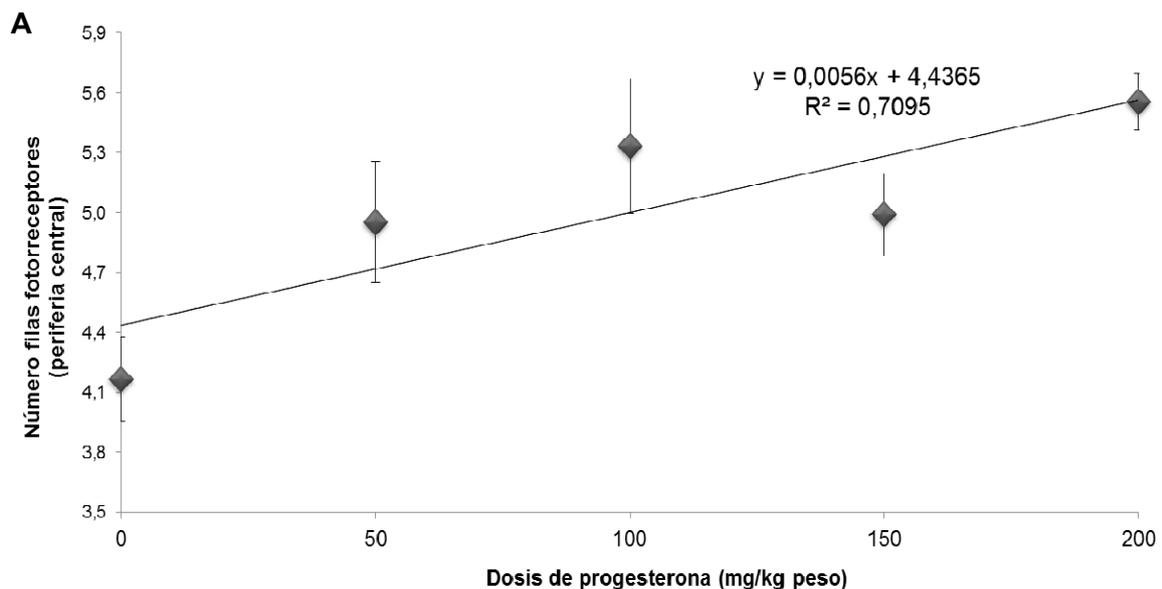
**B**

	No tratado	50 mg/kg prog	100 mg/kg prog	150 mg/kg prog	200 mg/kg prog
Media	5,21	5,52	6,17	6,56	5,73
Error estándar	0,07	0,23	0,43	0,31	0,13
n	7	7	6	7	6

**Figura 29.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en la periferia lejana de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio. (A) Regresión lineal de los diferentes grupos según la dosis ( $p < 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar de la media. El símbolo representa el punto en el que encontramos el número de filas de fotorreceptores correspondientes a la dosis de P4 de 200 mg/kg. (B) Medias del número de filas de fotorreceptores, errores estándar y n empleada en cada grupo.

En la periferia central (Figura 30), la correlación entre la dosis de P4 y el número de filas de fotorreceptores sigue siendo positiva pero es menor que en la periferia lejana ( $R^2=0,7095$ ) y no resulta ser estadísticamente significativa.

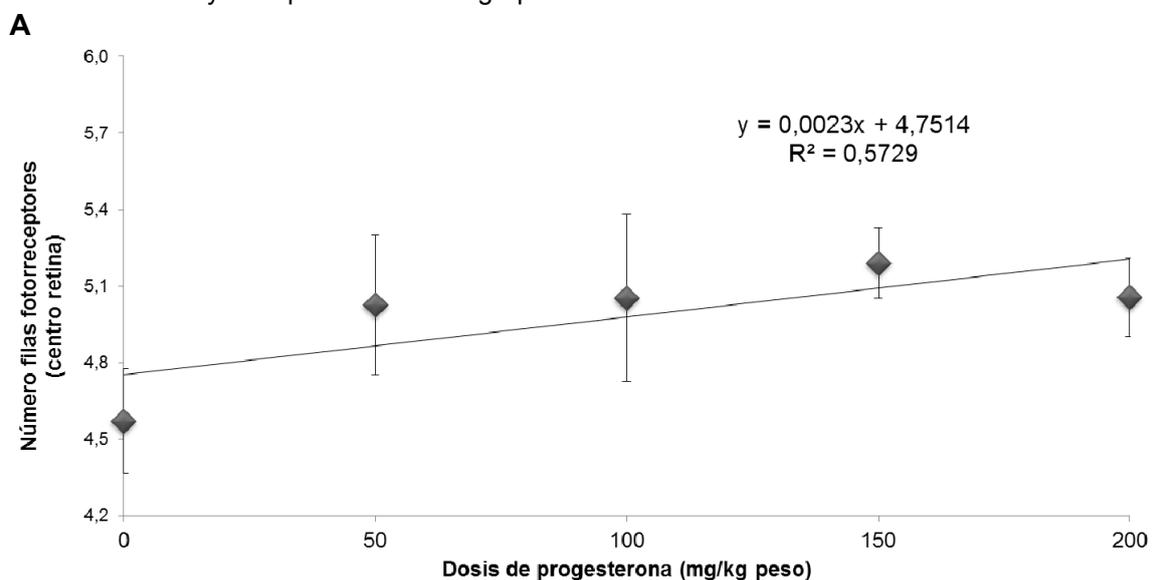
A su vez en el centro de la retina (Figura 31), no existe correlación entre el número de filas de fotorreceptores y la dosis de progesterona administrada. El coeficiente de correlación para la dosis de P4 y el número de filas de fotorreceptores es bajo ( $R^2=0,5729$ ).



**B**

	No tratado	50 mg/kg prog	100 mg/kg prog	150 mg/kg prog	200 mg/kg prog
Media	4,17	4,95	5,33	4,99	5,56
Error estándar	0,21	0,30	0,37	0,20	0,14
n	7	7	6	7	6

**Figura 30.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en la periferia central de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio. (A) Regresión lineal de los diferentes grupos según la dosis. Las barras de error representan el error estándar de la media. (B) Medias del número de filas de fotorreceptores, errores estándar y n empleada en cada grupo.



**B**

	No tratado	50 mg/kg prog	100 mg/kg prog	150 mg/kg prog	200 mg/kg prog
Media	4,57	5,02	5,06	5,10	5,06
Error estándar	0,21	0,27	0,33	0,11	0,15
n	7	7	6	7	6

**Figura 31.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y las diferentes dosis de progesterona en el centro de la retina de los ratones rd10 en los distintos grupos a estudio. (A) Regresión lineal en los diferentes grupos según la dosis. Las barras de error representan el error estándar de la media. (B) Medias del número de filas de fotorreceptores, errores estándar y n empleada en cada grupo.

### **3. La progesterona disminuye la muerte de los fotorreceptores en la retina de los ratones rd10**

Decidimos hacer experimentos con la dosis de P4 de 150 mg/kg administrada a los mismos días post-natales (PN15, PN17, PN19 y PN21) a los que se había administrado para los estudios con diferentes dosis de P4. El objetivo de ello fue estudiar el efecto del tratamiento de esta dosis, tanto en los ratones rd10 como en los controles (C57).

#### **3.1.1. Estudio histológico a día PN21**

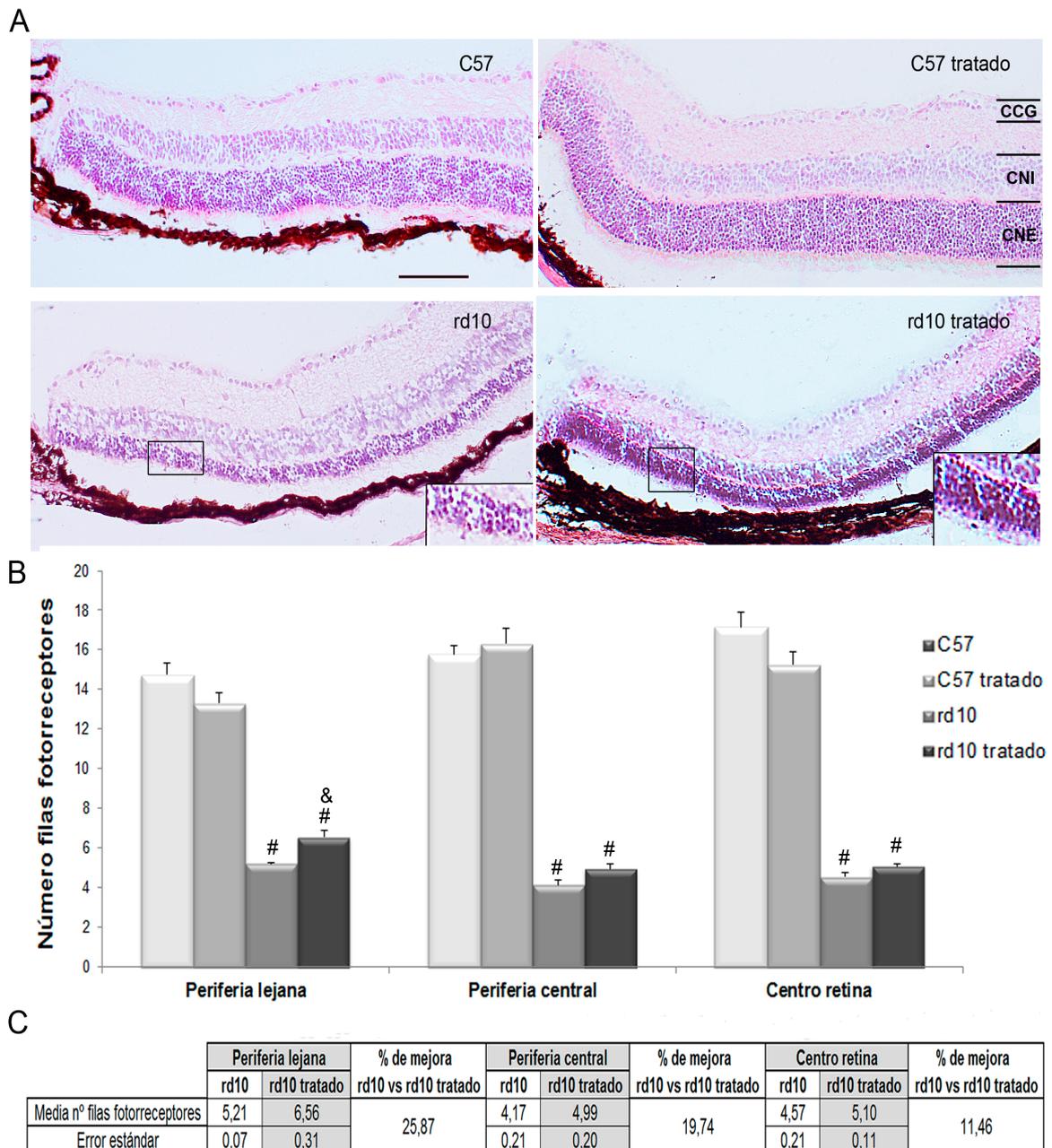
Se ha estudiado el efecto de la P4 a nivel de la degeneración en las diferentes zonas analizadas en la retina; periferia lejana, periferia central y centro de la retina y para los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado).

La figura 32 muestra de forma representativa la tinción de HE en la periferia lejana de la retina de los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) (Figura 32 A), así como el número de filas de fotorreceptores de las diferentes zonas (periferia lejana, periferia central, centro de la retina) de la retina en cada uno de los grupos (Figura 32 B).

En todas las zonas de la retina, el número de filas de fotorreceptores es menor en los ratones rd10 que en los C57 ( $^{\#}p < 0,05$  vs grupos C57). Si nos centramos en la periferia lejana hay un mayor número de filas de fotorreceptores en los ratones rd10 tratados respecto de los rd10 sin tratar ( $^{\&}p < 0,05$  vs rd10). En el resto de zonas; periferia central y centro de la retina, los animales rd10 que han sido tratados con P4 muestran una tendencia al aumento del número de filas de fotorreceptores aunque sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas.

Se muestra en la figura 32 C (tabla) el porcentaje de mejora en el número de filas de fotorreceptores en las diferentes zonas de la retina entre los grupos rd10 y rd10 tratado, observándose que existe una mejora en la zona de la periferia lejana con un aumento del número de filas de fotorreceptores de un 25,87%.

Del mismo modo, en el resto de zonas estudiadas, periferia central y centro de la retina, también existe un aumento del número de filas de fotorreceptores en un 19,74% y 11,46% respectivamente.

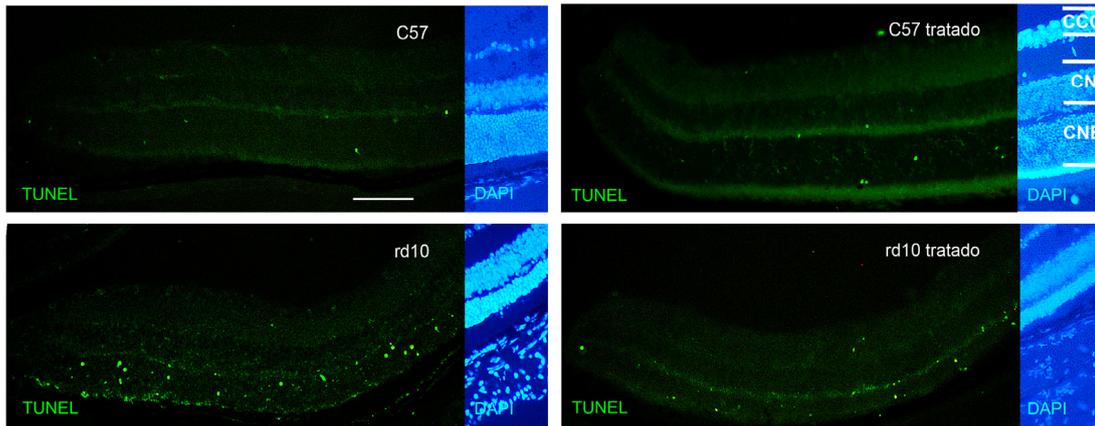


**Figura 32.** Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, tratados y no tratados a día PN21. (A) Hematoxilina-eosina de la periferia lejana de la retina de ratones C57, C57 tratados, rd10 y rd10 tratados a día PN21. Se muestra ampliación al triple de tamaño de la zona seleccionada. Escala 50  $\mu$ m. (B) Las barras del gráfico representan el número de filas de fotorreceptores 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 rd10;  $^{\#}$ p < 0,05 vs grupos C57). (C) Valores medios, errores estándar y porcentaje de mejora en el número de filas de fotorreceptores entre los grupos rd10 y rd10 tratado.

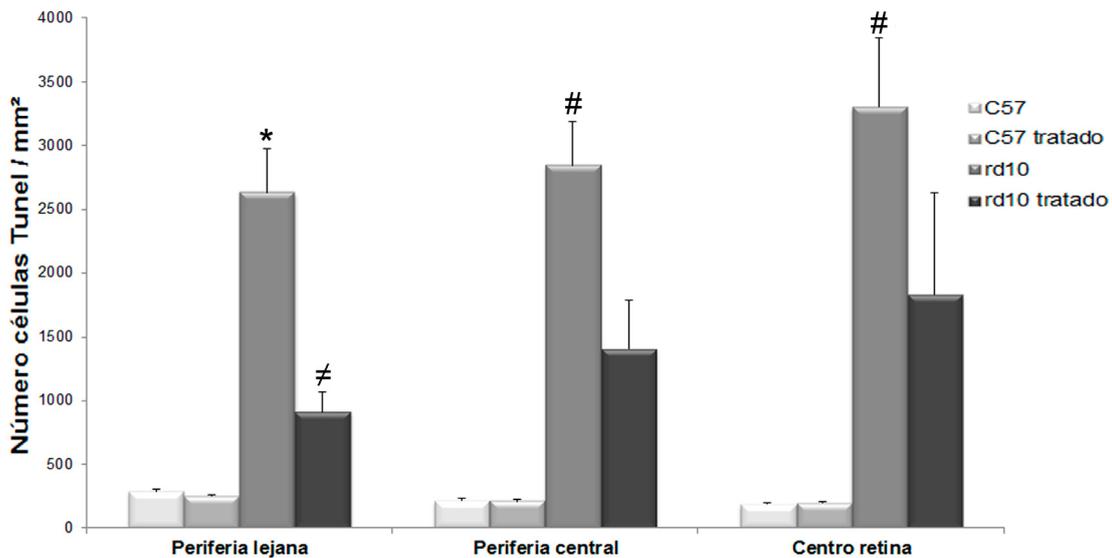
### 3.1.2. Estudio de la muerte celular a día PN21

La figura 33 muestra de forma representativa el marcaje de células TUNEL en la periferia lejana de la retina de los ratones de los diferentes grupos a estudio a día PN21 (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) (Figura 33 A). También se muestra el número de células TUNEL positivas por mm<sup>2</sup> en las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central, centro de la retina) en cada uno de los grupos (Figura 33 B).

A



B



C

	Periferia lejana		% de reducción TUNEL rd10 tratado vs rd10	Periferia central		% de reducción TUNEL rd10 tratado vs rd10	Centro retina		% de reducción TUNEL rd10 tratado vs rd10
	rd10	rd10 tratado		rd10	rd10 tratado		rd10	rd10 tratado	
Media nº céls. TUNEL/mm²	2633,55	912,43	65,35	2844,85	1408,49	50,49	3304,44	1832,34	44,55
Error estándar	337,56	157,24		338,88	382,84		536,81	800,63	

**Figura 33.** Tinción TUNEL en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd10 y C57, tratados y no tratados a día PN21. (A) Marcaje de células TUNEL positivas en la CNE de la periferia lejana en la retina de ratones C57, C57 tratados, rd10 y rd10 tratados a día PN21. Escala 50 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 todos los grupos, #p < 0,05 vs C57 tratado; #p < 0,05 vs grupos C57). (C) Valores medios, errores estándar y porcentaje de mejora entre los grupos rd10 y rd10 tratado.

El número de células TUNEL positivas es mayor en los ratones rd10 sin tratar respecto de todos los grupos en la periferia lejana (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos). Sin embargo, en esta zona el grupo rd10 tratado con P4 muestra una disminución en el número de células TUNEL positivas aunque sin llegar a valores control ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57 tratado).

También existe un número mayor de células TUNEL positivas en los ratones rd10 sin tratar respecto de los grupos C57 (C57 tratado y C57 no tratado) en la periferia central y en el centro de la retina ( $^{\#}p < 0,01$  vs grupos C57). En ambas zonas cabe destacar la disminución observada en el número de células TUNEL positivas de los animales rd10 que han sido tratados con P4, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

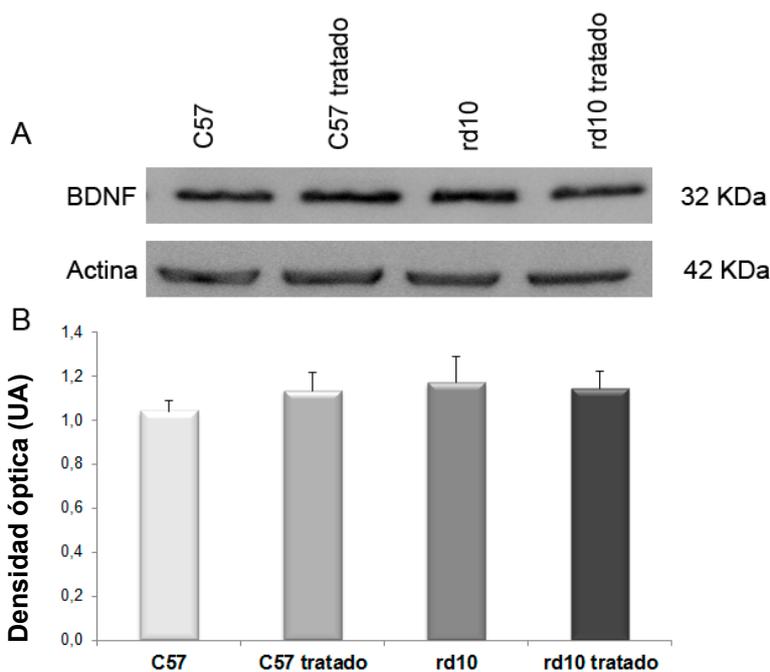
Se muestra en la figura 33 C (tabla) el porcentaje de reducción en el número de células TUNEL en las diferentes zonas de la retina entre los grupos rd10 y rd10 tratado. Se observa que la mayor reducción del número de células TUNEL positivas tiene lugar en la zona de la periferia lejana con más de un 65% de reducción. No obstante, en la periferia central y en el centro de la retina también se observa una disminución de dichas células de alrededor del 50% y del 40% respectivamente.

#### **4. Efecto de la progesterona sobre la expresión de las proteínas pCREB, CREB, iNOS, BDNF y LC3 en los ratones rd10 y C57**

Con la finalidad de tratar de elucidar el posible mecanismo de acción de la P4 se evaluaron los niveles de expresión para diferentes proteínas implicadas en la neuroprotección y en la inflamación en enfermedades neurodegenerativas, estos son: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; brain-derived neurotrophic factor), la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS; inducible nitric oxide synthase), el elemento fosforilado de unión y respuesta al AMPc (pCREB; phosphorylated cAMP response element-binding), el elemento de unión y respuesta al AMPc (CREB; cAMP response element-binding) y el anticuerpo de autofagia de cadena ligera 3 (LC3; light chain).

#### 4.1. BDNF

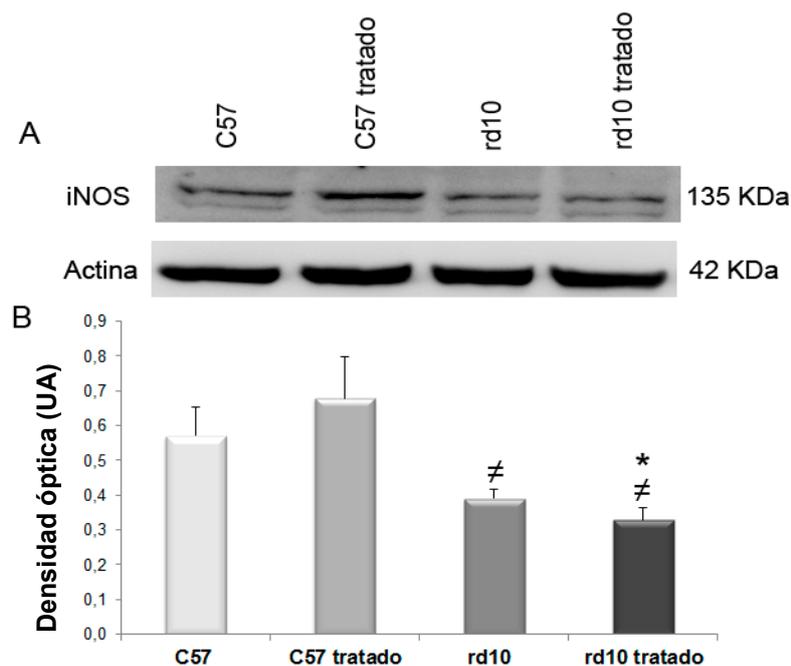
La figura 34 representa la imagen del western blot y los valores obtenidos tras la cuantificación para la proteína BDNF respecto de la actina. La detección del BDNF corresponde a la banda de su precursor o forma inmadura, pro-BDNF. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos a estudio a día PN21. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en los valores de BDNF en los diferentes grupos.



**Figura 34.** Detección de la proteína BDNF por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21. (A) Imagen del WB para la proteína BDNF en cada grupo experimental (n=4 por grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de BDNF/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media.

#### 4.2. iNOS

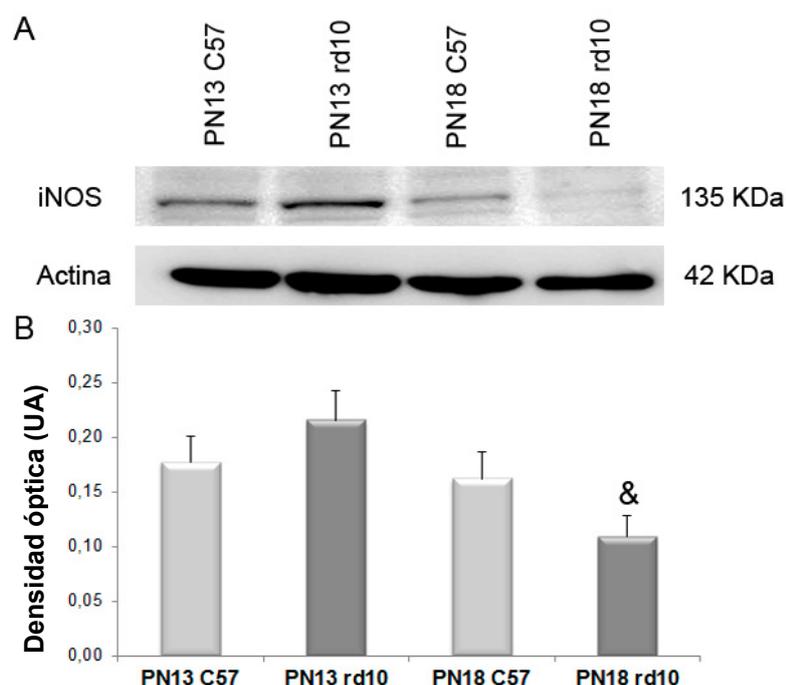
En la figura 35, se muestra la cuantificación de la proteína iNOS a día PN21 en la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado. Existe una disminución estadísticamente significativa de los valores de densidad óptica de iNOS a día PN21 en los ratones rd10 frente al grupo C57 tratado ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57 tratado) y de los ratones rd10 tratados frente a los controles (C57 tratado y C57 no tratado) ( $*p < 0,05$  vs C57;  $^{\#}p < 0,05$  vs C57 tratado).



**Figura 35.** Detección de la proteína iNOS por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21. (A) Imagen del WB para la proteína iNOS en cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de iNOS/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\hat{p} < 0,05$  vs C57;  $\hat{*}p < 0,05$  vs C57 tratado).

Debido al poco marcaje observado en los grupos rd10 (tratado y no tratado) a día PN21, se estudió el marcaje de iNOS a los días PN13 y PN18, pues se hipotetizó que debido a la gran falta de fotorreceptores a día PN21 y a la posible producción de iNOS en estas células, los ratones rd10 a día PN21 no fuesen capaces de mostrar más marcaje que el observado.

En la figura 36 se muestra la cuantificación de iNOS en los ratones no tratados a día PN13 y PN18. Hay una disminución estadísticamente significativa en los ratones rd10 a día PN18 respecto de los ratones rd10 a PN13 ( $\hat{*}p < 0,05$  vs PN13 rd10).

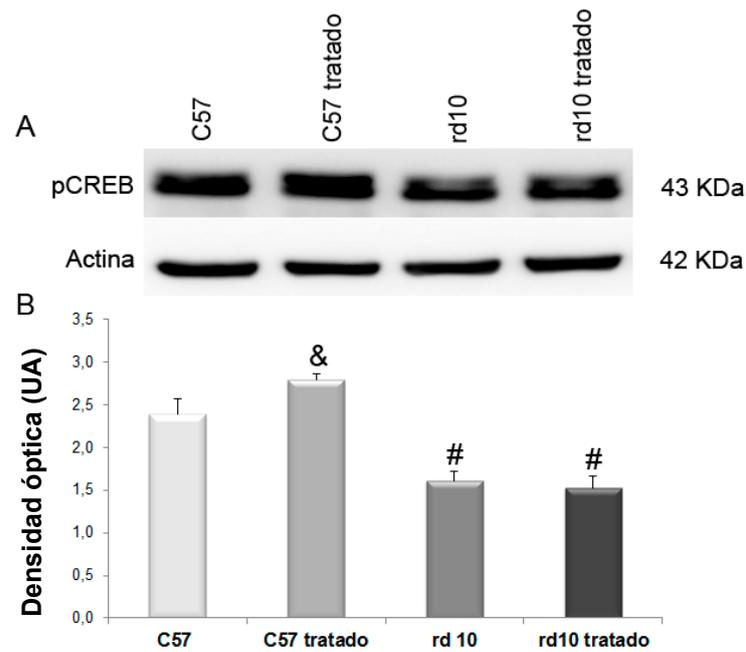


**Figura 36.** Detección de la proteína iNOS por WB a día PN13 y PN18 en los grupos C57 y rd10 (A) Imagen del WB para la proteína iNOS en cada grupo experimental (n=3 por grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de iNOS/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media (&p < 0,05 vs PN13 rd10).

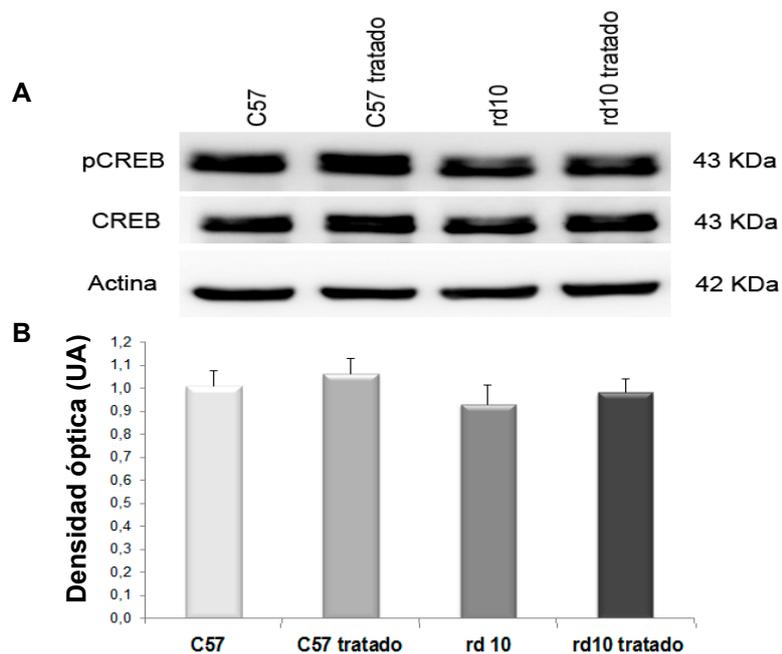
### 4.3. pCREB/CREB

La figura 37 representa la imagen del western blot y los valores obtenidos tras la cuantificación para la proteína pCREB respecto de la actina, mientras que la figura 38 muestra el ratio pCREB/CREB, ya que la forma fosforilada (pCREB) es la que puede cambiar su expresión bajo diferentes condiciones. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) a día PN21.

De forma más detallada, la figura 37 muestra un aumento estadísticamente significativo de la proteína pCREB en los controles tratados con P4 respecto de los controles sin tratar (&p < 0,05 vs C57). Además, se observa una disminución estadísticamente significativa entre los valores de la proteína pCREB de los ratones rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado), respecto a los encontrados en los ratones C57 (C57 tratado y C57 no tratado) (#p < 0,05 vs grupos C57). No existen alteraciones en el ratio pCREB/CREB a día PN21 para los grupos estudiados como se puede ver en la figura 38.



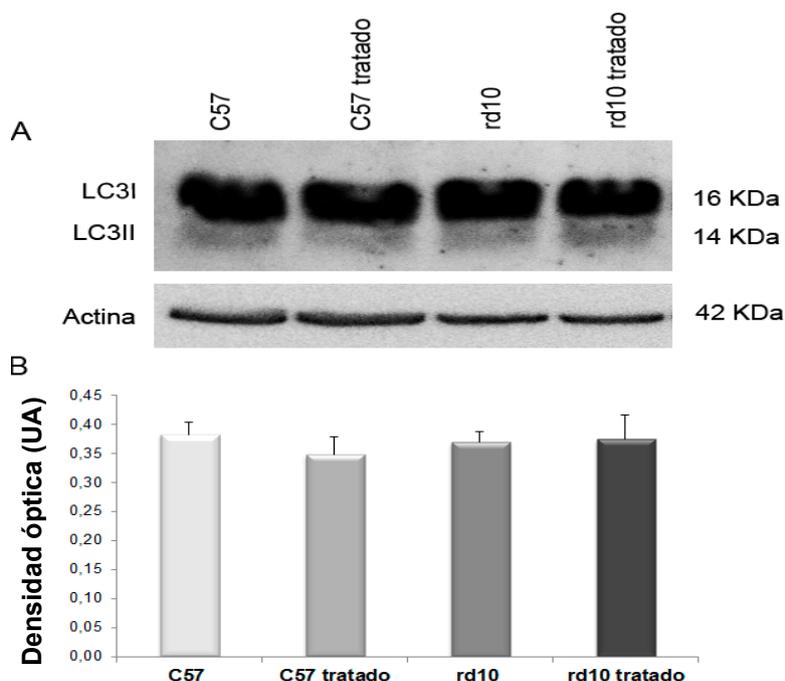
**Figura 37.** Detección de la proteína pCREB por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21. (A) Imagen del WB para la proteína pCREB en cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (ratio de pCREB/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media (<sup>&</sup>p< 0,05 vs C57 y <sup>#</sup>p< 0,05 vs grupos C57).



**Figura 38.** Detección de la proteína pCREB/CREB por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21. (A) Imagen del WB para la proteína pCREB y CREB en cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (ratio de pCREB/CREB) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media.

#### 4.4. LC3

La figura 39 representa la imagen del western blot y los valores obtenidos tras la cuantificación para la proteína LC3II respecto de la subunidad LC3I. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) a día PN21. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la densidad óptica del ratio LC3II/LC3I en los diferentes grupos a estudio.



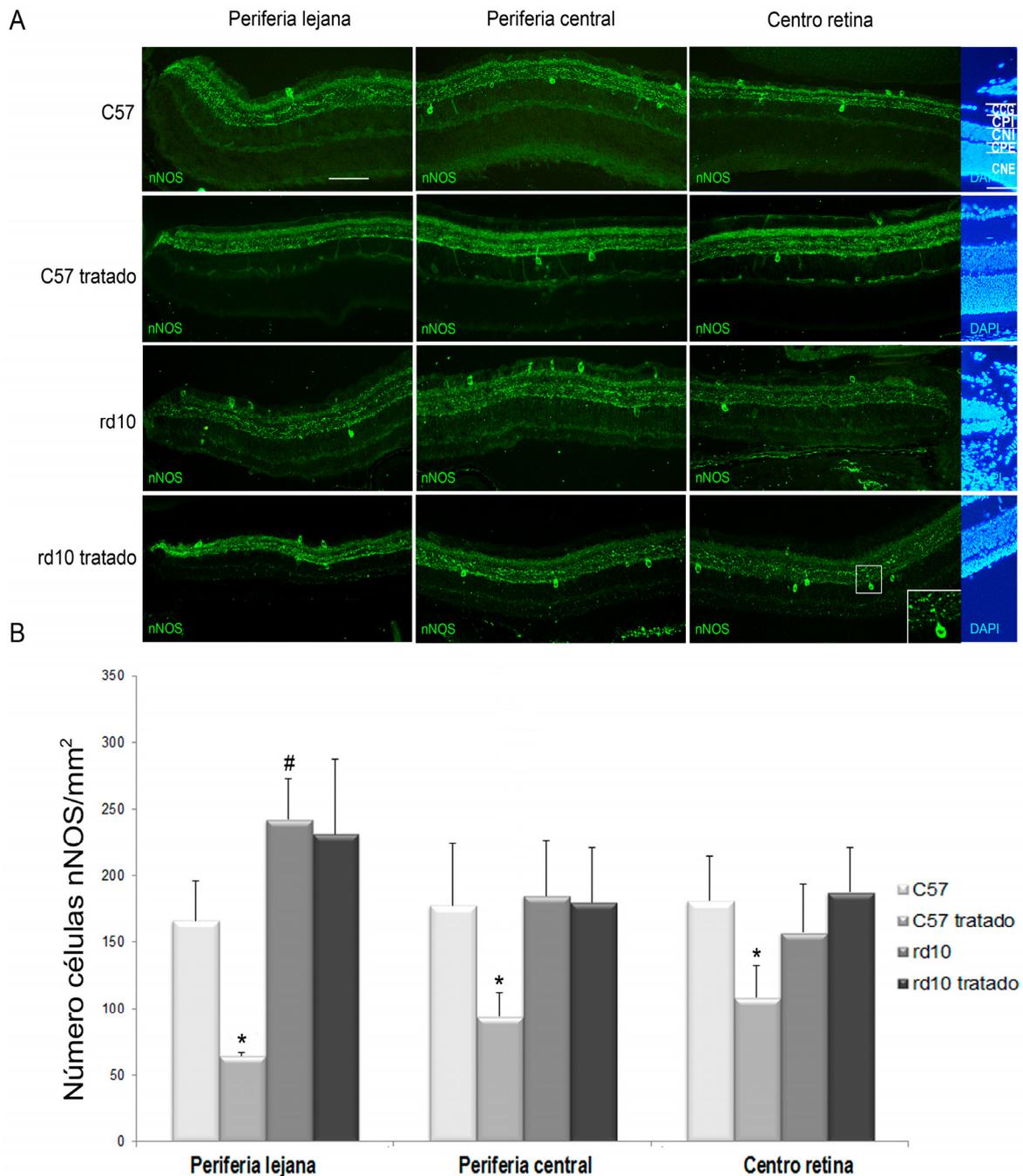
**Figura 39.** Detección de la proteína LC3 por WB en los diferentes grupos a estudio a día PN21. (A) Imagen del western blot para la proteína LC3 en cada grupo experimental. (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (ratio de LC3II/LC3I) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media.

### 5. La progesterona altera la óxido nítrico sintetasa neuronal

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de la P4 sobre la expresión de la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS; nitric oxide synthase), se ha estudiado el marcaje mediante inmunofluorescencia de la proteína nNOS a día PN21 en las diferentes zonas de la retina.

La figura 40 muestra que de forma generalizada para todos los grupos y zonas, existe marcaje de nNOS en la capa de células ganglionares (CCG), en la CPI y en las células amacrinas de la CNI. De forma más concreta, en todas las zonas de la retina hay una disminución estadísticamente significativa del nNOS en los ratones C57 tratados con P4 respecto del resto de grupos a estudio (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos). A su vez, en la

periferia lejana se observa un aumento de la proteína nNOS en los ratones rd10 no tratados respecto del grupo C57 no tratado ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57).



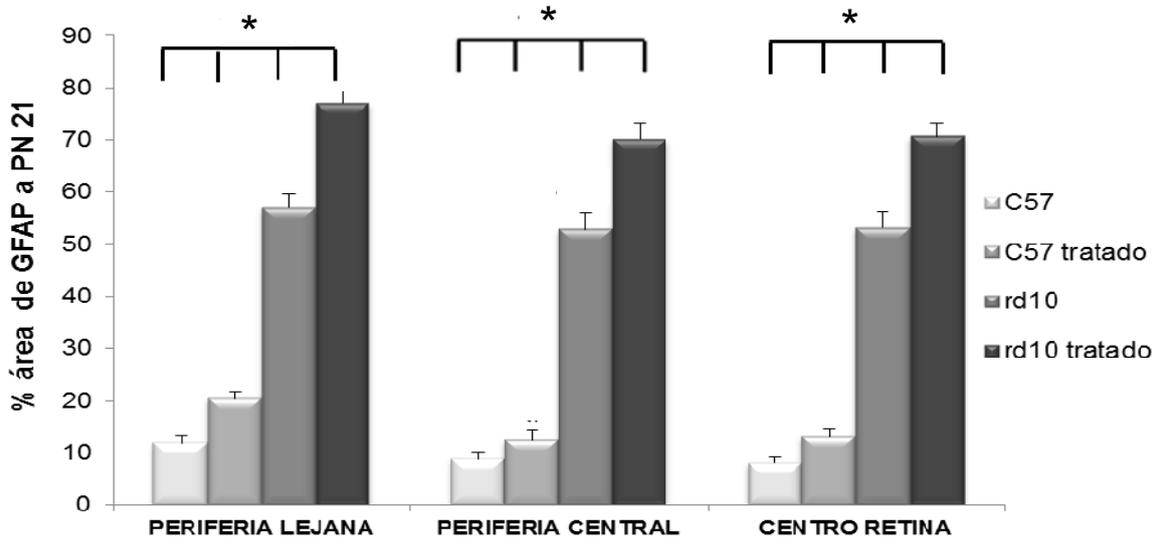
**Figura 40.** Inmunofluorescencia para nNOS en las diferentes zonas de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21. (A). Marcaje de nNOS en la retina, (capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme externa (CPE) y capa nuclear externa (CNE) de la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21. Se muestra la ampliación al doble de tamaño de una de las células marcadas con nNOS cuyo soma se sitúa en la CNI. Escala 50  $\mu$ m. (B) Las barras representan el número de células nNOS en la retina interna en dichas cepas (n=4 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media ( $^*p < 0,05$  vs todos los grupos;  $^{\#}p < 0,05$  vs C57).

## 6. El tratamiento con progesterona provoca alteraciones en el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd10

### 6.1. Cuantificación de la gliosis reactiva en el modelo de ratón rd10 y C57 a día PN21 y PN23

Durante el proceso de degeneración en el modelo de ratón rd10 tiene lugar un aumento de la gliosis en la retina y de la reactividad de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP; glial fibrillary acidic protein) que marca la glía (células de Müller) (Fitzgerald et al., 1990, Kim et al., 1998, Fletcher et al., 2010, Prentice et al., 2011). Con el objetivo de evaluar el posible efecto de la P4 sobre la gliosis reactiva característica en esta degeneración, se ha estudiado el marcaje de la proteína GFAP en las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de la retina) a día PN21. Además, con el objetivo de evaluar el efecto de la P4 en la evolución de la gliosis se ha realizado el mismo estudio a día PN23.

La figura 41 muestra la cuantificación del área ocupada del GFAP a día PN21 para los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) en cada una de las zonas de la retina. En concreto, en todas las zonas de la retina existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de animales (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos).

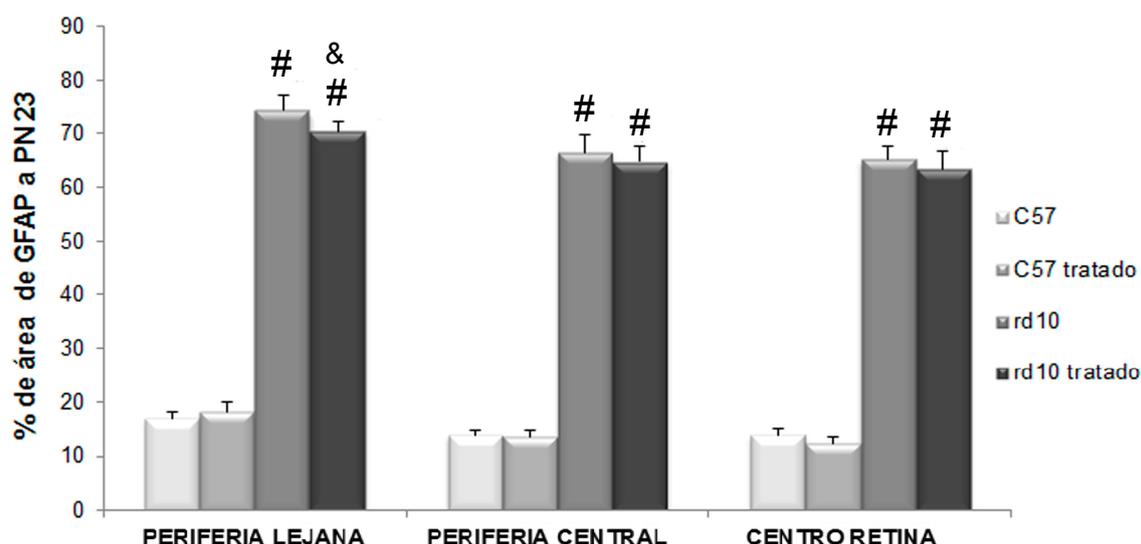


**Figura 41.** Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21. Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas para los citados grupos (n=4 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media. Los corchetes representan que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos).

La figura 42 muestra la cuantificación del área ocupada del GFAP a día PN23 para los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) en cada una de las zonas de la retina.

En concreto, en la zona de la periferia lejana se observa una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de GFAP en el grupo rd10 tratado con P4 respecto del rd10 no tratado ( $^{\&}p < 0,05$  vs rd10 no tratado).

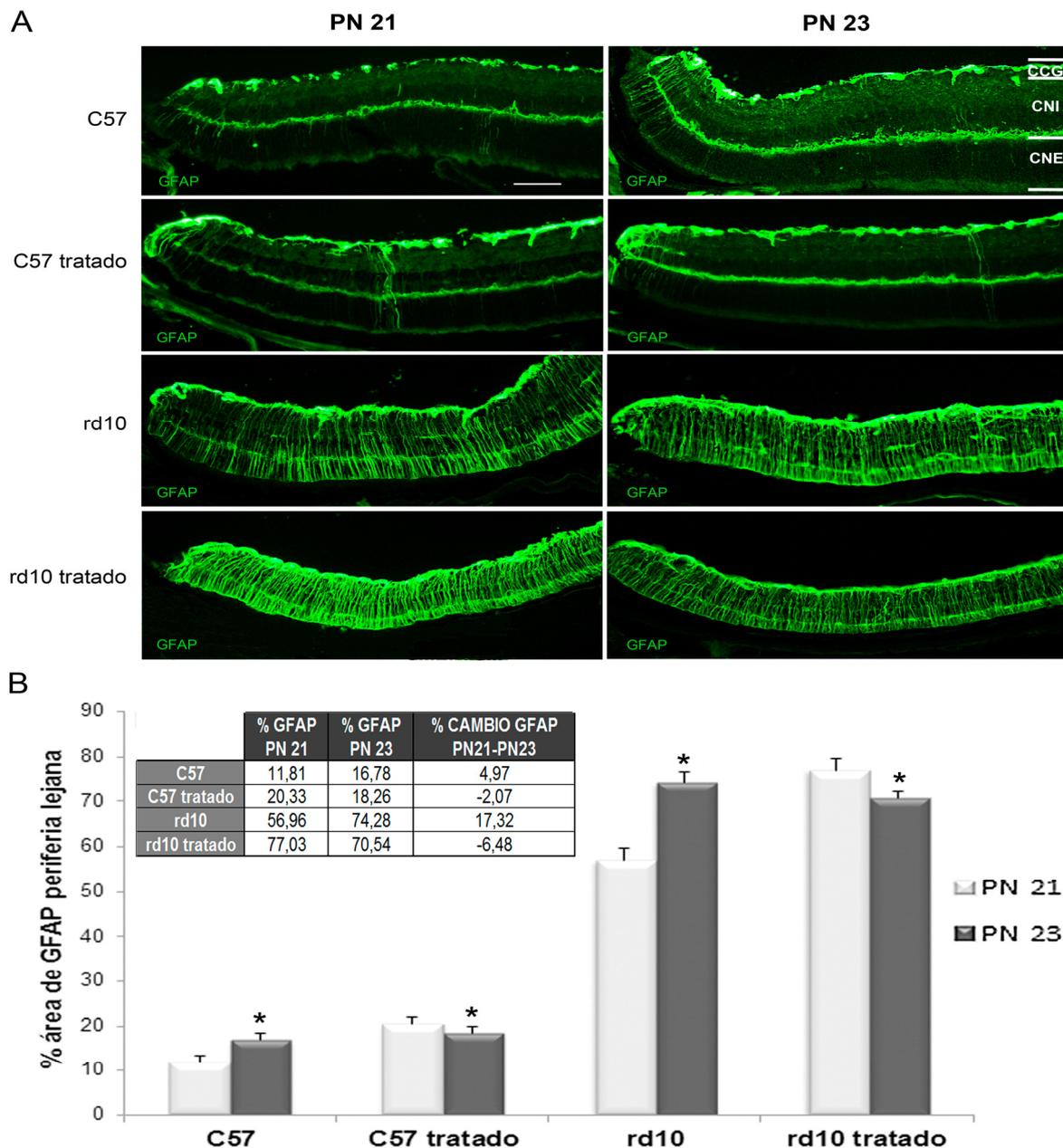
Además, hay un aumento estadísticamente significativo en la cuantificación del área ocupada por la proteína GFAP en las cepas de ratones rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado) respecto de ambos controles (C57 tratado y C57 no tratado) para cada una de las zonas de la retina estudiadas a día PN23 ( $^{\#}p < 0,05$  vs grupos C57).



**Figura 42.** Representación gráfica de la cuantificación del área ocupada por las células GFAP positivas en la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN23. Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas para los citados grupos (al menos n=4 ratones por grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media ( $^{\&}p < 0,05$  vs rd10;  $^{\#}p < 0,05$  vs grupos C57).

## 6.2. Comparación de la gliosis reactiva en el modelo de ratón rd10 y C57 a día PN21 y PN23

Con la finalidad de evaluar el papel de la P4 en la gliosis a lo largo del tiempo se ha realizado la comparación del marcaje de la proteína GFAP entre los días PN21 y PN23 para cada uno de los grupos (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) y en las diferentes zonas de la retina (periferia lejana, periferia central y centro de la retina).



**Figura 43.** Inmunofluorescencia para GFAP en la periferia lejana de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23. (A) Marcaje de GFAP en la periferia lejana. Escala 50  $\mu$ m. (B, gráfico) Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs PN21). (B, tabla) Valores medios del porcentaje del área ocupada por el marcaje GFAP. También se muestra el porcentaje de cambio (aumento o disminución del marcaje) en el área de GFAP entre los días PN21 y PN23.

La figura 43 muestra el marcaje (Figura 43 A) y la cuantificación de la proteína GFAP (Figura 43 B, gráfico) en la periferia lejana de la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23. Se observa la evidencia de la gliosis reactiva típica de los ratones rd10, que se ve aumentada a PN23 para el grupo

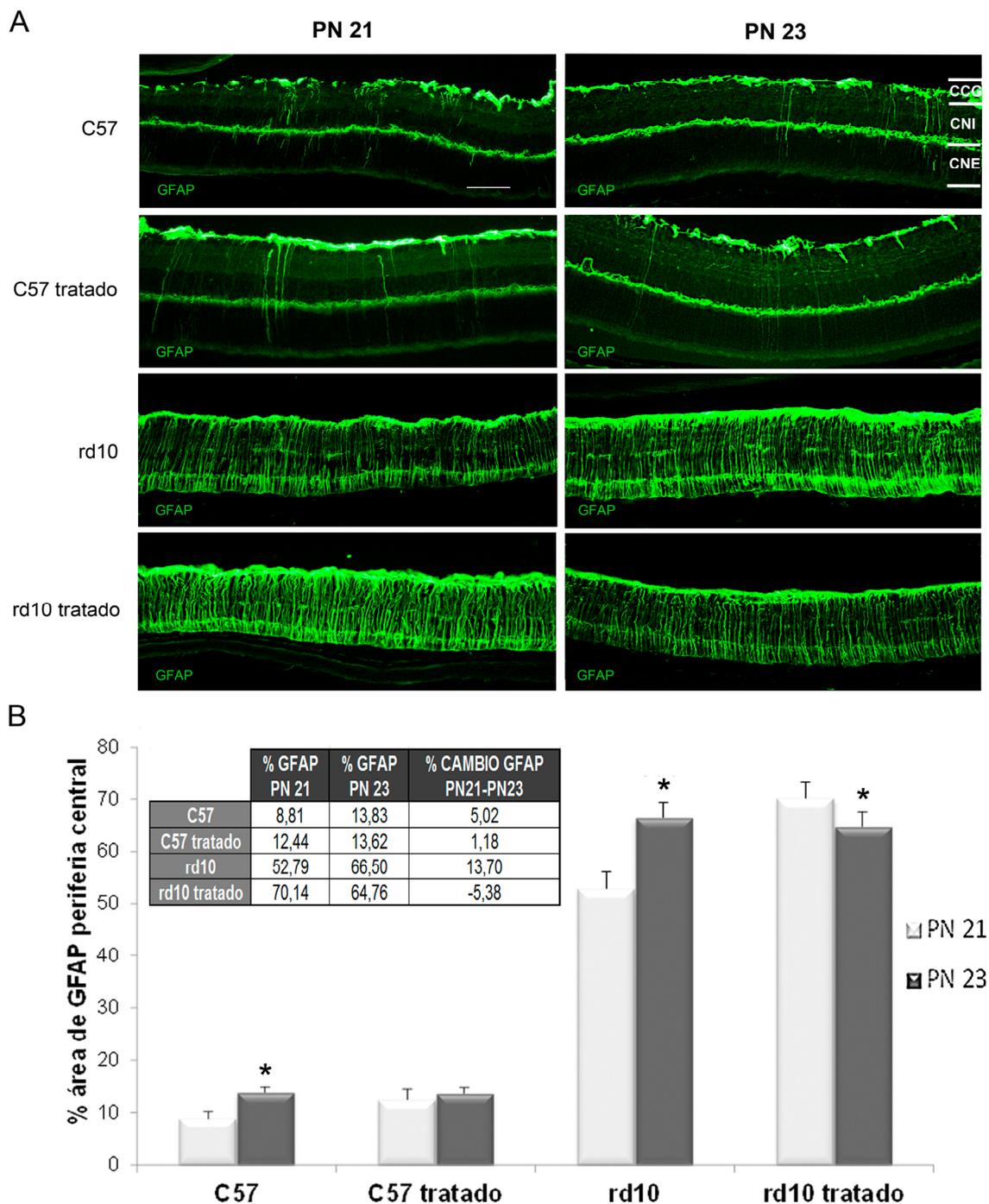
rd10 sin tratamiento respecto de PN21 (\* $p < 0,05$  vs PN21), el aumento es de más de un 17% (Figura 43 B, tabla). Del mismo modo, también tiene lugar un aumento estadísticamente significativo del marcaje para GFAP entre los días PN21 y PN23, dentro del grupo C57 sin tratamiento (\* $p < 0,05$  vs PN21), aunque es menor que el aumento observado en los ratones rd10 siendo de casi el 5%.

Sin embargo, para los grupos tratados con P4 (C57 tratado y rd10 tratado) se produce una disminución estadísticamente significativa de la gliosis con el paso de los días. La disminución es de un 6% para el caso del rd10 tratado (\* $p < 0,05$  vs PN21) y de un 2% para el grupo C57 tratado (\* $p < 0,05$  vs PN21).

La figura 44 (página 138) muestra el marcaje (Figura 44 A) y la cuantificación de la proteína GFAP (Figura 44 B, gráfico) en la periferia central de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23.

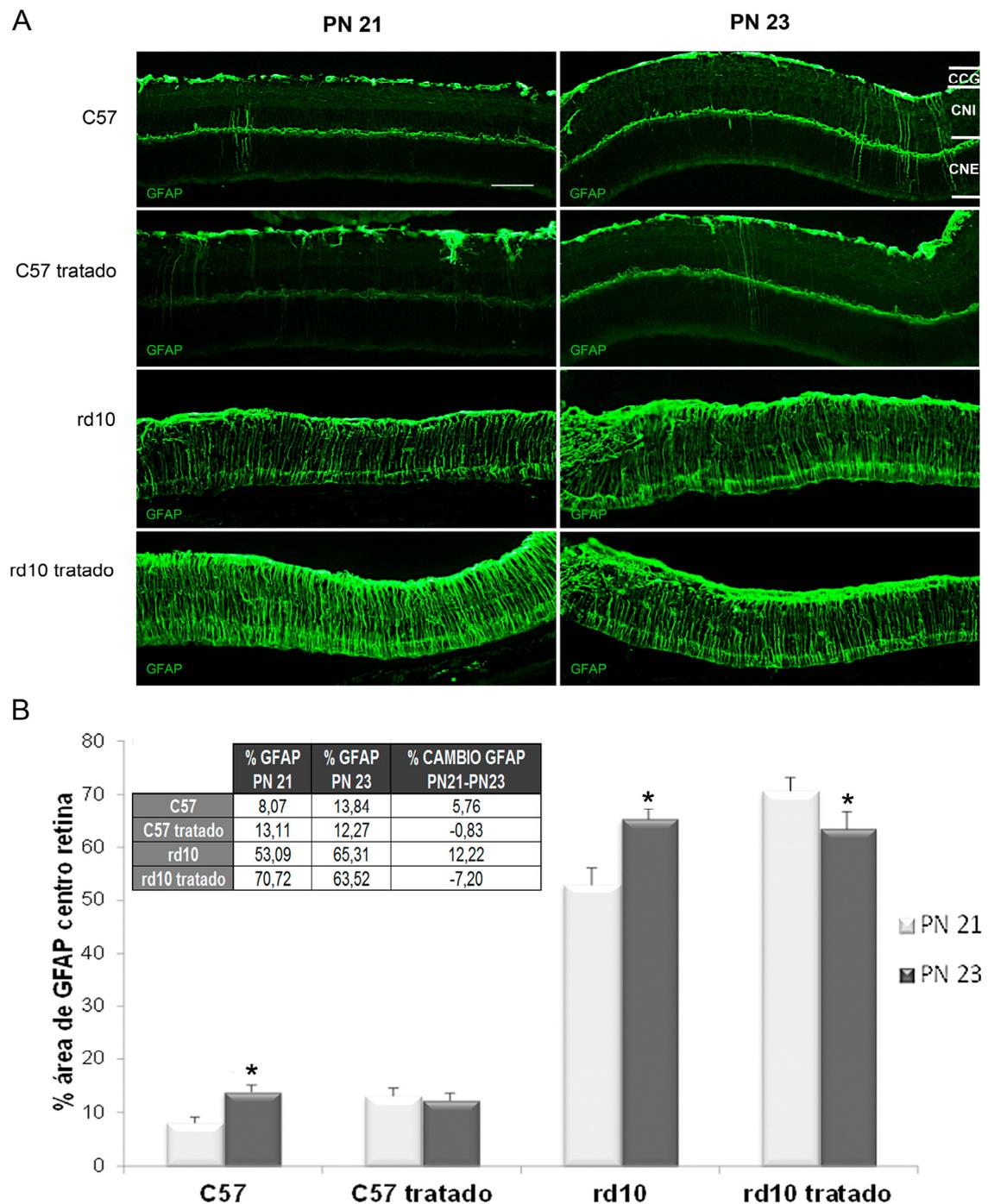
Se observa la evidencia de la gliosis reactiva típica de esta degeneración en los ratones rd10, que se ve aumentada estadísticamente a día PN23 en el grupo rd10 sin tratamiento respecto del día PN21 (\* $p < 0,05$  vs PN21), el aumento es de más de un 13% (Figura 44 B, tabla). Del mismo modo, también se produce un aumento estadísticamente significativo del marcaje para GFAP entre los días PN21 y PN23, dentro del grupo C57 sin tratamiento (\* $p < 0,05$  vs PN21), siendo este aumento del 5%.

No obstante, para el grupo rd10 tratado con P4 (rd10 tratado) existe una disminución de la gliosis con el paso de los días, siendo dicha disminución estadísticamente significativa (\* $p < 0,05$  vs PN21), con más de un 5% de reducción del marcaje de GFAP.



**Figura 44.** Inmunofluorescencia para GFAP en la periferia central de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23. (A) Marcaje de GFAP en la periferia central. Escala 50  $\mu$ m. (B, gráfico) Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $*p < 0,05$  vs PN21). (B, tabla) Valores medios del porcentaje del área ocupada por el marcaje GFAP. También se muestra el porcentaje de cambio (aumento o disminución del marcaje) en el área de GFAP entre los días PN21 y PN23.

La figura 45 muestra el marcaje (Figura 45 A) y la cuantificación de la proteína GFAP (Figura 45 B, gráfico) en el centro de la retina de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23.



**Figura 45.** Inmunofluorescencia para GFAP en el centro de la retina de los ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a los días PN21 y PN23 (A) Marcaje de GFAP en el centro de la retina. Escala 50  $\mu$ m. (B, gráfico) Las barras representan el porcentaje de área ocupada por las células GFAP positivas. Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs PN21). (B, tabla) Valores medios del porcentaje de área ocupada por el marcaje GFAP. También se muestra el porcentaje de cambio (aumento o disminución del marcaje) en el área de GFAP entre los días PN21 y PN23.

Al igual que sucede en la periferia central, en el centro de la retina se observa la evidencia de la gliosis reactiva típica de esta degeneración en los grupos de ratones

PN21 (\* $p < 0,05$  vs PN21), el aumento es de más de un 12% (Figura 45 B, tabla). Del mismo modo, también hay un aumento estadísticamente significativo del marcaje para GFAP entre los días PN21 y PN23, dentro del grupo C57 sin tratamiento (\* $p < 0,05$  vs PN21), siendo este aumento de más del 5%.

No obstante, para el grupo rd10 tratado con P4 existe una disminución de la gliosis con el paso de los días. Dicha disminución es estadísticamente significativa (\* $p < 0,05$  vs PN21), con más de un 7% de reducción del marcaje de GFAP.

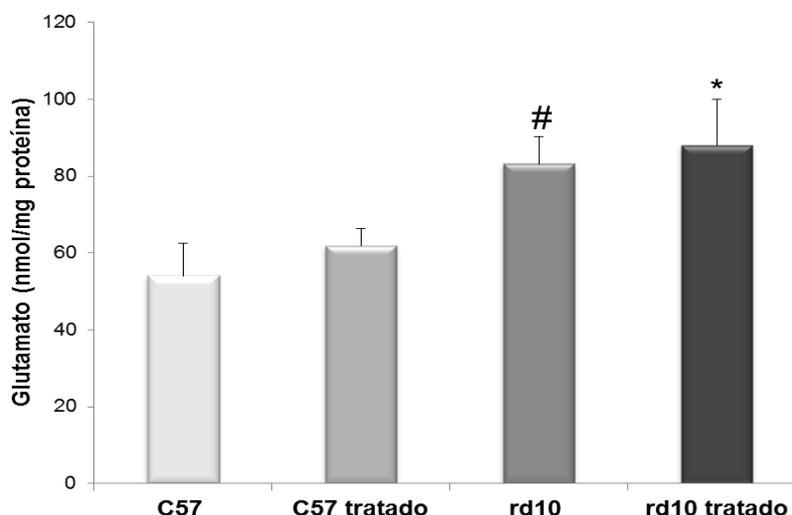
## 7. La progesterona reduce el estrés oxidativo

### 7.1. Efecto de la progesterona sobre el glutamato, GSH y GSSG a día PN21

Se ha estudiado el posible efecto de la P4 sobre las concentraciones en la retina de glutamato y glutatión tanto en su forma reducida (GSH), como oxidada (GSSG) a día PN21.

#### 7.1.1. Concentraciones de glutamato

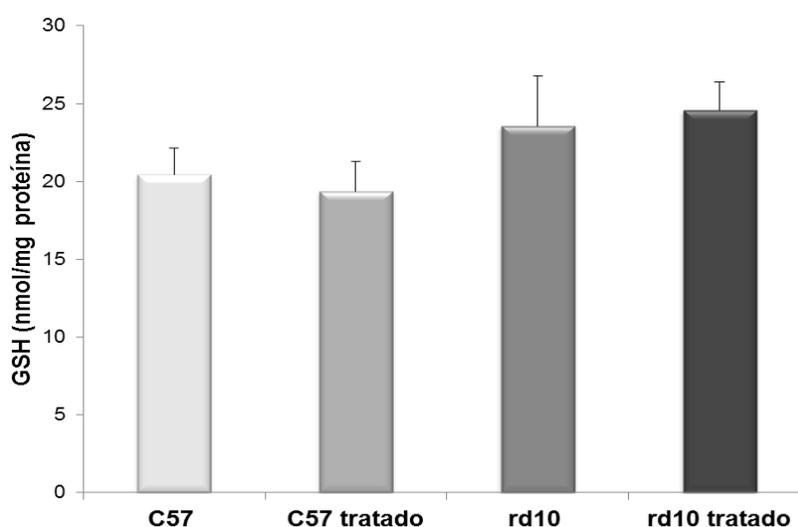
La figura 46 muestra la cuantificación de la concentración retiniana de glutamato en los grupos C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado. Existe un aumento de la concentración de glutamato en la retina en los ratones de la cepa rd10 respecto de los grupos control (\* $p < 0,05$  vs grupos C57; # $p < 0,05$  vs C57).



**Figura 46.** Concentraciones de glutamato (nmol/mg proteína) en la retina de los ratones de los diferentes grupos a día PN21, obtenidas por HPLC. Las barras representan la concentración media de glutamato (al menos  $n=5$  de cada grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs grupos C57; # $p < 0,05$  vs C57).

### 7.1.2. Concentraciones de GSH

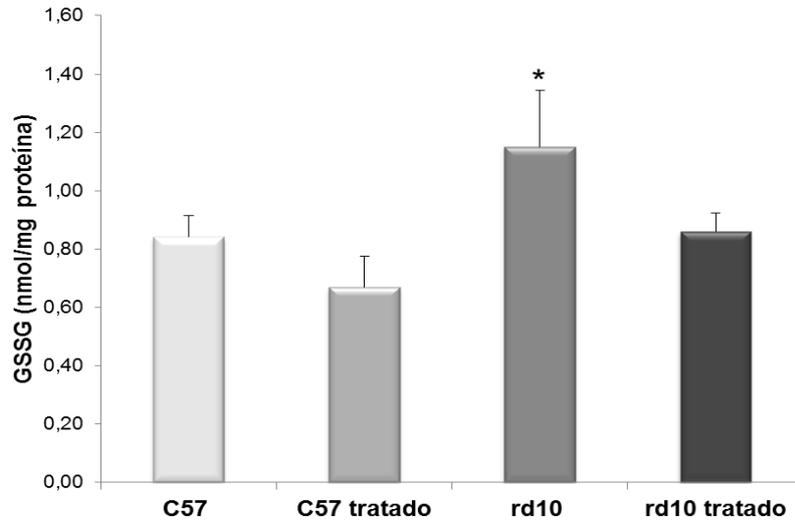
La figura 47 muestra la representación de la concentración retiniana de GSH para los grupos de estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado). Hay una tendencia al aumento de la concentración de GSH en la retina en los ratones rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado) aunque sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 47.** Concentraciones de GSH (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC. Las barras representan la concentración media (al menos n=5 de cada grupo) de los valores de GSH. Las barras de error representan el error estándar de la media.

### 7.1.3. Concentraciones de GSSG

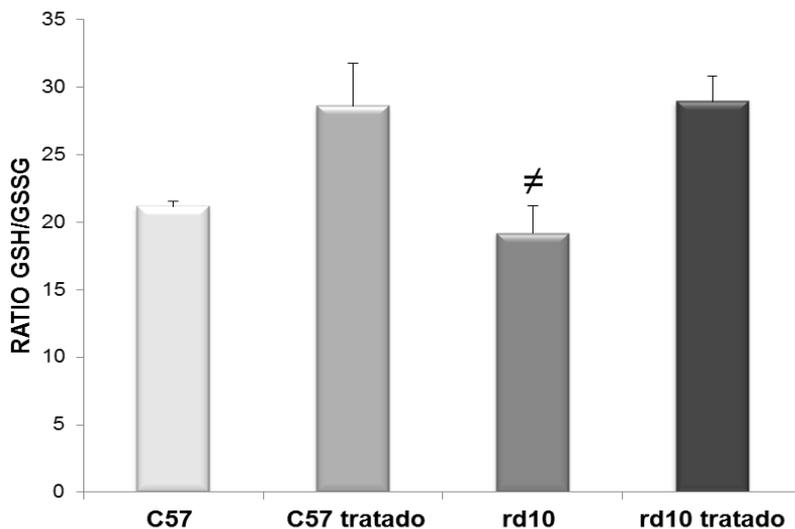
En la figura 48 (página 142) se representan los valores correspondientes a las concentraciones de GSSG en la retina para los distintos grupos estudiados. Existe un aumento en la concentración retinal del GSSG en el grupo rd10 no tratado, incremento estadísticamente significativo respecto al grupo C57 tratado (\* $p < 0,05$  vs C57 tratado). De modo que en la retina de los ratones de los grupos C57 (C57 tratado y C57 no tratado) y rd10 tratado se observaron concentraciones inferiores de GSSG que en el grupo rd10 no tratado.



**Figura 48.** Concentraciones de GSSG (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC. Las barras representan la concentración media (al menos n=5 de cada grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media (\*p< 0,05 vs C57 tratado).

#### 7.1.4. Ratio GSH/GSSG

Finalmente, la figura 49 muestra la representación del ratio de concentraciones de GSH y GSSG en la retina de los diferentes grupos de ratones a día PN21.



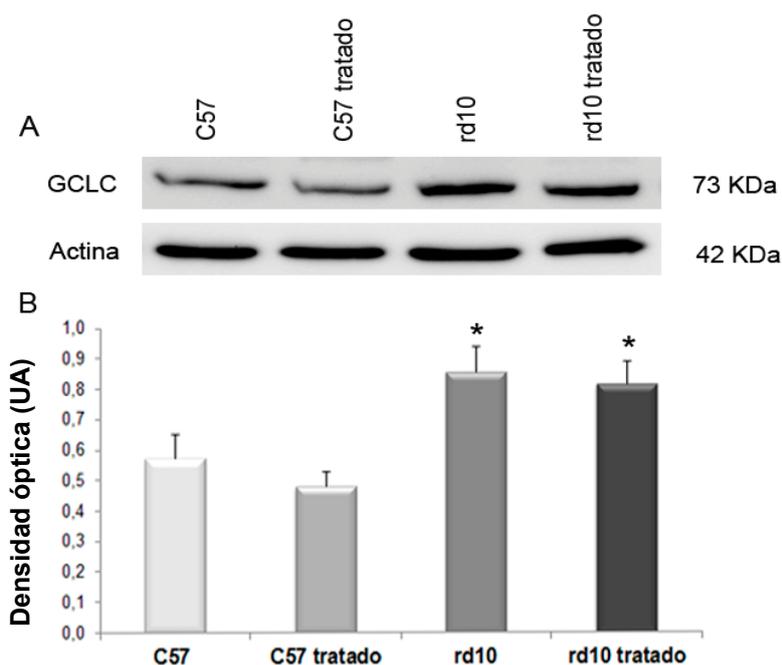
**Figura 49.** Ratio de las concentraciones (nmol/mg proteína) de GSH/GSSG en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21. Las barras representan la concentración media (al menos n=5 de cada grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media (≠p< 0,05 vs C57 tratado y rd10 tratado).

Se puede observar una disminución del ratio GSH/GSSG en la retina del grupo rd10 sin tratar respecto de los grupos tratados con P4 (rd10 tratado y C57 tratado con P4) ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57 tratado y rd10 tratado), por lo que el hecho de tratar los ratones P4 da lugar a un aumento del ratio GSH/GSSG.

## 7.2. Cuantificación de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica mediante western blot a día PN21

Dada la alteración observada en los valores del ratio GSH/GSSG, se han estudiado los niveles de expresión de la enzima glutamato cisteína ligasa catalítica (GCLC), enzima clave en la síntesis de *ново* del GSH, con la finalidad de evaluar si la P4 puede provocar alguna alteración en esta enzima y si el aumento de la síntesis de GSH en la cepa de ratones rd10 puede ser debida a la activación de la enzima GCLC.

La figura 50 muestra un aumento en la expresión de la enzima en la cepa rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado) respecto de los ratones de los grupos C57 (C57 tratado y C57 no tratado) ( $*p < 0,05$  vs grupos C57). No obstante, no existen diferencias dentro de cada una de las cepas entre los grupos tratados con P4 y sin tratar.



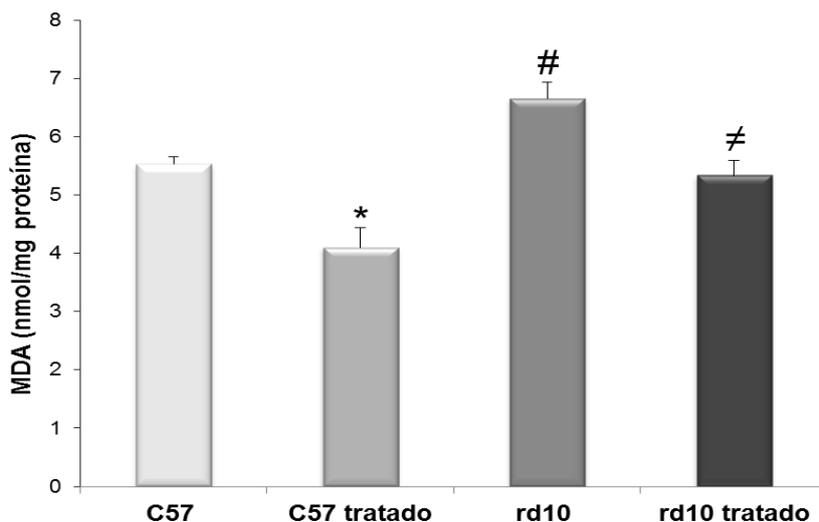
**Figura 50.** Detección de la proteína GCLC por WB en los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) a día PN21. (A) Imagen del western blot para la proteína GCLC en cada grupo experimental (al menos  $n=5$  de cada grupo). (B) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (expresado como el ratio de GCLC/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $*p < 0,05$  vs grupos C57).

### 7.3. Efecto de la progesterona sobre la peroxidación lipídica

#### 7.3.1. Determinación del malondialdehído a día PN21

Se han determinado las concentraciones de malondialdehído (MDA) en la retina a día PN21 de los diferentes grupos a estudio (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado) para establecer el posible papel de la P4 en la peroxidación lipídica.

La figura 51 muestra que existe un aumento estadísticamente significativo en la concentración de MDA en la retina los ratones rd10 sin tratar respecto del grupo C57 sin tratar ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57). Además, el tratamiento con P4 en los ratones rd10 es capaz de disminuir los niveles de MDA respecto del grupo rd10 no tratado llegando a valores control, aunque se observa aumentado respecto de la otra cepa tratada con P4, la C57 ( $^{\#}p < 0,05$  vs C57 tratado y rd10). A su vez, tal disminución también es observada en los ratones del grupo C57 tratado respecto de los grupos no tratados con P4 (rd10 no tratado y C57 no tratado) ( $^*p < 0,05$  vs C57 no tratado y rd10 no tratado).

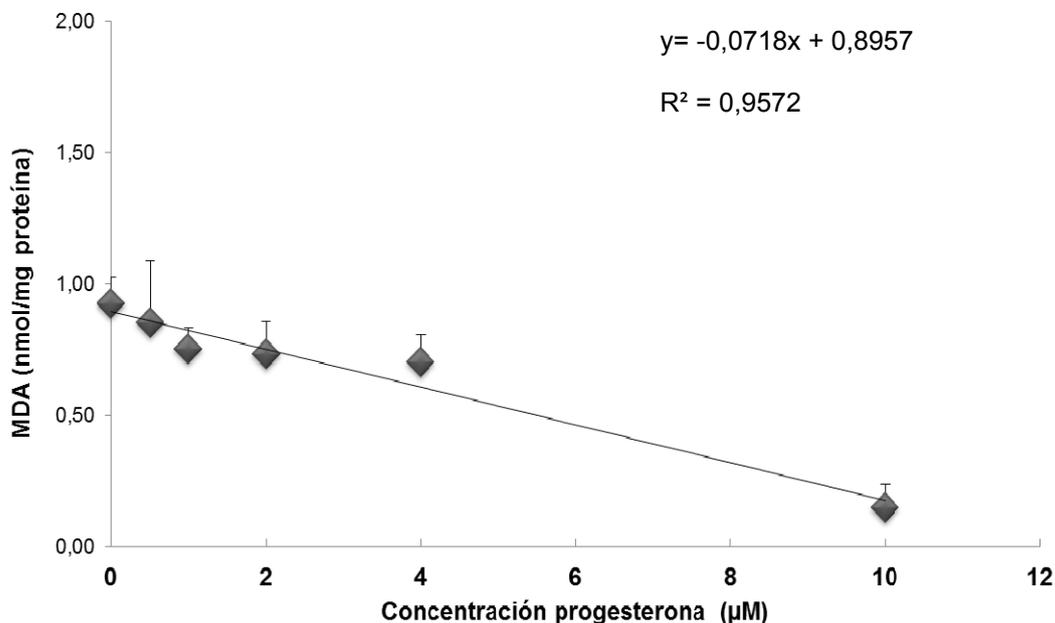


**Figura 51.** Concentraciones de MDA (nmol/mg proteína) en retinas de ratones C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado a día PN21 obtenidas por HPLC. Las barras representan la media (al menos 6 animales para cada cepa) de las concentraciones de MDA para los distintos grupos a estudio. El error de las barras representa el error estándar de la media ( $^*p < 0,05$  vs C57 no tratado y rd10 no tratado;  $^{\#}p < 0,05$  vs C57;  $^{\neq}p < 0,05$  vs C57 tratado y rd10).

#### 7.3.2. Inducción de la peroxidación lipídica en tejido

Se ha estudiado el posible efecto de la P4 en un experimento *ex vivo* de inducción de la peroxidación lipídica.

La figura 52 muestra que existe una correlación negativa ( $R^2=0,9572$ ) y estadísticamente significativa ( $p<0,01$ ) entre el uso de concentraciones crecientes de P4 y la concentración de MDA en el hígado de ratón. Se observa que a una mayor concentración de P4 las concentraciones de MDA son menores.



**Figura 52.** Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de progesterona (0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 y 10 μM) en homogenado de hígado de ratón sobre la concentración de MDA (nmol/mg proteína) determinado por HPLC. Las barras de error representan el error estándar de la media

#### 7.4. Determinación de la viabilidad celular en un cultivo con células ARPE-19 tras el tratamiento con sulforafano y progesterona

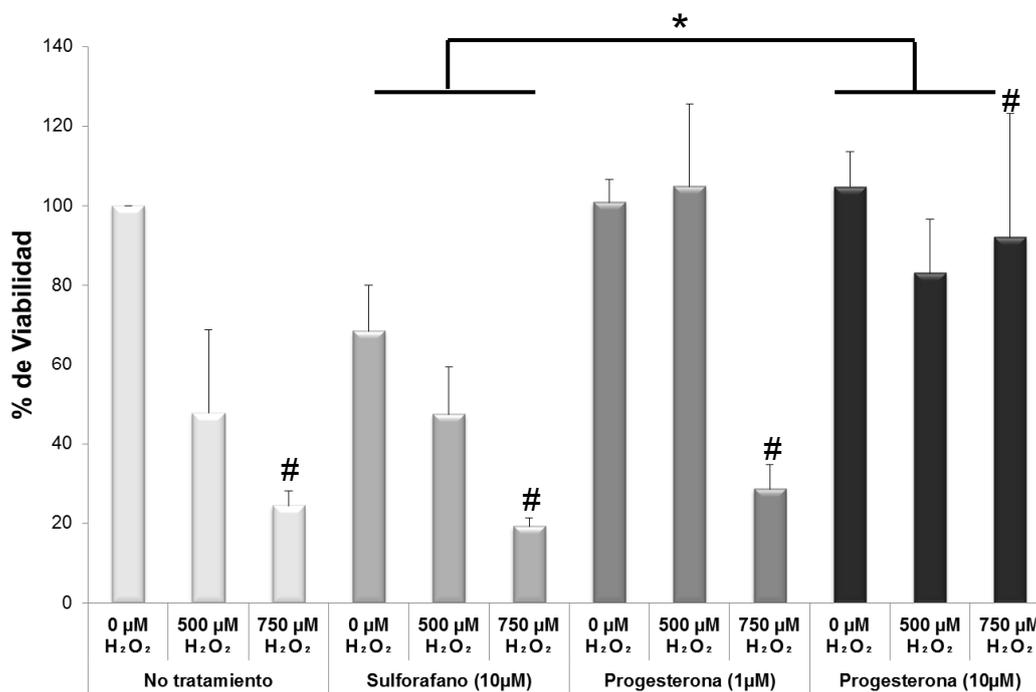
Para tratar de analizar el posible efecto antioxidante de la P4 *in vitro*, se ha realizado un estudio de viabilidad celular en células ARPE-19 pre-tratadas con sulforafano a 10 μM y P4 a dos concentraciones distintas (1 y 10 μM), a las que después se ha inducido un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a distintas concentraciones (0 μM, 500 μM y 1000 μM).

La figura 53 muestra que en todos los grupos, la viabilidad celular disminuye estadísticamente a medida que aumenta la concentración de  $H_2O_2$  ( $\#p < 0,05$  vs 0 μM de  $H_2O_2$ ).

Además, se ha observado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a una misma concentración, sulforafano a 10 μM y progesterona a 10 μM. De este modo que hay una mayor viabilidad celular en

## Resultados

los grupos tratados con 10  $\mu\text{M}$  de P4 respecto de los grupos tratados con 10  $\mu\text{M}$  de sulforafano (\* $p < 0,05$  vs sulforafano).



**Figura 53.** Representación gráfica de la viabilidad de las células ARPE-19 tras el pre-tratamiento de las células con sulforafano a 10  $\mu\text{M}$  y la progesterona a 1 y 10  $\mu\text{M}$  previo a la inducción de un estrés oxidativo con diferentes dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 750  $\mu\text{M}$ ). Las barras de error representan el error estándar de la media (\* $p < 0,05$  vs sulforafano 10  $\mu\text{M}$ ; # $p < 0,05$  vs 0  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

## **DISCUSIÓN**

---



La retinosis pigmentaria (RP) es una enfermedad genéticamente compleja. La RP no sindrómica es la forma más abundante en esta enfermedad, representando un 70-80% (Ayuso and Millan, 2010) de todos los casos de RP. En España los enfermos de RP no sindrómica representan un 88%, de los cuales un 31% presentan RP autosómica dominante, el 38% RP autosómica recesiva y un 12% la forma de RP ligada al cromosoma X, mientras que el resto de pacientes representan enfermos de RP esporádica (SRP; sporadic retinitis pigmentosa) y pacientes sin clasificar (Ayuso Garcia, 2001). Debido a la complejidad de la enfermedad se hace necesaria una estrategia común para su detección temprana. Sin embargo, la caracterización molecular de la RP es un gran reto por diversas causas: el gran número de genes y variantes genéticas implicadas, así como patrones de herencia no mendeliana; tales como penetrancia incompleta, herencia digénica o trialélica, etc (Anasagasti et al., 2012). Además, hay que sumar a ello la existencia de variaciones según la geografía y la etnia (Stone, 2003, Hamel, 2006, Daiger et al., 2007, Ferrari et al., 2011).

El principal “cuello de botella” en los ensayos genéticos de los pacientes con RP es la necesidad de hacer *screening* y analizar muchos genes a través de caros y costosos métodos (Daiger et al., 2007). Es por ello, que mientras se pone a punto un método estandarizado de detección molecular y con un coste asumible para su práctica generalizada, muchos de los esfuerzos se basan en desarrollar diversas estrategias terapéuticas que permitan sino frenar, enlentecer la progresión de la enfermedad una vez su fenotipo clínico ya ha sido manifestado. Los métodos actuales de tratamiento se dirigen principalmente a inhibir la apoptosis y a favorecer la neuroprotección y la reparación, tanto del epitelio pigmentario de la retina (EPR) como de las células fotorreceptoras. La mejora de los programas de tratamiento y de su efectividad, es la dirección a la que se encaminan los esfuerzos futuros para la investigación en este campo (He et al., 2014).

Entre las posibles terapias para hacer frente a la RP encontramos terapias neuroprotectoras dirigidas a tratar de disminuir los efectos producidos por las múltiples mutaciones que dan lugar a la RP. Entre dichas mutaciones, la RP resultante de las mutaciones en el gen de la subunidad beta de la fosfodiesterasa 6 (PDE6 $\beta$ ; phosphodiesterase 6 subunit beta) es una de las más tempranas en su comienzo y una de las formas más agresivas de esta enfermedad, representando el 5% de las RP autosómicas recesivas (McLaughlin et al., 1993, Danciger et al., 1995, McLaughlin et al., 1995).

Los modelos de ratones de degeneración de retina son una herramienta imprescindible para explorar los mecanismos de degeneración, así como para el estudio de terapias experimentales en la RP (Biswas et al., 2014). Entre ellos encontramos el modelo de ratón con degeneración de retina 10 (rd10; retinal degeneration 10), que ha sido utilizado en este proyecto para estudiar la efectividad de un tratamiento con progesterona (P4) en una enfermedad en la que el estrés oxidativo juega un papel muy importante.

## **1. Caracterización de la degeneración a nivel histológico y de muerte celular en un modelo de ratón rd10 y en ratones C57**

La rápida degeneración de los fotorreceptores que tiene lugar en el modelo de ratón de degeneración de retina 1 (rd1; retinal degeneration 1), unida al solapamiento existente entre el inicio de la degeneración y la última fase de la sinaptogénesis de la retina, es una limitación que presenta este modelo. Este hecho hace que sea difícil distinguir entre los efectos primarios debidos a la degeneración de los bastones y las consecuencias de un desarrollo anormal de la conectividad neuronal (Gargini et al., 2007). Es por ello, que se decidió llevar a cabo los estudios de esta tesis en otro modelo de ratón de RP, el modelo de ratón rd10.

En los ratones rd10 una vez ha tenido lugar el inicio de la degeneración, todavía se mantiene la función visual. La degeneración de los ratones rd10 no está causada por la ausencia de la proteína PED6B, sino que todavía se observa expresión de esta proteína. Es por ello que se cree que la degeneración en los ratones rd10 puede ser causada por una expresión insuficiente y/o una baja actividad enzimática. Esto podría conducir a una acumulación intracelular más lenta de guanosín monofosfato cíclico (GMPc; guanosine monophosphate cyclic) que la mostrada en la retina de los ratones rd1 y con una eventual muerte celular (Chang et al., 2007).

En la retina de los vertebrados, se producen al menos dos fases de muerte celular: una primera fase de muerte, que afecta a células neuroepiteliales en proliferación y neuroblastos recién diferenciados y que está poco caracterizada morfológica y funcionalmente (de la Rosa and de Pablo, 2000, Yeo and Gautier, 2004, Boya and de la Rosa, 2005) y una segunda fase más tardía que está mejor caracterizada, que tiene lugar en la segunda mitad del desarrollo de la retina y está asociada al proceso de diferenciación y maduración celular. En relación a este aspecto destacar el elevado número de células TUNEL positivas observadas en el presente

trabajo a PN5 tanto en los ratones C57 como rd10, a causa del desarrollo post-natal de la retina.

Sin embargo a parte de la citada muerte celular asociada al desarrollo, la apoptosis sucede en la muerte celular patológica en varios modelos de degeneración de la retina, incluyendo los ratones rd, los ratones con rodopsina transgénica y con daño inducido por la luz. La apoptosis de los fotorreceptores también sucede en la RP humana (Li and Milam, 1995). La muerte celular de los fotorreceptores en los humanos con RP se detectó hace dos décadas mediante la técnica TUNEL (Li et al., 1995).

A su vez, el estudio histológico se considera de referencia para estudiar y cuantificar la tasa de degeneración retiniana en los modelos animales y para evaluar la eficacia de posibles tratamientos (Pennesi et al., 2012). Las mediciones cuantitativas pueden ser problemáticas debido a los artefactos no lineales inducidos por la isquemia post-mortem, por la fijación o por el procesado del tejido (Gloesmann et al., 2003, Anger et al., 2004). Estas dificultades han conducido a la mayoría de los investigadores a cuantificar el espesor de la retina mediante el conteo de células individuales, más que mediar el espesor absoluto de la retina (Pennesi et al., 2012).

Diversos estudios han descrito la forma en la que comienzan a degenerar los fotorreceptores en el modelo de ratón rd10, todos ellos coinciden en que la retina de los ratones rd10 muestra degeneración histológica a las tres semanas post-natales. (Chang et al., 2002, Otani et al., 2004, Gargini et al., 2007). Las células TUNEL positivas se detectan desde el día post-natal (PN)18 (Chang et al., 2007, Gargini et al., 2007) y la señal se sitúa principalmente en la capa nuclear externa (CNE), con muy poca señal en la capa nuclear interna (CNI) y en la capa de células ganglionares (CCG). Estos autores realizaron el conteo del número de núcleos para determinar el número de filas de fotorreceptores en la CNE. A día PN10 el número de filas de fotorreceptores era de 12-14, mientras que a día PN20 el número descendía a 11-12 filas. Además, otros autores han determinado la existencia de una morfología histológica normal en la retina de los ratones rd10 a día PN14 (Puthussery et al., 2009, Pennesi et al., 2012).

Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en nuestro estudio, donde se observa que a día PN13 no hay diferencias estadísticas en el número de filas de fotorreceptores para los animales C57BL/6J y rd10 y ambos grupos presentan alrededor de 12-14 filas (Figura 22). No obstante, en nuestro modelo animal parece ser que la muerte celular de los fotorreceptores se encuentra ligeramente adelantada

(Figuras 22 y 23) dado que el número de filas de fotorreceptores a día PN21 es ligeramente menor al observado por otros autores para el mismo modelo de ratón aunque similar al encontrado recientemente por Biswas y colaboradores en el año 2014 que observan con inmunohistoquímica a día PN25 solo tres filas de fotorreceptores (Biswas et al., 2014).

En los humanos con RP la degeneración comienza por la periferia y algunos casos severos presentan degeneración casi completa en el centro de la retina, aunque retienen una “isla” de visión central residual (Berson, 2007b, Gabriele et al., 2010). Sin embargo, en los ratones rd10, los bastones comienzan a degenerar entre el día PN16 y PN20, con un máximo de muerte celular entre PN20 y PN25 con un gradiente del centro a la periferia, de manera que la degeneración en la periferia se encuentra retrasada unos 2-3 días (Chang et al., 2007, Gargini et al., 2007).

En este modelo de ratón, a día PN60 los bastones no son detectables y solo los conos permanecen (Chang et al., 2007, Gargini et al., 2007, Barhoum et al., 2008). En nuestro caso parece que también se encuentra el citado gradiente de muerte celular desde el centro a la periferia y que la muerte celular por apoptosis comienza a ser más elevada a día PN13 en el centro de la retina, pudiéndose encontrar el pico de muerte celular poco antes del día PN21 y pudiendo estar por tanto adelantado en comparación a lo encontrado por los citados autores. Es por ello que hipotetizamos que estos resultados podrían ser debidos a las diferentes condiciones de estabulación y mantenimiento, que pueden existir entre una misma cepa estabulada en sitios distintos, a su vez, factores determinantes pueden ser la dieta y/o la luz. Recientemente Arango-Gonzalez y colaboradores han encontrado la existencia del pico de muerte celular en rd10 a PN18 (Arango-Gonzalez et al., 2014). Del mismo modo Martínez-Fernández de la Cámara y colaboradores, han encontrado resultados similares. No obstante, estos autores explican tales resultados debido a la mayor intensidad de luz a la que se había mantenido a los ratones rd10 de su estudio (98-131 lux) (Martinez-Fernandez de la Camara et al., 2015), en comparación con lo descrito por otros autores (alrededor de 60 lux) (Doonan et al., 2005, Gargini et al., 2007).

## 2. Determinación de la dosis óptima para el tratamiento con progesterona

Los esteroides neuroactivos son sintetizados tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en las glándulas endocrinas (Paul and Purdy, 1992). Se conoce como esteroides neuroactivos a las hormonas esteroideas que ejercen sus efectos en el tejido neural. La neurosteroidogénesis ocurre en la retina, particularmente la producción *de novo* de la pregnenolona (Guarneri et al., 1994). Además, en la retina se expresan los factores nucleares A y B correspondientes a las isoformas A y B del receptor clásico de la P4 o PR (PR, progesterone receptor) (Wickham et al., 2000). Hay poca información acerca de qué células específicas de la retina expresan estos receptores, excepto para el componente 1 del receptor de membrana asociado a la P4, que se sabe que es expresado en las células de Müller de la retina, en los fotorreceptores y en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Swiatek-De Lange et al., 2007).

Se ha demostrado que el uso de esteroides neuroactivos como la P4, tiene la capacidad de atenuar la muerte celular por apoptosis asociada al daño en el SNC en varios casos, tanto en el daño cerebral traumático (TBI; traumatic brain injury) (Shahrokhi et al., 2010) como en el daño en la médula espinal (Gonzalez et al., 2009). Además, se ha visto como la P4 mejora los efectos del infarto (Betz and Coester, 1990) y de condiciones neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer (Frye and Walf, 2009). Del mismo modo, se ha descrito el papel neuroprotector de la P4 en un modelo de neurodegeneración en ratones Wobbler mutantes con degeneración motoneuronal y astrogliosis de la médula espinal (Gonzalez Deniselle et al., 2002a, Gonzalez Deniselle et al., 2002b).

Tras dos décadas de ensayos preclínicos con diferentes modelos de enfermedad y daño, se reconoce a la P4 como un poderoso neuroesteroide (Baulieu et al., 2001). Se ha demostrado el efecto neuroprotector de la administración de P4 de forma aislada o en combinación con otros compuestos como la Vitamina D (Atif et al., 2009) gracias a la capacidad de la P4 de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) tras un daño en el SNC (Duvdevani et al., 1995, Schumacher et al., 2007).

Las conversiones múltiples en la biosíntesis de esteroides, muchas de las cuales son bidireccionales, revelan que los efectos múltiples de la P4, no solo proceden de la P4 en sí misma, sino también de la función de otras hormonas relacionadas (Feeser

and Loria, 2011). La P4 y sus metabolitos tales como la alopregnanolona (ALLO), son pleiotrópicos, estos actúan sobre múltiples receptores no solo en el clásico receptor PR de la P4 (Stein, 2011). Las acciones pleiotrópicas de la P4 ejercen su efecto en la reducción de muchas complejas cascadas moleculares y genómicas relacionadas con el daño isquémico tras un infarto cerebral (Wali et al., 2014). Se ha demostrado que las progestinas son metabolizadas en varios tejidos oculares incluyendo el tejido retiniano (Lanthier and Patwardhan, 1988, Guarneri et al., 1994, Wickham et al., 2000, Sánchez-Vallejo et al., 2015).

Sin embargo, diversos estudios no han podido demostrar los efectos beneficiosos de la P4 y sus metabolitos en el ojo. Pues aunque en algunas investigaciones se ha encontrado que la P4 protegía de la alta presión intraocular (Lu et al., 2008a, Ishikawa et al., 2014), en estudios como el de Nakazawa y colaboradores en el año 2006 se encontró que la P4 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 P4 contra el estrés por luz (O'Steen, 1977, Kaldi and Berta, 2004).

La disparidad 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 P4 (natural o sintética), ya que la progestina sintética no siempre puede mimetizar los efectos fisiológicos de la P4 (Doonan et al., 2011). Es por ello, que se necesitan más estudios para optimizar la dosis, elección del momento oportuno (*timing*) y vía de administración (Liu et al., 2010).

En este sentido, en la presente tesis se ha realizado un estudio previo, con la finalidad de determinar la dosis óptima para el tratamiento con P4. Los estudios realizados en las diferentes zonas de la retina, sugieren el posible efecto beneficioso de la P4 en la retina de los ratones rd10.

De forma más concreta, la P4 muestra un patrón de dosis-respuesta en el efecto de preservar un mayor número de filas de fotorreceptores en la retina entera y específicamente en la periferia lejana de los ratones rd10, donde la dosis de P4 de 150 mg/kg resulta ser más efectiva y la de 200 mg/kg tiene un efecto menor. Sin embargo, parece que la dosis de 200 mg/kg tiene más efecto en la periferia central aunque con una menor correlación para el patrón dosis-respuesta.

Hay estudios que de acuerdo con nuestros resultados establecen la existencia de una curva de dosis-respuesta en forma de campana para la P4. Por ejemplo, Stein (2008) observó que la administración de bajas o altas dosis de P4 tras TBI e infarto cerebral no daba buenos resultados (Stein, 2008). A su vez, tras el empleo de dosis crecientes de P4 en un modelo de TBI en ratas, se ha demostrado cómo la P4 resultaba ser más efectiva a dosis intermedias en estudios de análisis del comportamiento y memoria espacial entre otros parámetros (Goss et al., 2003, Wali et al., 2014). No obstante, dado la existencia de algunos estudios que correlacionan el empleo a largo plazo de la progesterona con el cáncer de mama, serán necesarios estudios a gran escala y aleatorios con diferentes progestinas y tipologías de administración y dosis, para poder analizar críticamente el efecto de la progestina en el cáncer de mama (Eden, 2003).

Por lo tanto, se decidió emplear para los siguientes experimentos la dosis de 150 mg/kg de P4 como terapia neuroprotectora, debido a que dicha dosis es la que muestra mejores resultados en la zona en la que persisten un mayor número de fotorreceptores, la periferia lejana de la retina.

### **3. La progesterona disminuye la muerte celular de los fotorreceptores en la retina de los ratones rd10**

En el modelo de ratón rd10, los bastones son los que mueren primero y no es hasta que la degeneración de estos bastones es casi completa cuando los conos comienzan a morir (Gargini et al., 2007). Parece ser que son los conos que permanecen en la retina los que median la respuesta visual, aunque es difícil extraer conclusiones debido al bajo porcentaje de conos que sobreviven en la retina, los posibles cambios adaptativos y transneuronales en el tejido que sobrevive (Carter-Dawson et al., 1978), así como otras consideraciones (Orr et al., 1976). Desafortunadamente, se sabe poco de las vías de muerte celular de los bastones excepto que se cree que estos mueren por apoptosis (Wenzel et al., 2005).

Los modelos animales con RP, entre ellos el modelo de ratón rd10, muestran una pérdida severa de fotorreceptores, con una concomitante pérdida de respuesta visual, medida a través del electroretinograma (ERG) (Chang et al., 2002, Fernandez-Sanchez et al., 2012a, Fernandez-Sanchez et al., 2012b, Rosch et al., 2014). Se puede asumir por tanto que la función visual es correlativa hasta cierto punto al espesor de la retina (Sandberg et al., 2005, Witkin et al., 2006).

Debido a la amplificación del sistema visual un número relativamente bajo de células rescatadas o trasplantadas a menudo tienen un efecto clínicamente significativo en la visión (Tucker et al., 2014), con lo que conseguir una mínima protección en la retina durante la degeneración, por pequeña que sea, podría ser de gran importancia para los enfermos de RP.

La técnica de TUNEL se ha empleado ampliamente en estudios con terapias neuroprotectoras en el ratón rd10 (Corrochano et al., 2008) 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 otras distrofias 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 et al., 1993, Cottet and Schorderet, 2009).

Diversos estudios han demostrado que la P4 protege contra la apoptosis a través de la unión a sus receptores nucleares (A y B), al componente 1 del receptor de membrana asociado a P4, o a ambos tipos de receptores (Friberg et al., 2009, Peluso et al., 2009). Ishrat y colaboradores han demostrado que la P4 disminuye la apoptosis a través de la vía PI3K/Akt (Ishrat et al., 2012).

Algunos estudios han demostrado el uso de progestinas sintéticas (por ejemplo el norgestrel) y su efecto en el retraso de la muerte celular por apoptosis en el modelo de ratón rd10 (Doonan et al., 2011). Estos autores demostraron que tras administrar norgestrel existía un menor número de células TUNEL positivas en la CNE de la retina de los ratones rd10 tratados. A su vez, Doonan y colaboradores pudieron observar que a día PN21 había una preservación de los fotorreceptores de la retina periférica que no tenía lugar en la retina central, aunque entre los días PN25-PN30 observaron un aumento de las células TUNEL positivas en la periferia de la retina. Debido a que en este modelo de ratón la periferia degenera más lentamente, estos autores plantean que quizás una administración más temprana de P4 podría dar lugar a un retraso en la muerte de los fotorreceptores en la retina central, al igual que sucede en la periferia. De este modo, sugieren que la muerte celular en este modelo se encuentra retrasada por la acción de la progestina, más que prevenida.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran, tanto por la tinción de hematoxilina-eosina (HE) como por la técnica TUNEL que hay un menor número de

filas de fotorreceptores y un aumento de las células TUNEL positivas en los ratones rd10 sin tratar, como resultado de la degeneración (Figuras 22 y 23). A su vez, se observa un efecto de la P4 en la preservación del número de filas de los fotorreceptores, con un aumento significativo del número de filas de fotorreceptores en la periferia lejana de la retina de los ratones rd10 que han sido tratados con P4, mostrando un elevado porcentaje de disminución de la muerte celular en todas las zonas de la retina y que también resulta ser significativo en la periferia lejana (Figuras 29 y 30).

Al igual que en los citados estudios, hay un gradiente en la degeneración, del centro a la periferia, más notable en nuestros resultados de la técnica de TUNEL a PN21 que en la HE. Del mismo modo y de forma más concreta se observa el efecto neuroprotector de la P4 en la periferia lejana de los ratones rd10, mientras que en el resto de zonas de la retina, periferia central y centro de la retina, hay cierta tendencia a aumentar el número de filas de fotorreceptores y a disminuir la muerte celular en aquellos ratones rd10 que han sido tratados con P4.

Hay que señalar que nuestros estudios se han llevado a cabo tanto en machos como en hembras, debido a que se trata de unos estudios iniciales y otros autores como Doonan y colaboradores que emplearon el norgestrel para la protección de la muerte celular en un modelo de daño por la luz, obtuvieron protección similar tanto en machos como en hembras, indicando que los efectos observados no eran específicos de género (Doonan et al., 2011).

Por lo tanto, mientras que los datos actuales describen que los efectos pro-supervivencia de los progestágenos en el cerebro son convincentes, los estudios en la retina aunque alentadores se encuentran en un estado mucho menos avanzado (Doonan and Cotter, 2012).

## **4. Estudio de la progesterona sobre la expresión en la retina de las proteínas BDNF, iNOS, pCREB, CREB y LC3**

### **4.1. BDNF**

Una de las estrategias para hacer frente a la RP es el empleo de factores neurotróficos que promuevan la supervivencia de las células fotorreceptoras (LaVail et al., 1992, LaVail et al., 1998). Entre estos factores encontramos, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; brain-derived neurotrophic factor), cuyo aumento ha

demostrado ser protector en múltiples desórdenes neurodegenerativos en la retina (Okoye et al., 2003). Se ha observado que el marcaje de BDNF se encuentra a lo largo de toda la retina. Por tanto, el BDNF puede estimular a otras células retinianas a producir señales de supervivencia que actúen en los fotorreceptores (Okoye et al., 2003).

De forma más concreta, el BDNF pertenece a la familia de neurotrofinas, como la neurotrofina 3 y la neurotrofina 4, que juegan papeles clave en el cerebro para dar soporte a la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica (Cohen and Greenberg, 2008, Lu et al., 2008b). Además, el BDNF está relacionado con otros mecanismos como la memoria y el estrés oxidativo, ya que se ha comprobado que con la edad y el aumento del estrés oxidativo la funcionalidad de la memoria disminuye debido a la disminución del BDNF (Wu et al., 2004, Erickson et al., 2010).

Diversos autores han demostrado que la P4 aumenta la expresión de BDNF en varios sistemas experimentales, incluyendo explantes del córtex cerebral, médula espinal dañada y en las motoneuronas en degeneración de ratones Wobbler (Singh et al., 1995, Gonzalez et al., 2004, Gonzalez Deniselle et al., 2007, Kaur et al., 2007). Además, se sabe que el receptor clásico intracelular/nuclear de la P4 es necesario para que la P4 pueda aumentar la expresión de ARNm del BDNF (mediador clave de los efectos protectores de la P4) (Jodhka et al., 2009, Singh and Su, 2013) y también se ha descrito que la P4 desencadena una significativa liberación del BDNF por parte de la glía (Su et al., 2012).

Los factores de crecimiento como el BDNF, el factor neurotrófico ciliar (CNTF; ciliary neurotrophic factor) y el factor neurotrófico derivado de la línea celular de glía (GDNF; glial cell line-derived neurotrophic factor), son difíciles de detectar en la retina por western blot (Doonan et al., 2011). En nuestro caso se ha podido determinar el BDNF en su forma inmadura o pro-BDNF, el cual debe someterse a su rotura proteolítica para pasar a la forma madura (Fayard et al., 2005).

Sin embargo, en nuestro caso, no se han observado diferencias estadísticamente significativas para los niveles de BDNF entre ninguno de los grupos que hemos estudiado a día PN21, momento en que ya ha podido tener lugar el pico de muerte celular. Estos resultados están de acuerdo con el citado estudio de Doonan y colaboradores, en el que tras tratar a los ratones rd10 con norgestrel (progestina sintética), no consiguieron detectar el BDNF en su forma madura y aunque sí que lo detectaron en su forma inmadura (pro-BDNF), no observaron diferencias en los

animales tratados. Del mismo modo, tampoco observaron variaciones en el CNTF y GDNF en respuesta al norgestrel (Doonan et al., 2011). Ante la inexistencia de alteraciones en los valores para el BDNF de los grupos estudiados, es importante destacar que los cambios moleculares que tienen lugar en la retina adulta suceden de forma muy rápida, dentro de minutos u horas (Cuenca et al., 2014) y que la alteración de estos factores neurotróficos no es persistente en el tiempo (Vecino et al., 2015). Es por ello que hipotetizamos que quizá ante la existencia de posibles variaciones en el BDNF, no hayamos dado con el momento concreto en que dicha alteración se hiciera presente, por lo que se deberían realizar más estudios con la finalidad de observar los cambios a lo largo del tiempo entre la cepa control (C57) y rd10 y poder determinar si el avance de la degeneración en el modelo de rd10 afecta a la alteración de la expresión de la proteína BDNF.

#### 4.2. iNOS

El óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) es una molécula de señalización producida por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) dependiente de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina (Moncada and Higgs, 1993). Además, se sabe que el NO influencia la apoptosis en muchos modelos y su efecto puede ser pro-apoptótico y anti-apoptótico (Brune et al., 1998). Existen tres isoformas de la enzima NOS según el tejido donde primero fueron clonadas; la neuronal (nNOS o NOS I) y endotelial (eNOS o NOS III), que se expresan de manera constitutiva de forma calcio-dependiente. Y la inducible (iNOS o NOS II), que se expresa después de un compromiso inmunológico y daño neuronal y es calcio-dependiente bajo la mayoría de circunstancias (Pautz et al., 2010) dando lugar a la producción de NO que puede persistir durante varios días (Alderton et al., 2001). La isoforma inducible también genera NO por los macrófagos como parte de la respuesta inmune (Stuehr et al., 1989, Drapier et al., 1991, Stadler et al., 1993, Terenzi et al., 1995, MacMicking et al., 1997) en respuesta a citoquinas o a productos bacterianos. Se ha demostrado que la producción de  $\text{NO}$  y sus efectos varían en función de la isoforma de NOS que lo produce, mientras que la eNOS genera  $\text{NO}$  con efectos beneficiosos, se ha visto que la nNOS e iNOS producen  $\text{NO}$  con efectos deletéreos (Alderton et al., 2001, Tsai et al., 2007). Sin embargo, la expresión de las isoformas de NOS después del daño oxidativo es muy controvertida (Kim and Suh, 2010).

Se sabe que la iNOS se expresa en la CNV en un modelo murino *in vivo* de retinopatía isquémica proliferativa donde existe un marcado daño en la retina interna

(Sennlaub et al., 2001). Otros autores han demostrado que tras la infección de la retina por un citomegalovirus murino, la mayoría de células que expresan iNOS en la retina son los macrófagos y la microglía (Zhang et al., 2007). Mientras que otros autores han demostrado en el modelo de degeneración de retina rd2 (modelo con mutación en la proteína periferina), la presencia de iNOS en los segmentos externos de los fotorreceptores, a día PN14 (3 días previos al pico de muerte celular de fotorreceptores que sitúan en PN17) (Yang et al., 2007).

A día PN21, hemos encontrado de forma sorprendente una disminución estadísticamente significativa de la proteína iNOS en los grupos rd10 frente al control tratado, y del rd10 tratado con ambos controles (C57 tratado y C57 no tratado). Estos resultados han sido llamativos pues de forma contraria a lo que se podría pensar, no se ha encontrado una elevación del iNOS en los ratones rd10 a día PN21. Es por ello, que a la vista de los resultados, se quiso estudiar lo que sucedía días antes (PN13 y PN18), del día del sacrificio (PN21). Hipotetizamos que debido a los cambios que con el tiempo tienen lugar en la retina de los ratones rd10 a causa de la degeneración y dado que el NO puede ser producido en todas las células de la retina (Eldred and Blute, 2005), debido a la pérdida de fotorreceptores exista una menor expresión de iNOS en estas células lo que explicaría la disminución tan marcada del iNOS en los ratones rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado) a día PN21.

Para ello, se analizó la expresión de iNOS a día PN13 y PN18, tanto en los rd10 como en los controles sin tratar (C57). Se observó que existía una tendencia al aumento en los valores de iNOS en los ratones rd10 a día PN13 cuando la degeneración en la retina de los ratones rd10 todavía no se ha hecho patente a nivel histológico, aunque parece ser que los mecanismos moleculares de la degeneración se están poniendo en marcha. Además, se confirmó la disminución de iNOS en los ratones rd10 a lo largo de los días, ya que a día pN18 se observaba una disminución en la proteína iNOS para los ratones rd10, no observándose diferencias para los valores de iNOS en los ratones control. Estos resultados están de acuerdo con Yang y colaboradores que en el año 2007 estudiaron la expresión de iNOS en los ratones rd2, estos autores observaron como en la retina de sus ratones control (ratones C3B) existía una expresión constitutiva de iNOS y que debido a la degeneración la expresión de iNOS se encontraba regulada de una forma tiempo-dependiente, encontrándose elevada desde PN12-PN14 y disminuyendo a partir de estas edades post-natales (Yang et al., 2007).

En cuanto al efecto de la P4 en la expresión de iNOS, Coronel y colaboradores demostraron que la P4 atenuaba la expresión y actividad de iNOS, e hipotetizan que sea posiblemente por la disminución de la transactivación del factor nuclear kappa B (NF-kB; nuclear factor kappa B) en un modelo de rata para daño en la médula espinal (Coronel et al., 2014). El NF-kB es uno de los factores de transcripción más importantes que tras un daño, controlan la expresión génica o los mediadores inflamatorios, incluyendo los genes de iNOS (Rafati et al., 2008, Fu et al., 2010). Otros autores también han observado una disminución de la iNOS tras un tratamiento con P4 tanto *in vivo* como *in vitro* (Liu et al., 2010).

### 4.3. pCREB y CREB

El elemento de unión y respuesta al AMPc (CREB; cAMP response element-binding), o CREB-1 pertenece a la familia de factores de transcripción que han sido implicados en la supervivencia neuronal (Finkbeiner, 2000, Sakamoto et al., 2011). La supresión genética de CREB dirige a la degeneración neuronal (Mantamadiotis et al., 2002).

La fosforilación de CREB (pCREB; phosphorylated cAMP response element-binding) en el residuo de serina-133 se considera un pre-requisito para la activación de CREB (Alberini, 2009). Esta fosforilación sucede en respuesta a un estímulo externo (Montminy et al., 1986, Montminy et al., 1990, Johannessen et al., 2004).

Hasta la fecha existen pocos estudios que hayan demostrado la variación de los resultados en la expresión del pCREB en la retina. No obstante, algunos autores han informado de una desregulación de pCREB tras someter a la retina a diversos tipos de daño por luz, daño en el nervio óptico o presión intraocular (Yoshida et al., 1995, Choi et al., 2003, Kim and Park, 2005). Además, la fosforilación de CREB puede tener una respuesta dual en la supervivencia celular, dependiendo del agente de excitotoxicidad empleado. Estudios como el de Isenoumi y colaboradores han indicado que agentes como el N-metil-D-aspartato (NMDA) promueven la muerte de las células ganglionares mediante el aumento del pCREB (Isenoumi et al., 2004) mientras que otros estudios realizados en el SNC han demostrado que otros compuestos como el ácido kaínico promueven la muerte neuronal al disminuir el pCREB (Lee et al., 2002).

La presencia de pCREB en el núcleo de los fotorreceptores se ha visto por inmunohistoquímica en modelos de perro de RP y en retinas humanas con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Beltran et al., 2009). Además, se ha visto que los niveles de pCREB aumentan tras el tratamiento con factores

neurotróficos en explantes de retinas de ratones rd1 tratados con CNTF y BDNF o con factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I; insulin like-growht factor I), dando lugar a un enlentecimiento de la progresión de la degeneración y sugiriendo un papel para pCREB en la supervivencia de las células de la retina durante la degeneración (Azadi et al., 2007, Arroba et al., 2009).

En las retinas de los ratones rd1, la expresión de CREB se encuentra disminuida, al igual que la expresión de pCREB (Paquet-Durand et al., 2006, Azadi et al., 2007, Arroba et al., 2009).

Este resultado es sorprendente, pues se esperarían unos valores elevados de pCREB en los fotorreceptores, debido a que la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG; cGMP-dependent protein kinase) (activada por el GMPc y capaz de fosforilar a CREB), se encuentra activada en rd1 y rd10 como resultado del acúmulo de GMPc durante la degeneración retiniana. Además, cabe destacar que el estrés oxidativo induce también la activación de CREB (Lee et al., 2009a).

Sin embargo, diversos autores han tratado de dar una posible explicación para la desregulación de la activación y expresión de CREB. Nakao y colaboradores han planteado el posible papel de la activación de quinasas como la PKA en un modelo de degeneración de fotorreceptores en pez cebra. Según estos autores, el AMPc sería el responsable de la muerte celular de los fotorreceptores en dicho modelo. Los citados autores proponen que la desregulación de pCREB podría tener lugar mediante la activación regulada por AMPc del represor temprano inducible de AMPc (ICER; inducible cAMP early repressor) (Nir et al., 2001) el cual funciona como antagonista endógeno de CREB y cuya actividad es dependiente de la PKA, aunque destacan la necesidad de elucidar la relación exacta entre CREB y la PKA en la muerte celular de los fotorreceptores (Nakao et al., 2012).

Nosotros postulamos la posible actuación del citado represor u otro que actúe de forma similar en los ratones rd10, proteína que podría venir regulada en el modelo de ratón rd10 por el GMPc y que también sea antagonista de CREB (dependiente a su vez de la PKG), dando lugar a la desregulación de CREB. Estos resultados están de acuerdo con lo observado en nuestro caso para los ratones rd10, donde se observa una disminución estadísticamente significativa del pCREB en la cepa rd10 frente a la cepa de los ratones C57 a día PN21.

En nuestro caso, el tratamiento con P4 no tiene ningún efecto en los ratones rd10, pero sí en los controles, donde se produce un aumento estadísticamente significativo en la proteína pCREB, aunque el ratio pCREB/CREB no aparece alterado. De ello podemos deducir que en nuestro caso la expresión de CREB en los ratones rd10 está disminuida, quizá por alguno de los argumentos expuestos anteriormente, mientras que en una situación normal (ratones control), la P4 es capaz de aumentar la expresión de CREB.

Otros autores como Gu y colaboradores han demostrado en estudios con ratas, que en la zona del área preóptica del hipocampo (en el núcleo periventricular anteroventral) en la que se encuentran gran cantidad de receptores hormonales, la P4 y los estrógenos son capaces de regular la fosforilación de CREB en las neuronas de esta zona (Gu et al., 1996).

Se ha destacado en otros estudios la importancia del aumento de pCREB en los estudios de degeneración de la retina. Por ejemplo, Wahlin y colaboradores demostraron que el uso de factores neurotróficos produce un aumento de pCREB en explantes de retina de ratones C57. Estos autores demostraron que tras el tratamiento con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2; fibroblast growth factor) tipo 2, el factor de crecimiento transformante (TGF; transforming growth factor) alfa, el BDNF, o CNTF aumentaba la expresión de pCREB en la retina interna, sugiriendo el posible efecto protector que CREB podría tener en la degeneración de la retina (Wahlin et al., 2000). En estudios *in vitro* con experimentos en explantes de retinas de ratones rd1, se ha podido observar que tras la inhibición de la PED6 con zaprinast no se detectaba pCREB en la CNE, aunque no se observaba variación en el marcaje de la CNI y en la CCG (Mencl, 2012).

#### **4.4. LC3**

La autofagia es una vía auto-degradadora que media el reciclaje de componentes celulares dañados o disponibles y está activada en situaciones de estrés nutricional, oxidativo y otras formas de estrés (Boya et al., 2013). La disfunción de la autofagia se ha relacionado con muchas condiciones patológicas, incluyendo infecciones, cáncer y enfermedades degenerativas (Schneider and Cuervo, 2014).

Además, a menudo se han relacionado con la neurodegeneración defectos en diferentes estados del proceso de la autofagia, incluyendo la formación de autofagosomas, el reconocimiento de la carga o “carga” y la fusión y degradación lisosomal (Nixon, 2013).

A su vez, a parte de su papel en la degradación, los lisosomas están emergiendo como reguladores clave de la homeóstasis celular, actuando como sensores nutricionales o participando activamente en la muerte celular (Boya, 2012, Aits and Jaattela, 2013, Cang et al., 2013). Se ha demostrado la existencia de las alteraciones lisosomales incluyendo el aumento del pH lisosomal y la permeabilización de la membrana lisosomal en enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Dehay et al., 2010, Lee et al., 2010).

Dicha permeabilización lisosomal puede ser inducida por diferentes estímulos como el estrés oxidativo y la activación de calpaínas (proteasas no lisosomales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ) pudiéndose observar tanto *in vitro* como *in vivo* (Aits and Jaattela, 2013). A su vez, también se ha demostrado que las calpaínas adhieren muchos sustratos intracelulares incluyendo proteínas de la autofagia y proteínas lisosomales (Norman et al., 2010, Sahara and Yamashima, 2010) sugiriendo la relación existente entre el  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de las calpaínas, el daño lisosomal y el bloqueo de la autofagia. Del mismo modo, varios estudios han relacionado la regulación de la autofagia por parte del  $\text{Ca}^{2+}$  (Williams et al., 2008) con resultados diferentes que sugieren que dicha regulación puede estar condicionada tanto por la célula como por el microambiente extracelular (East and Campanella, 2013).

Hallazgos recientes han empezado a aclarar el posible papel de la autofagia en la retina. Existen estudios como el de Rodríguez-Muela y colaboradores (2012) que demuestran *in vivo* que la autofagia ejerce un papel citoprotector en respuesta al daño en las células ganglionares en modelos experimentales de glaucoma (Rodríguez-Muela et al., 2012). Otros estudios demuestran la existencia de una correlación entre el bloqueo de la autofagia y la acumulación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y activación de la m-calpaína (calpaína-2) que tiene lugar antes del pico de muerte celular de los fotorreceptores en el modelo de ratón rd10 (Rodríguez-Muela et al., 2015). Estos autores observaron a partir del día PN20 una disminución de los valores de expresión de LC3II/LC3I en los ratones rd10 respecto de los ratones control, a diferencia de lo que sucede en nuestro caso donde no se observa ninguna alteración a este nivel. Por otra parte, autores como Zhang y colaboradores (2014) han demostrado que la supresión de la autofagia *in vitro* protege a los fotorreceptores del daño inducido por la luz (Zhang et al., 2014).

Respecto del posible papel de los neuroesteroides en la autofagia se ha visto que la P4 y sus metabolitos activan la autofagia en el TBI y en el daño por infarto cerebral (Kuma et al., 2004, Motyl et al., 2007, Sayeed and Stein, 2009, Lee et al., 164

2011a). Debido a que la prolongada inhibición de la autofagia puede causar neurodegeneración (Hara et al., 2006), algunos autores han planteado que el papel neuroprotector de los neuroesteroides pueda ser derivado de su efecto positivo en la autofagia (Boland et al., 2008).

Aunque el papel de la autofagia en los fotorreceptores está empezando a ser comprendido ahora, nos planteamos que quizá la progesterona pudiera intervenir en la autofagia del modelo de degeneración de la retina rd10. Sin embargo, en el presente trabajo no se han observado cambios en el marcador de autofagia lisosomal LC3 a día PN21 para ninguno de los grupos estudiados (C57, C57 tratado, rd10 y rd10 tratado). Estos resultados contrastan con los observados por Kim y colaboradores (2012) que consiguieron activar la autofagia *in vitro* en un cultivo celular de astrocitos de ratón gracias al tratamiento con ALLO o P4 (Kim et al., 2012). Estos autores previamente ya habían demostrado que una autofagia excesiva daba lugar a la permeabilización lisosomal y a la muerte celular en una situación de estrés oxidativo (Lee et al., 2009b).

## **5. La progesterona altera la óxido nítrico sintetasa neuronal**

El óxido nítrico juega un papel crítico en muchos aspectos del procesamiento visual y de varias patologías de la retina (Goldstein et al., 1996, Eldred and Blute, 2005). En la retina, la vía del NO está activada predominantemente por un aumento en el  $Ca^{2+}$  intracelular, el cual activa a la nNOS a producir el segundo mensajero NO (Bredt and Snyder, 1990). Blom y colaboradores encontraron por inmunohistoquímica que la forma nNOS era la isoforma más predominante de NOS en la retina normal (Blom et al., 2012).

Estudios de expresión del NO en retinas de ratón (Giove et al., 2009) sugieren que la inmunoreactividad para nNOS refleja la mayor parte de la producción del NO. La isoforma nNOS se ha localizado anatómicamente mediante inmunohistoquímica en la retina del ratón en la capa plexiforme externa (CPE), en somas de las células bipolares, amacrinas y ganglionares y también en procesos celulares y puntos concretos en la capa plexiforme interna (CPI) (Haverkamp and Eldred, 1998, Giove et al., 2009, Pang et al., 2010, Blom et al., 2012). En nuestros resultados se ha podido observar marcaje de nNOS en la CPI, en la CNI, principalmente en el soma y los axones de células amacrinas y también en la CCG, en soma y axones de las células de esta capa.

Darius y colaboradores afirman que existen evidencias ultraestructurales de la presencia de nNOS en las membranas perinucleares y mitocondriales de los segmentos internos y esférulas de los bastones (Darius et al., 1995). En nuestro caso, no se observó marcaje en la CNE, esto podría ser debido tal y como otros autores han postulado a que el anticuerpo empleado no reconociera los transcritos alternativos de la nNOS en los fotorreceptores (Blom et al., 2012). No obstante, otros autores encontraron la nNOS en las células horizontales de los terminales de los fotorreceptores y en las uniones basales entre fotorreceptores (Haverkamp and Eldred, 1998). A su vez, Eldred y Blute (2005) informaron de la existencia de nNOs en varios compartimentos de los fotorreceptores (Eldred and Blute, 2005).

En el presente trabajo, los resultados sugieren que la nNOS está alterada en la periferia lejana de los ratones rd10 sin tratar, pues se observa un aumento significativo en la cuantificación de nNOS en la periferia lejana para este grupo. Sin embargo, el tratamiento con P4 en los controles produce una disminución significativa de la nNOS en todas las zonas de la retina. Resultados igualmente divergentes han sido observados por otros autores.

Algunos autores plantean el hecho que los estrógenos estimulan la expresión del ARNm de la nNOS en el área preóptica medial de ratas hembra, no obteniendo ningún efecto por parte de la P4 (Lima et al., 2014). En la misma línea, estudios realizados en cerdos de guinea por Weiner y colaboradores no mostraron un aumento significativo de la nNOS y de eNOS, tras la administración de una dosis de 5 mg/kg de P4, fenómeno que sí sucedía al administrarles estradiol, indicando que la inducción tanto de nNOS como eNOs es específica de los estrógenos pero no de todos los esteroides sexuales (Weiner et al., 1994). A su vez, otros estudios demostraron que la administración de bajas concentraciones de P4 no producía alteraciones en la nNOS, mientras que la administración del 17 $\alpha$ -estradiol o la P4 a concentraciones elevadas era capaz de inhibir su expresión en un homogenado de cerebelo (Hayashi et al., 1994). Contrariamente a lo expuesto por otros autores, Ogando y colaboradores demostraron que tanto la P4 como el estradiol eran capaces de aumentar la síntesis de la NOS en el útero de rata ovariectomizadas, estos autores vieron que la P4 aumentaba la expresión de la eNOS y de iNOS, mientras que el estradiol incrementaba únicamente la expresión de iNOS (Ogando et al., 2003).

Martini y colaboradores pusieron de manifiesto que los efectos variables del estradiol y de la P4 en la activación del nNOS pueden depender de la diferente distribución de sus receptores en la zona estudiada en el sistema límbico-hipotalámico.

Aunque no está clara la relación entre las variaciones de las concentraciones de estrógenos y P4 en la modulación *in vivo* de la expresión de nNOS (Martini et al., 2011). Es por ello que en el presente trabajo nos planteamos que quizás la relación entre la P4 y la proteína nNOS también sea variable en tejidos como la retina.

## **6. El tratamiento con progesterona provoca alteraciones en el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd10**

El término retinitis pigmentosa (retinosis pigmentaria) fue acuñado por Donders en 1857. No obstante, se cree desde un punto de vista técnico que el nombre se estableció de una forma algo inapropiada, debido a que la inflamación no es el único proceso fisiológico que tiene lugar en este tipo de degeneración retiniana (Parmeggiani et al., 2011). Sin embargo, normalmente el examen retiniano de un paciente con RP revela acumulaciones de pigmento en forma de estrella de color marrón oscuro o negro que sí que son las responsables del término pigmentosa.

La neuroinflamación es considerada como un distintivo de muchos desórdenes crónicos degenerativos (Glass et al., 2010). Como en otras patologías retinianas, la inflamación juega un papel fundamental en la RP (Vecino et al., 2015). Sin embargo, queda por esclarecer si la neuroinflamación contribuye a la degeneración de los fotorreceptores en esta enfermedad (Peng et al., 2014).

Las células de Müller son el elemento glial predominante en la retina, representando el 90% de la glía. Existe un consenso general acerca de la aparición de la glía de Müller en la retina de forma que se postula que son las últimas células que llegan a ser post-mitóticas (Cepko, 1993), es decir, las últimas células que van a dejar de dividirse.

La parte menos elástica de la retina es la CNE al igual que los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (Lu et al., 2006, Franze et al., 2011). Las células de Müller y los astrocitos pueden alterar su elasticidad y rigidez sobrerregulando o desregulando las proteínas que contienen sus filamentos intermedios, como son la proteína ácida glial fibrilar (GFAP; glial fibrillary acidic protein) y la vimentina.

Tanto en los modelos animales como en los humanos se muestra un alto nivel de GFAP en las células de glía en todas las enfermedades de la retina, incluyendo el glaucoma, la DMAE, el desprendimiento de retina y la RP (Cuenca et al., 2014). En los

ratones control del tipo C57BL/6J la expresión de GFAP se encuentra localizada en los astrocitos. Sin embargo, se ha observado en diversos modelos de RP como por ejemplo, los ratones rd1, rd10 y ratas P23H, la positividad hacia la proteína GFAP de las células de Müller que se hacen reactivas durante el proceso degenerativo (Lewis and Fisher, 2003, Gargini et al., 2007, Fernandez-Sanchez et al., 2010, Rosch et al., 2014). La sobreexpresión del marcador GFAP es tan sensible que puede ser usada como indicador del estrés y daño en la retina, así como de activación de las células de Müller (Luna et al., 2010). Por otra parte, la gliosis reactiva se ha asociado a una sobreexpresión de defensas antioxidantes que pueden aumentar la habilidad de los astrocitos para proteger a las neuronas de los radicales libres (Wilson, 1997), pues se cree que la modulación del nivel de daño oxidativo puede influir en la respuesta inflamatoria (Tokarz et al., 2013).

En respuesta a la infección y a ciertos escenarios inflamatorios, las células de Müller sufren la citada gliosis reactiva. La gliosis de las células de Müller es una respuesta generalizada, específica y muy compleja de las células de Müller hacia el daño o la infección en la que muchos elementos se encuentran implicados (Pekny and Pekna, 2014). Las células de Müller se activan por casi todos los daños que pueda sufrir la retina (Bringmann et al., 2009). Se cree que la gliosis reactiva es el resultado de señales que son recibidas del tejido dañado o enfermo que disparan una cascada molecular dentro de las células de Müller (Fischer and Bongini, 2010). Por otro lado, Bringmann y colaboradores afirman que las células de Müller son neuroprotectoras, pero que sin embargo pueden también detener el apoyo a las neuronas y contribuir a su degeneración neuronal (Bringmann and Wiedemann, 2012).

Las características típicas de la gliosis de las células de Müller implican la hipertrofia celular y la sobreexpresión de la expresión de los filamentos intermedios, como la proteína GFAP. Además de tasas incrementadas de proliferación, pérdida de función, inflamación, desregulación de la glutamina sintetasa y remodelado del tejido y de la vasculatura (Belecky-Adams et al., 2013). Cuando las células de Müller sobreexpresan las proteínas como la GFAP y la vimentina se alteran las propiedades físicas de las células y estas se hacen más rígidas. Esto permite establecer una cicatriz glial que constituye una barrera física y bioquímica para las infecciones, así como una barrera para la regeneración (Karl and Reh, 2010).

Existen diferentes estados de gliosis desde el suave al moderado, en el primero las células pueden verse sometidas a hipertrofia y mostrar cambios de funcionalidad, aunque la regeneración axonal puede verse favorecida, a través de la

sobrerregulación de los factores que intensifican su crecimiento y reparación. Una activación aguda de la glía es neuroprotectora, ya que si el desencadenante es eliminado, las células pueden revertir a su condición inicial, mientras que la activación mantenida es perjudicial pues las células que se encuentran bajo hipertrofia, pierden su funcionalidad, forman cicatrices gliales que inhiben la regeneración axonal y la supervivencia neuronal y que también pueden proliferar (Vecino et al., 2015). La gliosis proliferativa se asocia generalmente con gliosis crónica y normalmente es perjudicial aunque también puede tener efectos beneficiosos (Sofroniew, 2009). Sin embargo, Vecino y colaboradores hipotetizan que tras un daño, la función de la retina puede quedar restaurada, con lo que las células de Müller en un proceso plástico deberían volver al estado original, aunque esto todavía tiene que ser confirmado (Vecino et al., 2015).

Nuestros resultados sugieren como ya era sabido y se ha observado en diversos modelos de degeneración retiniana, que existe una gliosis reactiva que va asociada a la degeneración en los ratones rd10 (tanto tratados como no tratados). Asimismo, se observa que, a día PN21 el tratamiento con P4 puede provocar un aumento de la reactividad de las células de Müller de los ratones rd10 y C57, en todas las zonas de la retina, todo esto puede ser debido a que la P4 parece estimular la gliosis inflamatoria. En este sentido existen estudios que han demostrado que la P4 y su metabolito, la DHP (5 $\alpha$ -dihidroprogesterona), son capaces de aumentar la expresión del ARNm de la proteína GFAP durante las horas del tratamiento con la P4 (Brinton et al., 2008). A diferencia de nuestros resultados, otros autores como Phillips y colaboradores encontraron cambios en la glía de Müller a partir de PN30 (Phillips et al., 2010).

Además, se llevó a cabo el estudio de la proteína GFAP a día PN23, con la finalidad de analizar la evolución de la gliosis reactiva y poder estudiar la posibilidad de que esta gliosis se convirtiera con el tiempo en una gliosis de tipo crónica o por el contrario se tratara de una gliosis aguda que podía revertir con el paso del tiempo. En el presente trabajo, los resultados muestran que a día PN23, del mismo modo que sucedía a día PN21 hay un aumento del marcaje de GFAP para los ratones rd10 frente a los controles. No obstante, a día PN23 el tratamiento con P4 disminuye de forma significativa el marcaje de GFAP en los animales rd10 tratados con P4, de forma más concreta, el tratamiento con P4 disminuye de forma significativa el marcaje de GFAP en los animales rd10 respecto de los rd10 no tratados en la zona de la periferia lejana, mostrando también en el resto de zonas (periferia central y centro de la retina) un descenso del marcaje de GFAP aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Se realizó la comparación de la evolución del marcaje de GFAP entre los días PN21 y PN23, los resultados demuestran que existe una alteración de la gliosis en la retina de todos los grupos de ratones a lo largo del tiempo. Se observa un aumento de GFAP en los grupos no tratados y sobretodo en los ratones rd10 no tratados a lo largo de los días, debido al avance de la degeneración. La P4 parece tener un efecto en todas las zonas de la retina de los ratones rd10, debido a que disminuye el marcaje de GFAP a día PN23. A su vez, también en la periferia lejana del grupo C57 tratado se puede observar el descenso de la proteína GFAP. Este hecho nos hace pensar que *a priori*, el aumento de marcaje glial observado a día PN21 con el tratamiento con P4 sea de tipo agudo y que la gliosis observada a día PN23, pueda ir revirtiendo debido al estado “más saludable” de la retina favorecido por la administración de P4, evitando de este modo la tan temida cicatriz glial.

Al igual que sucede en la RP y han demostrado nuestros resultados, en retinopatías isquémicas, las células de Müller pueden experimentar un daño oxidativo inducido en respuesta al daño isquémico, mostrando un fenotipo reactivo mediante la sobrerregulación del GFAP (Fitzgerald et al., 1990, Kim et al., 1998, Fletcher et al., 2010, Prentice et al., 2011). Los resultados de la presente tesis muestran como la P4 parece tener un efecto en la gliosis de las células de Müller. Aunque en un primer momento el tratamiento con P4 agudiza la inflamación, pues a día PN21 se observa un aumento de la cuantificación de GFAP, este efecto disminuye dos días después de la última dosis del tratamiento con P4, a día PN23. En nuestro laboratorio se han observado resultados similares respecto a la inhibición de la proteína GFAP, en el modelo de ratón rd1 (Sánchez-Vallejo et al., 2015).

A su vez, estudios como el de Tan y colaboradores en el año 2015 han demostrado que otros compuestos como el ebselen (lípidos sintéticos solubles con capacidad de quelar  $H_2O_2$ ) son capaces de mejorar el estado oxidativo, gliótico, pro-angiogénico y pro-inflamatorio de las células de Müller expuestas a hipoxia, tanto en cultivo celular como en ratones con retinopatía isquémica inducida (Tan et al., 2015).

Finalmente, nuestros resultados corroboran como también ha sido propuesto por otros autores, la capacidad de aumentar la señalización de la supervivencia celular, así como también, el papel antioxidante y antiinflamatorio de las progestinas (Singh, 2001, Djebaili et al., 2005, Moorthy et al., 2005, Stein, 2008).

## **7. La progesterona reduce el estrés oxidativo**

### **7.1. Efecto de la progesterona sobre el ácido glutámico, el GSH, la enzima GCLC y el GSSG a día PN21**

#### **7.1.1. Ácido glutámico**

El glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (GABA; gamma aminobutyric acid) son los mayores neurotransmisores excitatorio e inhibitorio de la retina. El glutamato es el neurotransmisor entre las células bipolares y los fotorreceptores y entre las células bipolares y las ganglionares, mientras que el GABA es empleado por las células horizontales y amacrinas en la vía de transmisión lateral, modulando la transmisión neural en las capas sinápticas más externas e internas (Kalloniatis and Tomisich, 1999, Yang, 2004).

El glutamato liberado por las neuronas durante la neurotransmisión es tomado por las células de Müller, en estas células deberá ser mantenido a concentraciones bajas para evitar el exceso de glutamato en los espacios extracelulares de la retina, lo que provocaría excitotoxicidad (Ola et al., 2011).

A su vez, la hiperestimulación de los receptores de glutamato provoca excitotoxicidad en la retina y se ha visto que de forma general en el SNC dicha excitotoxicidad conduce a la neurodegeneración (Barnet and Bull, 2008). No obstante, cabe destacar que la muerte celular excitotóxica no siempre resulta de un exceso de glutamato y que durante la isquemia en la retina los niveles extracelulares de glutamato que se alcanzan pueden no ser suficientes para inducir daño neuronal (Casper et al., 1982, Louzada-Junior et al., 1992, Neal et al., 1994, Muller et al., 1997).

En los ratones rd1, se ha relacionado directamente la pérdida de fotorreceptores a unas elevadas concentraciones extracelulares de glutamato y a la excitotoxicidad (Delyfer et al., 2005). Una posible causa de la excitotoxicidad en este modelo es la acumulación de GMPc, derivada de la patogénesis de esta enfermedad, dicha acumulación provoca una despolarización de los bastones y una intensificación de la liberación del glutamato (Barnet and Bull, 2008).

Otros estudios han sugerido que los estrógenos y la P4 podrían deber sus propiedades neuroprotectoras a un mecanismo relacionado con el glutamato (Green and Simpkins, 2000, Roof and Hall, 2000, Chen et al., 2001, Cimarosti et al., 2006, Singh, 2006, Brann et al., 2007). 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  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocado por una presión inducida, puede desencadenar la síntesis de neuroesteroides (Ferrarese et al., 1991, Guarneri et al., 1998, Ishikawa et al., 2014).

Asimismo, para el caso del cerebro, otros autores hipotetizan que los estrógenos son capaces de intensificar la expresión de los transportadores de glutamato en los astrocitos, lo que podría promover el transporte del exceso de glutamato desde el cerebro a la sangre (Berl et al., 1962, O'Kane et al., 1999) y facilitar la eliminación del exceso de glutamato. Además, otros autores también proponen que la protección de la toxicidad del glutamato por parte de la P4, está asociada con elevados niveles del BDNF y con la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK; mitogen-activated protein kinases) (Kaur et al., 2007).

En el presente estudio, hemos podido observar un aumento de los valores de glutamato en los grupos de ratones rd10 (rd10 tratado y rd10 no tratado) respecto de los grupos control. Estos resultados están en parte, de acuerdo con lo observado por Sánchez y colaboradores en un experimento similar en ratones rd1 tratados con P4. En este caso también existía un aumento de los valores de glutamato de los ratones rd1 respecto a los control. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados en este caso se observó una disminución significativa de los valores de glutamato a día PN15 y PN17 en los ratones rd1 tratados con P4 (Sánchez-Vallejo et al., 2015), esto es 8 y 10 días tras el inicio del tratamiento (PN7). Por lo que hipotetizamos que en nuestro caso, debido a que la determinación del glutamato se ha realizado 6 días (PN21) tras el inicio del tratamiento (PN15) la P4 no es capaz de actuar a través de la atenuación de las concentraciones de glutamato para los ratones rd10.

### **7.1.2. GSH, GCLC y GSSG**

El estrés oxidativo sucede cuando existe un desequilibrio entre la producción en exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS; reactive oxygen species) y la capacidad de quelar estas ROS por los mecanismos antioxidantes endógenos (Valko et al., 2007).

Se ha sugerido que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la RP, tanto en modelos animales como en pacientes de RP (Komeima et al., 2007, Lee et al., 2011b, Oveson et al., 2011) y que además constituye una de las posibles causas de la disfuncionalidad de los conos y la muerte celular en esta enfermedad (Yue et al., 2004, Shen et al., 2005, Komeima et al., 2006).

Bhatt y colaboradores demostraron que tanto los conos como los bastones generaban ROS cuando la retina se somete a estrés (deprivación de suero), en cultivo de explantes de retina (Bhatt et al., 2010). Además, en enfermedades como el glaucoma o la RP, se ha demostrado que la muerte celular por apoptosis se exagera por el estrés oxidativo en los fotorreceptores y en las células ganglionares, debido a la elevada sensibilidad de estas células al estrés oxidativo durante los estadios tempranos de la degeneración (Sanvicens et al., 2004, Oveson et al., 2011, Chrysostomou et al., 2013, Himori et al., 2013).

La hipótesis de la toxicidad por el oxígeno en la RP resalta la importancia de la existencia de una densidad celular relativa de bastones que es crucial para prevenir la muerte de los conos (Biel et al., 1999, Yang et al., 1999, Stearns et al., 2007). Según esta hipótesis la falta de los bastones que van muriendo durante la RP disminuiría el consumo de oxígeno por parte de estas células, lo que sometería a los conos a unas mayores concentraciones de oxígeno. Debido a que el ratio bastones/conos es mayor en la periferia lejana, esto podría explicar por qué en los seres humanos con RP la restricción del campo visual sucede primero en la periferia (Shen et al., 2005). Esta hipótesis podría explicar, al menos en parte, por qué en la RP los conos mueren de forma lenta en un proceso que tarda años o décadas, de modo que, el daño oxidativo puede ser acumulativo (Punzo et al., 2012).

Sin embargo, para demostrar esta hipótesis, es necesario probar que los antioxidantes previenen o enlentecen la muerte celular en los modelos animales de degeneración primaria de los bastones. Si dichos estudios sugieren que existe eficacia, se necesitará realizar ensayos clínicos en pacientes jóvenes con RP que todavía posean un campo visual remarcable, para poder determinar si la pérdida de campo visual puede ser enlentecida o detenida por los antioxidantes (Shen et al., 2005).

Gracias a los sistemas de defensa antioxidantes propios que se encuentran en los segmentos internos de los fotorreceptores, estas células son capaces de superar el estrés oxidativo inherente en ellas (Punzo et al., 2012). Sin embargo, los segmentos externos de los fotorreceptores, debido a que tienen una falta de los agentes enzimáticos detoxificantes, eliminan los productos derivados de la oxidación mediante la generación y eliminación diaria de los discos de los segmentos externos (Winkler, 2008).

Los sistemas de defensa antioxidante incluyen algunos antioxidantes producidos en el cuerpo de forma endógena y otros obtenidos de forma exógena a través de la dieta (Yu et al., 2012). Entre los mecanismos endógenos se incluyen defensas enzimáticas como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD). Además, también existen defensas no enzimáticas, tales como el glutatión (GSH), el ácido dihidrolipoico, la melatonina, el ácido úrico, péptidos de histidina, ferritina y transferrina, etc (Watson, 1993, Sharma and Agarwal, 2004, Kunwar and Priyadarsini, 2011). Asimismo, otros sistemas de reparación enzimática que podemos encontrar en los tejidos oculares son por ejemplo, las tioltransferasas y las tiorredoxinas (Lou, 2003).

Los dos antioxidantes clave en el ojo, son el ácido ascórbico y el GSH (Riley et al., 1980, Reiss et al., 1986), este último se encuentra en mayor cantidad en el cristalino (Aebi and Flohé, 1974), pero la retina también contiene concentraciones de GSH que hacen frente a la elevación descontrolada del estrés oxidativo (Ganea and Harding, 2006). 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 and Aw, 2012).

Además, bajo condiciones normales, la mayor parte del GSH de la retina se encuentra confinado en las células de Müller, los astrocitos y las células horizontales. De modo que bajo condiciones de estrés oxidativo, el GSH es rápidamente liberado por las células de Müller hacia las neuronas (Pow and Crook, 1995, Schutte and Werner, 1998).

En la retina, se ha encontrado que los antioxidantes proporcionan protección reduciendo el daño oxidativo encontrado en esta (Ahuja et al., 2005, Komeima et al., 2006). Este hecho se ha estudiado en los últimos años en diversos modelos de animales de RP, como es el rd10. Diversos autores han demostrado cómo la administración de antioxidantes, además de disminuir el estrés oxidativo, era capaz de preservar histológicamente la retina y de retrasar la muerte celular por apoptosis (Boatright et al., 2006, Corrochano et al., 2008, Wang et al., 2014).

En cuanto al momento más adecuado para el inicio de una terapia neuroprotectora con antioxidantes en los ratones rd10, algunos autores han considerado adecuado comenzar los tratamientos alrededor de PN15. Por ejemplo, Wang y colaboradores han empleado recientemente un tratamiento antioxidante con extractos de polisacáridos de bayas de Gogi comenzando el tratamiento a día PN14

(Wang et al., 2014). Del mismo modo, en nuestro caso nos planteamos dar el tratamiento con P4 en los días que habíamos observado existencia de muerte celular en nuestros ratones rd10, esto es entre PN13 y PN21 (Figuras 22 y 23). De este modo se administró la dosis de 150 mg/kg de P4 a los días PN15, PN17, PN19 y PN21.

Lederman y colaboradores en el año 2014, han determinado que en las retinas sometidas a un estrés oxidativo crónico existe una sobrerregulación del mecanismo de defensa antioxidante, que puede conferir de forma transitoria una protección parcial (Lederman et al., 2014).

En este sentido en nuestro caso hemos podido observar una tendencia al aumento del GSH en los ratones rd10 (tratado y no tratado) (Figura 47), suceso que podría deberse al mecanismo de defensa antioxidante endógeno por parte de las propias células para hacer frente a la situación extraordinaria de estrés oxidativo a la que se ven sometidas durante la degeneración. Es por ello, que hipotetizamos que una disminución del GSH producida por el estrés oxidativo, podría dar lugar a que la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL) aumentara su actividad y por tanto se incrementara la síntesis de GSH.

Resultados similares fueron encontrados por nuestro grupo de investigación en ratones rd1, donde se observó una elevación en las concentraciones retinianas del GSH en los ratones rd1 tratados con una dosis oral de 100 mg/kg de P4 y también en los no tratados a día PN17 (Sánchez-Vallejo et al., 2015).

Sin embargo, a su vez hemos podido observar la existencia de elevados niveles de GSSG en los ratones rd10 no tratados con P4 (Figura 48), mostrando que aunque en estos ratones haya más cantidad de GSH, también hay más GSSG, probablemente debido a la situación de estrés oxidativo. Además, dicho aumento de GSSG no ha sido observado en los ratones rd10 tratados.

Unos altos niveles de GSH pueden ser consecuencia de al menos dos procesos: a) un aumento en la biosíntesis del GSH y b) un aumento en la conversión del GSSG en GSH por parte de la glutatión reductasa (Tokarz et al., 2013). Bajo condiciones normales, el ratio de síntesis de GSH está determinado por dos factores, la disponibilidad de la cisteína y la actividad de la enzima limitante en la síntesis *de novo* del GSH, la GCL (Trotta et al., 1974, Griffith and Mulcahy, 1999, Hoang et al., 2009).

En nuestro caso, nos planteamos si la tendencia al aumento del GSH observada en los ratones del modelo rd10 podría ser debida a la síntesis *de novo* del GSH

mediante un aumento en la expresión de la subunidad catalítica de la GCL, la glutamato cisteína ligasa catalítica (GCLC). Los resultados sugieren la existencia de un aumento de expresión de dicha enzima en los ratones del modelo rd10 respecto de los grupos control (C57 tratado y C57 no tratado). De este modo, el citado aumento en el GSH en los ratones rd10 podría estar relacionado con la tendencia al incremento de la síntesis *de novo* de GSH.

No obstante, según nuestros resultados, la P4 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 (C57 tratado y rd10 tratado) respecto de los correspondientes grupos no tratados con P4. A diferencia de 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 and Johnson, 2004, Tamasi et al., 2004, Tan et al., 2015) y también de proteger contra el estrés oxidativo en tejidos, incluido la retina (Nakamura et al., 2002, Uno et al., 2010, Xu et al., 2014).

A su vez, cabe destacar que al tomar los valores de GSH y GSSG de forma conjunta se puede calcular el ratio GSH/GSSG. Dicho ratio es comúnmente usado para medir el estado redox de la célula, de manera que la reducción en el citado ratio refleja la capacidad antioxidante celular (Schafer and Buettner, 2001, Wang et al., 2014).

Es por ello que en el presente trabajo, además de obtener las concentraciones de GSH y GSSG, también se ha calculado la relación GSH/GSSG. Se ha observado que en los animales del modelo rd10 que han sido tratados con P4 el citado ratio está elevado significativamente respecto a los ratones del modelo rd10 sin tratar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que han podido observar como reconocidos antioxidantes como el par ácido lipoico/ácido dihidrolipoico pueden regenerar otros antioxidantes como la vitamina C, E y el ratio de GSH/GSSG (Packer et al., 1995, Szelag et al., 2012, Dalazen et al., 2014).

Con lo que hipotetizamos que ante la existencia de estrés oxidativo en los ratones rd10, como mecanismo de defensa, la célula aumenta la síntesis *de novo* de GSH en los ratones rd10 (tratado y no tratado). Sin embargo, solo los ratones rd10 no tratados muestran valores de GSSG elevados, demostrando la incapacidad de la GSSG reductasa (GR) de regenerar el GSSG a GSH, quizás debido al gran ambiente pro-oxidante. Será en los rd10 tratados con P4, donde el GSSG será capaz de

regenerarse a GSH, dando lugar a un ratio GSH/GSSG aumentado en los ratones rd10 tratados con P4.

Estos resultados pueden sugerir que la degeneración en los ratones rd10 está asociada a un aumento del estrés oxidativo y que al menos en parte la protección de la P4 frente a la degeneración puede ser debida a la activación del sistema de regeneración del GSSG a GSH por la GR favorecida por la P4.

## **7.2. Efecto de la progesterona sobre la peroxidación lipídica**

Los lípidos constituyen un 15% de la masa de un fotorreceptor, comparado con el 1% de media en otras células (Scott et al., 1988), es por ello que la peroxidación lipídica, un fenómeno que consiste en el deterioro oxidativo de grasas, sobre todo de los ácidos grasos insaturados, es de gran importancia en enfermedades como la RP en las que el estrés oxidativo forma parte de la fisiopatología de la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado la alteración de los niveles de peroxidación lipídica en modelos de daño de la retina de diversas especies, como por ejemplo en animales como el cerdo o las ratas (Ko et al., 2005, Yucel et al., 2005, Martinez-Fernandez de la Camara et al., 2014).

De forma más detallada, la peroxidación lipídica tiene lugar cuando radicales como el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el hidroperóxido ( $\text{HO}_2\cdot$ ) se generan en la proximidad de las membranas celulares y atacan a los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, formando lípidos peroxidados que son muy inestables, ya que rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden iniciar a su vez nuevas cadenas de peroxidación de los fosfolípidos (Shadyro et al., 2002). De modo que, los marcadores de peroxidación lipídica a menudo proporcionan el indicador más importante de la implicación de la peroxidación lipídica en la patogénesis de enfermedades como la RP (Shen et al., 2005).

### **7.2.1. Determinación del malondialdehído a día PN21**

Entre los productos de la peroxidación lipídica se incluyen una serie de aldehídos que actúan como mensajeros tóxicos secundarios, modificando la acción de los radicales libres iniciales, ya que al contrario que estos, poseen una vida media mucho mayor y pueden por tanto difundir desde su lugar de producción, alcanzando células o tejidos situados a cierta distancia. Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más estudiados han sido el

malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos. El gran reto en el estudio de los procesos patológicos y su relación con la peroxidación lipídica es que a menudo es difícil determinar si la peroxidación derivada de estos aldehídos está realmente implicada en causar la enfermedad o es una consecuencia de ello (Ayala et al., 2014).

Los productos de la peroxidación lipídica pueden provocar respuesta inmune (Amengual et al., 1997), iniciar fibrosis o inflamación (Poli and Parola, 1997), inactivar enzimas que contienen grupos tiol (Uchida and Stadtman, 1993) o iniciar la transcripción génica (Boulanger et al., 1992) o muerte celular programada (Kruman et al., 1997). Es por ello, que la existencia de un tratamiento que disminuya la peroxidación lipídica podrá indirectamente mejorar procesos patológicos como los citados anteriormente.

El MDA se ha utilizado de forma amplia como biomarcador para determinar el estrés oxidativo en situaciones clínicas (Giera et al., 2012). Este subproducto de la peroxidación lipídica una vez formado puede ser metabolizado enzimáticamente, reaccionar con proteínas celulares y tisulares o con el ADN, para formar aductos que producen daños biomoleculares. Por ello, debido a su elevada reactividad y toxicidad, esta molécula es muy relevante para la investigación biomédica (Ayala et al., 2014).

La toma diaria de ciertos antioxidantes tales como vitaminas se ha asociado con niveles reducidos de aductos de MDA-ADN y de otros marcadores de oxidación del ADN (Sram et al., 2009). Es por ello que, dada la importancia de la peroxidación lipídica como consecuencia del estrés oxidativo, nos propusimos estudiar el posible efecto de la P4 en la peroxidación lipídica *in vivo*, en el modelo de ratón rd10 y también *ex vivo*, tras la inducción de la peroxidación lipídica en tejido hepático.

Las concentraciones de MDA observadas en nuestro estudio *in vivo* a día PN21 demuestran un aumento del MDA en los ratones rd10 sin tratar. Además, los resultados sugieren que la P4 tiene efecto en la inhibición de la peroxidación lipídica, debido a que es capaz de reducir las concentraciones de MDA en los ratones rd10, alcanzando incluso valores controles.

Estos resultados están de acuerdo con diversos autores que han observado en ratones rd1 tratados con una mezcla de antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, el MnTABP con función de SOD y el ácido  $\alpha$ -lipoico) la disminución de otro marcador de peroxidación lipídica como es la acroleína (Komeima et al., 2006). Autores como Sancho-Tello y colaboradores demostraron una reducción del MDA tras un tratamiento

con ebselen (lípidio sintético soluble con capacidad de quelar  $H_2O_2$ ) en ratas con daño inducido en la retina por un consumo de alcohol crónico (Sancho-Tello et al., 2008). Asimismo, Bosch y colaboradores también emplearon ebselen en sus estudios demostrando la disminución del MDA en los fluidos oculares de conejos con uveítis experimental (Bosch-Morell et al., 2002).

### **7.2.2. Inducción de la peroxidación lipídica en tejido**

Con la finalidad de corroborar el efecto *in vivo* observado en la inhibición de la peroxidación lipídica por parte de la P4, se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de P4 en un modelo de daño oxidativo *ex vivo*.

Para ello, se ha llevado a cabo la inducción de peroxidación lipídica en tejido hepático, a partir de sales de hierro Fe (II) y ácido ascórbico (Ohkawa et al., 1979, Fraga and Tappel, 1988, Battioni et al., 1991, Oboh et al., 2014). Dicha inducción de la peroxidación tiene lugar gracias a que los metales de transición pueden también estimular la peroxidación lipídica al catalizar la descomposición de los hidroperóxidos formados (ROOH) para formar radicales alcoxi (RO-) y peroxi (ROO-), que pueden iniciar además amplias reacciones en cadena. En algunas circunstancias estos procesos precisan de la presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico (Baysal et al., 1989). Este último, aunque puede actuar como antioxidante a altas concentraciones, en pequeña cantidad podría tener actividad pro-oxidante. Este comportamiento se debe a que a baja concentración actúa manteniendo una parte del hierro en estado ferroso (mayor actividad pro-oxidante) a través de la reacción de Fenton (Buettner and Jurkiewicz, 1996).

En este sentido, en el presente trabajo se ha demostrado que la P4 posee la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de una forma dosis-dependiente también *ex vivo*. Se ha podido observar una correlación estadísticamente significativa entre la dosis de P4 empleada y la concentración de MDA, de modo que los niveles de MDA descienden a medida que se ha aplicado una mayor concentración de P4. Estos resultados están de acuerdo con el efecto dosis-respuesta de la administración de P4 observado en los ratones rd10 y discutido en el apartado 2 de la discusión, Además, cabe resaltar la importancia de estos resultados debido a que la peroxidación de los lípidos de las membranas puede cambiar la funcionalidad de las membranas, permeabilidad, procesos metabólicos y equilibrio iónico (Adibhatla and Hatcher, 2008).

### 7.3. Determinación de la viabilidad celular en un cultivo con células ARPE-19 tras el tratamiento con sulforafano y progesterona

El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de gran variedad de enfermedades crónicas degenerativas y neurodegenerativas. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente en el apartado 7.1.2. de la discusión, bajo un estado fisiológico normal, los diferentes tejidos, entre ellos el tejido ocular, poseen varias enzimas antioxidantes para superar el estrés oxidativo provocado por el metabolismo. Pero cuando existe un daño ocular tiene lugar una sobreproducción de ROS y radicales libres que sobrepasan los mecanismos endógenos antioxidantes, dando lugar a estrés oxidativo y en última instancia al desarrollo de una condición patológica (Miranda et al., 2010, Bian et al., 2012, Yu et al., 2012, Iloki et al., 2015).

A pesar de que el  $H_2O_2$  no es en sí mismo un radical libre puede dar lugar a ellos a través de diversas reacciones químicas y se presenta en valores detectables en todos los tejidos animales. Además, es una molécula muy estable y que puede alcanzar sitios muy distantes del lugar donde es generado. Esto es debido a que el  $H_2O_2$  es una molécula pequeña y sin carga, que cruza fácilmente las membranas celulares y se localiza en múltiples compartimentos subcelulares (Bienert et al., 2006).

Los efectos del  $H_2O_2$  son dependientes de la concentración y tales efectos pueden incluir desde afectar a la proliferación celular, la migración, supervivencia, diferenciación y expresión génica (Rhee et al., 2000, Mittler et al., 2011, Finkel, 2012, Zhu et al., 2012, Eno et al., 2013, Kim et al., 2014). No obstante, 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  $H_2O_2$ .

Es por ello que 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 et al., 2010, Zheng et al., 2010, Jia et al., 2011) como es el caso de las células del EPR.

El EPR, está compuesto por una monocapa de células pigmentadas que contienen melanina y su integridad es esencial para la visión. El EPR puede actuar contra el estrés oxidativo y debido a que se encuentra adyacente a la retina externa, lleva a cabo funciones que son esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores, que son altamente susceptibles a la oxidación (Tanito et al., 2002). En enfermedades degenerativas de la retina como la DMAE y la RP, debido a que la

retina adulta no se regenera, el EPR puede aparecer dañado. Concretamente en casos avanzados de RP se pueden observar la presencia de depósitos de pigmento en forma de espículas en la periferia media de la retina, unido a la atrofia del EPR (García-Sandoval, 2001).

Además, el EPR posee un alto riesgo de sufrir estrés oxidativo porque se encuentra en un ambiente con una elevada tensión de oxígeno y está expuesto a la luz que puede ser fototóxica (Wu et al., 2006) En el EPR, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce durante la fagocitosis diaria y creación de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores y es generado como consecuencia de la irradiación de luz de la melanina.

En el presente trabajo, se realizó un estudio de inducción del estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células del EPR, las células ARPE-19. Todo ello con el objetivo de corroborar si el mecanismo de acción por el que la progesterona es neuroprotectora era debido a su efecto antioxidante, como se ha podido deducir de los resultados *in vivo*. A su vez, también se pretendía comparar el efecto de la P4 con el efecto de otro conocido antioxidante, el sulforafano. Este compuesto es el isotiocianato mejor caracterizado y que se encuentra en grandes cantidades en vegetales del género de las crucíferas como el brócoli, la col, berza, el rábano y la mostaza (Zhang et al., 1992). El sulforafano será objeto de nuestro estudio porque se sabe que puede actuar como antioxidante generando altos niveles de GSH, además de tener efectos en el ciclo celular y la apoptosis (Zhang and Talalay, 1994, Shan et al., 2006, Herr and Buchler, 2010).

Nuestros resultados demuestran que la aplicación de dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a células en cultivo provoca una disminución de la viabilidad celular dosis-dependiente. Además, tras la inducción del estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ha demostrado que la aplicación de P4 produce una tendencia al aumento de la supervivencia celular de forma dosis-dependiente y que la P4 es más efectiva que el sulforafano al aumentar más la supervivencia celular y al ser aplicados a una misma dosis (10µM).

Estos resultados están de acuerdo con otros autores que han observado un aumento de la viabilidad de las células ARPE-19 al ser tratadas con diversos compuestos antioxidantes. Por ejemplo, extractos de plantas como *Bucida buceras L.* (Combretaceae), han demostrado tener una mejora de la viabilidad celular en cultivos de células ARPE-19 a los que se les había administrado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (Iloki et al., 2015). Estos autores demostraron que las células

ARPE-19 no son muy sensibles a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12,5-200 μM), pero sí que lo son a altas concentraciones (400-1600 μM), es entonces cuando parece que el mecanismo de defensa antioxidante parece no ser capaz de superar un estrés oxidativo tan alto. Es por ello, que en nuestro caso empleamos las concentraciones de 500 y 750 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pues parecían unas concentraciones adecuadas para demostrar si la P4 era capaz de apoyar el sistema endógeno de defensa antioxidante para mejorar la viabilidad celular.

Diversos autores han empleado estas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o similares con resultados parecidos. Estudios de Lian y colaboradores con los polisacáridos de *Lycium barbarum* (planta de las bayas de Gogi) han obtenido una mejora de la viabilidad en células ARPE-19 que se habían sometido a un pulso de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras un co-tratamiento con el extracto de estas bayas (Liu et al., 2015). Otros autores indujeron estrés oxidativo con concentraciones de 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando como co-tratamiento la combinación de luteína y zeaxantina, demostrando que esta combinación de antioxidantes podía inhibir la muerte de células ARPE-19 de forma dosis-dependiente (Xu et al., 2013). Del mismo modo, la curcumina, utilizada a una concentración de 15 μM, es capaz de mejorar la viabilidad de las células ARPE-19 que habían sido cultivadas con dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Woo et al., 2012). Otros autores han demostrado resultados similares con compuestos como la astaxantina que también reducía la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 200 μM (Li et al., 2013) o también la vitamina C, que ha podido demostrar sus efectos antioxidantes en este tipo de estudios (Wei et al., 2014).

En conjunto nuestros datos sugieren que los efectos protectores de la P4 podrían estar mediados de forma parcial a través de la disminución de la gliosis, la inhibición del estrés oxidativo y de la apoptosis, conduciendo esto a la mayor supervivencia de los fotorreceptores en los ratones rd10.

## **CONCLUSIONES**

---



**1.** Se observa una progresiva degeneración de la retina en nuestro modelo de ratón de rd10, sin mostrar diferencias entre los ratones control y rd10 a nivel histológico y de muerte celular a los días PN5 y PN13 aunque a día PN21 si se observa una disminución significativa del número de fotorreceptores y un aumento significativo de células TUNEL positivas.

**2.** La administración oral de dosis crecientes de progesterona a los ratones rd10 demuestra tener un efecto dosis-dependiente que da lugar al aumento significativo del número de filas de fotorreceptores a día PN21 en la periferia lejana y central de la retina de estos ratones. La dosis más efectiva es la de 150 mg/kg cuyo tratamiento también se ha demostrado que disminuye el número de células TUNEL positivas.

**3.** La progesterona administrada a ratones rd10 y controles C57BL/6J a una dosis de 150 mg/kg demuestra tener los siguientes efectos:

**3.1.** La progesterona no altera los niveles de expresión de las proteínas analizadas por western blot; BDNF, iNOS, pCREB, CREB y LC3 a día PN21.

**3.2.** La administración de progesterona reduce de forma significativa la presencia de la nNOS en los ratones C57 tratados con progesterona a día PN21.

**3.3.** Al administrar progesterona se observa a día PN21 un aumento significativo de la gliosis reactiva en todas las zonas de la retina de los ratones rd10 tratados y C57 tratados.

**3.4.** Los ratones rd10 que han sido tratados con progesterona presentan una disminución significativa de la gliosis reactiva a día PN23 en comparación con los datos observados a día PN21. A su vez también existe una disminución significativa de la gliosis en la periferia lejana de la retina de los ratones rd10 tratados respecto de los ratones rd10 sin tratar a día PN23.

**3.5.** La progesterona provoca cambios en los parámetros de estrés oxidativo al ser administrada a los ratones rd10 y C57:

**3.5.1.** La administración de progesterona por vía oral disminuye las concentraciones de GSSG en la retina de los ratones rd10 y de forma significativa en los C57. Además, la administración de progesterona aumenta significativamente el ratio GSH/GSSG en la retina de los ratones rd10 y C57.

**3.5.2.** La administración de progesterona por vía oral reduce de forma significativa las concentraciones de MDA en la retina de los ratones C57 y rd10.

**4.** La progesterona es neuroprotectora gracias a su acción antioxidante, efecto demostrado tanto *in vivo* como *ex vivo* (mediante la reducción de los niveles de MDA de forma dosis-dependiente) e *in vitro* (aumentando la viabilidad de las células ARPE-19 sometidas a un estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



<https://sph.uth.edu/retnet/>.

<https://www.clinicaltrials.gov/>.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>.

Adibhatla RM, Hatcher JF (2008) Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB reports* 41:560-567.

Aebi H, Flohé L (1974) Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the Ferman Society of Biological Chemistry, Tübingen, March 1973. New York, NY, EE.UU.: Georg Thieme.

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.

Ahuja P, Caffé AR, Ahuja S, Ekstrom P, van Veen T (2005) Decreased glutathione transferase levels in rd1/rd1 mouse retina: replenishment protects photoreceptors in retinal explants. *Neuroscience* 131:935-943.

Aits S, Jaattela M (2013) Lysosomal cell death at a glance. *Journal of cell science* 126:1905-1912.

Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 89:121-145.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.

Alder WA, Cringle S (1988) The effect of raised intraocular pressure on the intraretinal oxygen profiles. *Invest Ophthalmol vis sci* 29.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* 357:593-615.

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.

Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Tinahones F, Hughes GR (1997) Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *British journal of rheumatology* 36:964-968.

Aminmansour B, Nikbakht H, Ghorbani A, Rezvani M, Rahmani P, Torkashvand M, Nourian M, Moradi M (2012) Comparison of the administration of progesterone versus progesterone and vitamin D in improvement of outcomes in patients with traumatic brain injury: A randomized clinical trial with placebo group. *Advanced biomedical research* 1:58.

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.

- Anderson GD, Farin FM, Bammler TK, Beyer RP, Swan AA, Wilkerson HW, Kantor ED, Hoane MR (2011) The effect of progesterone dose on gene expression after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 28:1827-1843.
- Andreen L, Spigset O, Andersson A, Nyberg S, Backstrom T (2006) Pharmacokinetics of progesterone and its metabolites allopregnanolone and pregnanolone after oral administration of low-dose progesterone. *Maturitas* 54:238-244.
- Anger EM, Unterhuber A, Hermann B, Sattmann H, Schubert C, Morgan JE, Cowey A, Ahnelt PK, Drexler W (2004) Ultrahigh resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections. *Experimental eye research* 78:1117-1125.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* 55:373-399.
- Arango-Gonzalez B, Trifunovic D, Sahaboglu A, Kranz K, Michalakis S, Farinelli P, Koch S, Koch F, Cottet S, Janssen-Bienhold U, Dedek K, Biel M, Zrenner E, Euler T, Ekstrom P, Ueffing M, Paquet-Durand F (2014) Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PloS one* 9:e112142.
- Arensburg J, Payne AH, Orly J (1999) Expression of steroidogenic genes in maternal and extraembryonic cells during early pregnancy in mice. *Endocrinology* 140:5220-5232.
- Arroba AI, Wallace D, Mackey A, de la Rosa EJ, Cotter TG (2009) IGF-I maintains calpastatin expression and attenuates apoptosis in several models of photoreceptor cell death. *The European journal of neuroscience* 30:975-986.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annual review of physiology* 64:153-187.
- Asbury ET, Fritts ME, Horton JE, Isaac WL (1998) Progesterone facilitates the acquisition of avoidance learning and protects against subcortical neuronal death following prefrontal cortex ablation in the rat. *Behavioural brain research* 97:99-106.
- Atif F, Sayeed I, Ishrat T, Stein DG (2009) Progesterone with vitamin D affords better neuroprotection against excitotoxicity in cultured cortical neurons than progesterone alone. *Molecular medicine* 15:328-336.
- Audo I, Bujakowska K, Mohand-Said S, Tronche S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Lonjou C, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya S, Zeitz C (2011a) A novel DFNB31 mutation associated with Usher type 2 syndrome showing variable degrees of auditory loss in a consanguineous Portuguese family. *Molecular vision* 17:1598-1606.
- Audo I, Lancelot ME, Mohand-Said S, Antonio A, Germain A, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C (2011b) Novel C2orf71 mutations account for approximately 1% of cases in a large French arRP cohort. *Human mutation* 32:E2091-2103.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014:360438.

- Ayuso C, Millan JM (2010) Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome medicine* 2:34.
- Ayuso Garcia C (2001) Estudio de la retinosis pigmentaria en España. In: La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético (estudios, S., ed) Madrid: Organización Nacional de Ciegos Españoles, Dirección de Autonomía Personal y Bienestar Social.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekstrom PA, van Veen T (2007) CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain research* 1129:116-129.
- Backstrom T, Wahlstrom G, Wahlstrom K, Zhu D, Wang MD (2005) Isoallopregnanolone; an antagonist to the anaesthetic effect of allopregnanolone in male rats. *European journal of pharmacology* 512:15-21.
- Baehr W, Frederick JM (2009) Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision research* 49:2636-2652.
- Barber AC, Hippert C, Duran Y, West EL, Bainbridge JW, Warre-Cornish K, Luhmann UF, Lakowski J, Sowden JC, Ali RR, Pearson RA (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.
- Barhoum R, Martinez-Navarrete G, Corrochano S, Germain F, Fernandez-Sanchez L, de la Rosa EJ, de la Villa P, Cuenca N (2008) Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience* 155:698-713.
- Barlow HB, Levick WR (1965) The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *The Journal of physiology* 178:477-504.
- Barnet NL, Bull ND (2008) Glutamate Transporters and Retinal Disease and Regulation. In: *Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery* (Tombran-Tink, J. and Barnstable, C. J., eds), pp 333-353.
- Barone I, Novelli E, Piano I, Gargini C, Strettoi E (2012) Environmental enrichment extends photoreceptor survival and visual function in a mouse model of retinitis pigmentosa. *PloS one* 7:e50726.
- Barry MP, Dagnelie G, Argus IISG (2012) Use of the Argus II retinal prosthesis to improve visual guidance of fine hand movements. *Investigative ophthalmology & visual science* 53:5095-5101.
- Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro PL (2011) Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators of inflammation* 2011:891752.
- Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, Ustidal M (2006) Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell biochemistry and function* 24:307-311.

- Battioni JP, Fontecave M, Jaouen M, Mansuy D (1991) Vitamin E derivatives as new potent inhibitors of microsomal lipid peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications* 174:1103-1108.
- Baulieu EE (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent progress in hormone research* 52:1-32.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M (2001) Neurosteroids: beginning of the story. *International review of neurobiology* 46:1-32.
- Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-Testas I, Akwa Y (1996) Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cellular and molecular neurobiology* 16:143-154.
- Baykara B, Aksu I, Buyuk E, Kiray M, Sisman AR, Baykara B, Dayi A, Tas A, Ozdemir D, Arda MN, Uysal N (2013) Progesterone treatment decreases traumatic brain injury induced anxiety and is correlated with increased serum IGF-1 levels; prefrontal cortex, amygdala, hippocampus neuron density; and reduced serum corticosterone levels in immature rats. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 88:250-257.
- Baylor DA (1987) Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 28:34-49.
- Baysal E, Sullivan SG, Stern A (1989) Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on tBuOOH-induced erythrocyte membrane damage. *The International journal of biochemistry* 21:1109-1113.
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *Journal of medical genetics* 36:437-446.
- Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ (1994) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Molecular pharmacology* 46:399-405.
- Beckman DA, Brent RL (1990) Teratogenesis: alcohol, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, and cocaine. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2:236-245.
- Belecky-Adams TL, Chernoff EC, Wilson JM, Dharmarajan S (2013) Reactive muller glia as potential retinal progenitors. In: *Neural stem cells-new perspectives* Intech (Bonfanti, ed).
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature reviews Neuroscience* 6:565-575.
- Beltran WA, Allore HG, Johnson E, Towle V, Tao W, Acland GM, Aguirre GD, Zeiss CJ (2009) CREB1/ATF1 activation in photoreceptor degeneration and protection. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:5355-5363.
- Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H (1980) Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et biophysica acta* 620:281-296.

- Benítez MR, Campodonico GI, T.A. R, Miller Aguilera ME, Readi E (2001) Biodisponibilidad y absorción de progesterona micronizada por vía oral en mujeres fértiles con dosis única diaria. *Rev chil obstet ginecol* 66:255-261.
- Bennett J, Tanabe T, Sun D, Zeng Y, Kjeldbye H, Gouras P, Maguire AM (1996) Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nature medicine* 2:649-654.
- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J (2010) The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in retinal and eye research* 29:335-375.
- Berl S, Takagaki G, Clarke DD, Waelsch H (1962) Metabolic compartments in vivo. Ammonia and glutamic acid metabolism in brain and liver. *The Journal of biological chemistry* 237:2562-2569.
- Berridge MJ (2012) Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. In: *Cell Signalling Biology*.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 4:517-529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 1:11-21.
- Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in neurosciences* 26:314-320.
- Berson DM (2007a) Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454:849-855.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073.
- Berson EL (1976) Retinitis pigmentosa and allied retinal diseases: electrophysiologic findings. *Transactions Section on Ophthalmology American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology* 81:OP659-666.
- Berson EL (1993) Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 34:1659-1676.
- Berson EL (2007b) Long-term visual prognoses in patients with retinitis pigmentosa: the Ludwig von Sallmann lecture. *Experimental eye research* 85:7-14.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W (1993) Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 111:1456-1459.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson EJ, Anderson EJ, Johnson CA, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ (2010) Clinical trial of lutein in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A. *Archives of ophthalmology* 128:403-411.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Moser A, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson CA, Anderson EJ, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ

- (2004) Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Archives of ophthalmology* 122:1297-1305.
- Bessant DA, Kaushal S, Bhattacharya S (2004) Genética y biología de las distrofias retinianas hereditarias. In: *Adler's physiology of the eye*, pp 358-380 Madrid: Elsevier.
- Betz AL, Coester HC (1990) Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 21:1199-1204.
- Bhatt L, Groeger G, McDermott K, Cotter TG (2010) Rod and cone photoreceptor cells produce ROS in response to stress in a live retinal explant system. *Molecular vision* 16:283-293.
- Bian Q, Gao S, Zhou J, Qin J, Taylor A, Johnson EJ, Tang G, Sparrow JR, Gierhart D, Shang F (2012) Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells. *Free radical biology & medicine* 53:1298-1307.
- Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7553-7557.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 1758:994-1003.
- Bill A, Sperber GO (1990) Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye* 4 ( Pt 2):319-325.
- Bird AC (1995) Retinal photoreceptor dystrophies LI. Edward Jackson Memorial Lecture. *American journal of ophthalmology* 119:543-562.
- Bird AC, Marshall J (1986) Retinal pigment epithelial detachments in the elderly. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom* 105 ( Pt 6):674-682.
- Biswas S, Haselier C, Mataruga A, Thumann G, Walter P, Muller F (2014) Pharmacological analysis of intrinsic neuronal oscillations in rd10 retina. *PLoS one* 9:e99075.
- Blair IA (2008) DNA adducts with lipid peroxidation products. *The Journal of biological chemistry* 283:15545-15549.
- Blanks JC, Dorey CK (2009) Sensory aging: Vision. In: *Handbook of the Neuroscience of Aging* (Hof, P. R. and Mobbs, C., eds), p 720: Academic Press.
- Blom J, Giove T, Deshpande M, Eldred WD (2012) Characterization of nitric oxide signaling pathways in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology* 520:4204-4217.
- Boatright JH, Moring AG, McElroy C, Phillips MJ, Do VT, Chang B, Hawes NL, Boyd AP, Sidney SS, Stewart RE, Minear SC, Chaudhury R, Ciavatta VT, Rodrigues

- CM, Steer CJ, Nickerson JM, Pardue MT (2006) Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss. *Molecular vision* 12:1706-1714.
- Bok D (1985) Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 26:1659-1694.
- Bok D (1999) Photoreceptor "retinoid pumps" in health and disease. *Neuron* 23:412-414.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:6926-6937.
- Bortoff A (1964) Localization of slow potential responses in the Necturus retina. *Vision research* 4:627-635.
- Bosch-Morell F, Roma J, Marin N, Romero B, Rodriguez-Galiero A, Johnsen-Soriano S, Diaz-Llopis M, Romero FJ (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.
- Boughman JA, Fishman GA (1983) A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *The British journal of ophthalmology* 67:449-454.
- Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF (1992) Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circulation research* 70:1191-1197.
- Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347:677-680.
- Bowes C, Li T, Frankel WN, Danciger M, Coffin JM, Applebury ML, Farber DB (1993) Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2955-2959.
- Boya P (2012) Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. *Antioxidants & redox signaling* 17:766-774.
- Boya P, de la Rosa EJ (2005) Cell death in early neural life. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 75:281-293.
- Boya P, Kroemer G (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27:6434-6451.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15:713-720.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.

- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM (2007) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72:381-405.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:682-685.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A (2009) Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in retinal and eye research* 28:423-451.
- Bringmann A, Wiedemann P (2012) Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde* 227:1-19.
- Brinton RD (2013) Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature reviews Endocrinology* 9:241-250.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in neuroendocrinology* 29:313-339.
- Brune B, von Knethen A, Sandau KB (1998) Nitric oxide and its role in apoptosis. *European journal of pharmacology* 351:261-272.
- Buch PK, Bainbridge JW, Ali RR (2008) AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man. *Gene therapy* 15:849-857.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996) Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: *Handbook of Antioxidants vol. 3* (Cadenas and Packer, L., eds), pp 91-116 New York: Marcel Dekker.
- Burns ME, Arshavsky VY (2005) Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48:387-401.
- Burwell USDoHaHSSSM (2014) 13th Report on Carcinogens. Research Triangle Park, NC: U.S. : Department of Health and Human Services, Public Health
- Bush RA, Kononen L, Machida S, Sieving PA (2000) The effect of calcium channel blocker diltiazem on photoreceptor degeneration in the rhodopsin Pro213His rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:2697-2701.
- Buskamp V, Picaud S, Sahel JA, Roska B (2012) Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene therapy* 19:169-175.
- Cang C, Zhou Y, Navarro B, Seo YJ, Aranda K, Shi L, Battaglia-Hsu S, Nissim I, Clapham DE, Ren D (2013) mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na(+) channels to adapt to metabolic state. *Cell* 152:778-790.
- Carmody RJ, Cotter TG (2000) Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell death and differentiation* 7:282-291.

- Carmody RJ, McGowan AJ, Cotter TG (1999) Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Experimental cell research* 248:520-530.
- Carroll JC, Rosario ER, Villamagna A, Pike CJ (2010) Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTransgenic-Alzheimer's disease mice. *Endocrinology* 151:2713-2722.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *The Journal of comparative neurology* 188:245-262.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL (1978) Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 17:489-498.
- Cascio C, Guarneri R, Russo D, De Leo G, Guarneri M, Piccoli F, Guarneri P (2000) Pregnenolone sulfate, a naturally occurring excitotoxin involved in delayed retinal cell death. *Journal of neurochemistry* 74:2380-2391.
- Cascio C, Guarneri R, Russo D, De Leo G, Guarneri M, Piccoli F, Guarneri P (2002) A caspase-3-dependent pathway is predominantly activated by the excitotoxin pregnenolone sulfate and requires early and late cytochrome c release and cell-specific caspase-2 activation in the retinal cell death. *Journal of neurochemistry* 83:1358-1371.
- Cascio C, Russo D, Drago G, Galizzi G, Passantino R, Guarneri R, Guarneri P (2007) 17beta-estradiol synthesis in the adult male rat retina. *Experimental eye research* 85:166-172.
- Casper DS, Trelstad RL, Reif-Lehrer L (1982) Glutamate-induced cellular injury in isolated chick embryo retina: Muller cell localization of initial effects. *The Journal of comparative neurology* 209:79-90.
- Cekic M, Sayeed I, Stein DG (2009) Combination treatment with progesterone and vitamin D hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. *Frontiers in neuroendocrinology* 30:158-172.
- Celotti F, Melcangi RC, Martini L (1992) The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Frontiers in neuroendocrinology* 13:163-215.
- Cepko C (1993) Lineage versus environment in the embryonic retina. *Trends in neurosciences* 16:96-97; author reply 98.
- Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S, Roman AJ, Olivares MB, Schwartz SB, Komaromy AM, Hauswirth WW, Aguirre GD (2013) Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E517-525.
- Cimarosti H, O'Shea RD, Jones NM, Horn AP, Simao F, Zamin LL, Nassif M, Frozza R, Netto CA, Beart PM, Salbego C (2006) The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal

- cultures exposed to oxygen--glucose deprivation. *Neurochemical research* 31:483-490.
- Cingolani C, Rogers B, Lu L, Kachi S, Shen J, Campochiaro PA (2006) Retinal degeneration from oxidative damage. *Free radical biology & medicine* 40:660-669.
- Circu ML, Aw TY (2012) Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1823:1767-1777.
- Ciriza I, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2004) Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo. *Journal of neuroendocrinology* 16:58-63.
- Codogno P, Meijer AJ (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2:1509-1518.
- Cohen S, Greenberg ME (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 24:183-209.
- Cojocaru IM, Cojocaru M, Musuroi C, Botezat M, Lazar L, Druta A (2004) Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* 42:423-429.
- 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.
- Collin RW, Safieh C, Littink KW, Shalev SA, Garzosi HJ, Rizel L, Abbasi AH, Cremers FP, den Hollander AI, Klevering BJ, Ben-Yosef T (2010) Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics* 86:783-788.
- Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology* 21:1-56.
- Conaway E (2011) Bioidentical hormones: an evidence-based review for primary care providers. *The Journal of the American Osteopathic Association* 111:153-164.
- Coronel MF, Labombarda F, De Nicola AF, Gonzalez SL (2014) Progesterone reduces the expression of spinal cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase and prevents allodynia in a rat model of central neuropathic pain. *European journal of pain* 18:348-359.
- Corrochano S, Barhoum R, Boya P, Arroba AI, Rodriguez-Muela N, Gomez-Vicente V, Bosch F, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ (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.
- Cottet S, Schorderet DF (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.
- Crawley JN, Glowa JR, Majewska MD, Paul SM (1986) Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid. *Brain research* 398:382-385.
- Cronin T, Bennett J (2011) Switching on the lights: the use of optogenetics to advance retinal gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:1190-1192.
- Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, Pinilla I (2014) Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in retinal and eye research* 43:17-75.
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE (1990) Human photoreceptor topography. *The Journal of comparative neurology* 292:497-523.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods* 265:49-72.
- Cutler SM, Vanlandingham JW, Stein DG (2006) Tapered progesterone withdrawal promotes long-term recovery following brain trauma. *Experimental neurology* 200:378-385.
- Chabre M, Deterre P (1989) Molecular mechanism of visual transduction. *European journal of biochemistry / FEBS* 179:255-266.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision research* 42:517-525.
- Chang B, Hawes NL, Pardue MT, German AM, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Rengarajan K, Boyd AP, Sidney SS, Phillips MJ, Stewart RE, Chaudhury R, Nickerson JM, Heckenlively JR, Boatright JH (2007) Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision research* 47:624-633.
- Chang B, Hurd R, Wang J, Nishina P (2013) Survey of common eye diseases in laboratory mouse strains. *Investigative ophthalmology & visual science* 54:4974-4981.
- Chang GQ, 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.
- Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H (1988) Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *The Biochemical journal* 252:649-653.
- Chen G, Shi J, Ding Y, Yin H, Hang C (2007) Progesterone prevents traumatic brain injury-induced intestinal nuclear factor kappa B activation and proinflammatory cytokines expression in male rats. *Mediators of inflammation* 2007:93431.

- Chen G, Shi J, Jin W, Wang L, Xie W, Sun J, Hang C (2008a) Progesterone administration modulates TLRs/NF-kappaB signaling pathway in rat brain after cortical contusion. *Annals of clinical and laboratory science* 38:65-74.
- Chen G, Shi JX, Qi M, Wang HX, Hang CH (2008b) Effects of progesterone on intestinal inflammatory response, mucosa structure alterations, and apoptosis following traumatic brain injury in male rats. *The Journal of surgical research* 147:92-98.
- Chen J, Lei T, Ritz MF, Mendelowitsch A (2001) Effect of 17 beta-estradiol on the brain damage and metabolic changes in rats. *Journal of Tongji Medical University = Tong ji yi ke da xue xue bao* 21:62-64, 74.
- Chen Y, Sawada O, Kohno H, Le YZ, Subauste C, Maeda T, Maeda A (2013) Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *The Journal of biological chemistry* 288:7506-7518.
- Cherradi N, Chambaz EM, Defaye G (1995) Organization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and cytochrome P450<sub>scc</sub> into a catalytically active molecular complex in bovine adrenocortical mitochondria. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 55:507-514.
- Chinnery HR, McLenachan S, Humphries T, Kezic JM, Chen X, Ruitenberg MJ, McMenemy PG (2012) Accumulation of murine subretinal macrophages: effects of age, pigmentation and CX3CR1. *Neurobiology of aging* 33:1769-1776.
- Chinsky ND, Zheng QD, Zacks DN (2014) Control of photoreceptor autophagy after retinal detachment: the switch from survival to death. *Investigative ophthalmology & visual science* 55:688-695.
- Chirico S (1994) High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in enzymology* 233:314-318.
- 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.
- Choi JS, Kim JA, Joo CK (2003) Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. *Investigative ophthalmology & visual science* 44:1747-1752.
- Chrysostomou V, Rezania F, Trounce IA, Crowston JG (2013) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Current opinion in pharmacology* 13:12-15.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS (2007) Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 125:151-158.
- Dalazen GR, Terra M, Jacques CE, Coelho JG, Freitas R, Mazzola PN, Dutra-Filho CS (2014) Pipecolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid. *Metabolic brain disease* 29:175-183.
- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG (2004) Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free radical biology & medicine* 37:1511-1526.

- Danciger M, Blaney J, Gao YQ, Zhao DY, Heckenlively JR, Jacobson SG, Farber DB (1995) Mutations in the PDE6B gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Genomics* 30:1-7.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-219.
- Daniel AR, Gaviglio AL, Czaplicki LM, Hillard CJ, Housa D, Lange CA (2010) The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Molecular endocrinology* 24:2126-2138.
- Darius S, Wolf G, Huang PL, Fishman MC (1995) Localization of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the rat retina: an electron microscopic study. *Brain research* 690:231-235.
- Davis RJ, Tosi J, Janisch KM, Kasanuki JM, Wang NK, Kong J, Tsui I, Cilluffo M, Woodruff ML, Fain GL, Lin CS, Tsang SH (2008) Functional rescue of degenerating photoreceptors in mice homozygous for a hypomorphic cGMP phosphodiesterase 6 b allele (Pde6bH620Q). *Investigative ophthalmology & visual science* 49:5067-5076.
- Davson H (1954) Nutrition of the lens by way of aqueous humour. *The Journal of physiology* 124:42-43P.
- De La Paz MA, Anderson RE (1992) Lipid peroxidation in rod outer segments. Role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. *Investigative ophthalmology & visual science* 33:2091-2096.
- de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in neurosciences* 23:454-458.
- De Nicola AF, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Garay L, Meyer M, Gargiulo G, Guennoun R, Schumacher M (2009) Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Frontiers in neuroendocrinology* 30:173-187.
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:12535-12544.
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1990) Importance and regulation of hepatic glutathione. *Seminars in liver disease* 10:251-266.
- Delyfer MN, Forster V, Neveux N, Picaud S, Leveillard T, Sahel JA (2005) Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Molecular vision* 11:688-696.
- Dell'Orco D, Koch KW (2010) Systems biochemistry approaches to vertebrate phototransduction: towards a molecular understanding of disease. *Biochemical Society transactions* 38:1275-1280.
- den Hollander AI, van Lith-Verhoeven JJ, Arends ML, Strom TM, Cremers FP, Hoyng CB (2007) Novel compound heterozygous TULP1 mutations in a family with severe early-onset retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 125:932-935.

- Deutsch ER, Espinoza TR, Atif F, Woodall E, Kaylor J, Wright DW (2013) Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain research* 1530:82-105.
- Deutsch SI, Mastropalo J, Hitri A (1992) GABA-active steroids: endogenous modulators of GABA-gated chloride ion conductance. *Clinical neuropharmacology* 15:352-364.
- Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG (2005) The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma* 22:106-118.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG (2004) Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123:349-359.
- Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Vaudry D, Luu-The V, Tonon MC, Tsutsui K, Pelletier G, Vaudry H (2012) Regulation of neurosteroid biosynthesis by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in endocrinology* 3:4.
- Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J (2013) Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free radical biology & medicine* 63:207-221.
- Doonan F, Cotter TG (2004) Apoptosis: a potential therapeutic target for retinal degenerations. *Current neurovascular research* 1:41-53.
- Doonan F, Cotter TG (2012) Norgestrel may be a potential therapy for retinal degenerations. *Expert opinion on investigational drugs* 21:579-581.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG (2005) Activation of multiple pathways during photoreceptor apoptosis in the rd mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:3530-3538.
- Doonan F, O'Driscoll C, Kenna P, Cotter TG (2011) Enhancing survival of photoreceptor cells in vivo using the synthetic progestin Norgestrel. *Journal of neurochemistry* 118:915-927.
- Dowling JE (1970) Organization of vertebrate retinas. *Investigative ophthalmology* 9:655-680.
- Dowling JE (1987) *The retina: an approachable part of the brain*: Harvard University Press.
- Drack AV, Dumitrescu AV, Bhattarai S, Gratie D, Stone EM, Mullins R, Sheffield VC (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.
- Drapier JC, Pellat C, Henry Y (1991) Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *The Journal of biological chemistry* 266:10162-10167.
- Dratz EA, Hargrave PA (1983) The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane. *Trends in biochemical sciences* 8:128-131.

- Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, Sandberg MA, Berson EL (1990) Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *The New England journal of medicine* 323:1302-1307.
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research* 62:155-169.
- Duno M, Wibrand F, Baggesen K, Rosenberg T, Kjaer N, Frederiksen AL (2013) A novel mitochondrial mutation m.8989G>C associated with neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa - the NARP syndrome. *Gene* 515:372-375.
- Duvdevani R, Roof RL, Fulop Z, Hoffman SW, Stein DG (1995) Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role? *Journal of neurotrauma* 12:65-75.
- East DA, Campanella M (2013) Ca<sup>2+</sup> in quality control: an unresolved riddle critical to autophagy and mitophagy. *Autophagy* 9:1710-1719.
- Eden J (2003) Progestins and breast cancer. *American journal of obstetrics and gynecology* 188:1123-1131.
- Ehinger B, Zucker CL, Bruun A, Adolph A (1994) In vivo staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia* 10:40-48.
- Eldred WD, Blute TA (2005) Imaging of nitric oxide in the retina. *Vision research* 45:3469-3486.
- Eno CO, Zhao G, Venkatanarayan A, Wang B, Flores ER, Li C (2013) Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 65:26-37.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5368-5375.
- Esterbauer H, Benedetti A, Lang J, Fulceri R, Fauler G, Comporti M (1986) Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta* 876:154-166.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 186:407-421.
- Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF (1982) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *The Biochemical journal* 208:129-140.
- Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation research* 238:223-233.

- Esterbauer H, Lang J, Zadavec S, Slater TF (1984) Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology* 105:319-328.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11:81-128.
- Fabre A, Fournier A, Mesrine S, Desreux J, Gompel A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F (2007) Oral progestagens before menopause and breast cancer risk. *British journal of cancer* 96:841-844.
- Farber DB (1995) From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. The Proctor Lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 36:263-275.
- Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C (1994) The rd mouse story: seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Progress in retinal and eye research* 13:31-64.
- Farber DB, Lolley RN (1974) Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186:449-451.
- Farber DB, Lolley RN (1976) Enzymic basis for cyclic GMP accumulation in degenerative photoreceptor cells of mouse retina. *Journal of cyclic nucleotide research* 2:139-148.
- Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P (2002) On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO journal* 21:857-864.
- Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vogelín E, Kruttgen A (2005) The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *Journal of neuroscience research* 80:18-28.
- Feeser VR, Loria RM (2011) Modulation of traumatic brain injury using progesterone and the role of glial cells on its neuroprotective actions. *Journal of neuroimmunology* 237:4-12.
- Fernandez-Bueno I, Fernandez-Sanchez L, Gayoso MJ, Garcia-Gutierrez MT, Pastor JC, Cuenca N (2012) Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Experimental eye research* 104:26-38.
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *The American journal of physiology* 273:G7-17.
- Fernandez-Sanchez L, Esquiva G, Pinilla I, Martin-Nieto J, Cuenca N (2010) Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PLoS one* 7,.
- Fernandez-Sanchez L, Lax P, Esquiva G, Martin-Nieto J, Pinilla I, Cuenca N (2012a) Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PLoS one* 7:e43074.

- Fernandez-Sanchez L, Lax P, Isiegas C, Ayuso E, Ruiz JM, de la Villa P, Bosch F, de la Rosa EJ, Cuenca N (2012b) Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa. *Human gene therapy* 23:1290-1300.
- 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.
- Ferrarese C, Mennini T, Pecora N, Pierpaoli C, Frigo M, Marzorati C, Gobbi M, Bizzi A, Codegoni A, Garattini S, et al. (1991) Diazepam binding inhibitor (DBI) increases after acute stress in rat. *Neuropharmacology* 30:1445-1452.
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F (2011) Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics* 12:238-249.
- Fingert JH, Oh K, Chung M, Scheetz TE, Andorf JL, Johnson RM, Sheffield VC, Stone EM (2008) Association of a novel mutation in the retinol dehydrogenase 12 (RDH12) gene with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 126:1301-1307.
- Finkbeiner S (2000) CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25:11-14.
- Finkel T (2012) Signal transduction by mitochondrial oxidants. *The Journal of biological chemistry* 287:4434-4440.
- Fischer AJ, Bongini R (2010) Turning Muller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular neurobiology* 42:199-209.
- Fisher RF (1977) The force of contraction of the human ciliary muscle during accommodation. *The Journal of physiology* 270:51-74.
- Fishman GA (1978) Retinitis pigmentosa. Genetic percentages. *Archives of ophthalmology* 96:822-826.
- Fitzgerald ME, Vana BA, Reiner A (1990) Evidence for retinal pathology following interruption of neural regulation of choroidal blood flow: Muller cells express GFAP following lesions of the nucleus of Edinger-Westphal in pigeons. *Current eye research* 9:583-598.
- Fletcher EL, Downie LE, Hatzopoulos K, Vessey KA, Ward MM, Chow CL, Pianta MJ, Vingrys AJ, Kalloniatis M, Wilkinson-Berka JL (2010) The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology* 120:67-86.
- Fletcher EL, Jobling AI, Vessey KA, Luu C, Guymer RH, Baird PN (2011) Animal models of retinal disease. *Progress in molecular biology and translational science* 100:211-286.
- Fliesler SJ, Florman R, Rapp LM, Pittler SJ, Keller RK (1993) In vivo biosynthesis of cholesterol in the rat retina. *FEBS letters* 335:234-238.

- Fliesler SJ, Keller RK (1995) Metabolism of [3H]farnesol to cholesterol and cholesterogenic intermediates in the living rat eye. *Biochemical and biophysical research communications* 210:695-702.
- Forrester JV, Dick AD, McMenamin P, Lee W (2005) *The eye. Basic science in practice*: Saunders.
- Foulds WS (1990) The choroidal circulation and retinal metabolism--an overview. *Eye* 4 ( Pt 2):243-248.
- Fraga CG, Tappel AL (1988) Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *The Biochemical journal* 252:893-896.
- Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, Fausto N (2003) TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:1535-1537.
- Franze K, Francke M, Guenter K, Christ AF, Koerber N, Reichenbach A, Guck J (2011) Spatial mapping of the mechanical properties of the living retina using scanning force microscopy. *Soft matter* 7:3147-3154.
- Frasson M, Picaud S, Leveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sabel J (1999a) 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 JA, Fabre M, Simonutti M, Dreyfus H, Picaud S (1999b) Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature medicine* 5:1183-1187.
- Friberg PA, Larsson DG, Billig H (2009) Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis. *Biology of reproduction* 80:1160-1167.
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology* 23:239-257.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 4:267-274.
- Frye CA (2008) Hormonal influences on seizures: basic neurobiology. *International review of neurobiology* 83:27-77.
- Frye CA, Walf AA (2009) Progesterone reduces depression-like behavior in a murine model of Alzheimer's Disease. *Age* 31:143-153.
- Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Candiotti KA, Morton PD, Liebl DJ, Bethea JR, Brambilla R (2010) Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* 148:509-518.
- Fu Y, Yau KW (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454:805-819.

- Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Ikuno Y, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K (2011) Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:4726-4733.
- Gabriele ML, Ishikawa H, Schuman JS, Bilonick RA, Kim J, Kagemann L, Wollstein G (2010) Reproducibility of spectral-domain optical coherence tomography total retinal thickness measurements in mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:6519-6523.
- Gahm C, Holmin S, Rudehill S, Mathiesen T (2005) Neuronal degeneration and iNOS expression in experimental brain contusion following treatment with colchicine, dexamethasone, tirilazad mesylate and nimodipine. *Acta neurochirurgica* 147:1071-1084; discussion 1084.
- Gallagher S, systems) SEWtt, systems) SAFtt, John GRHttsrsop (2008) Immunoblotting and Immunodetection. In: *Current Protocols in Molecular Biology* vol. 83: John Wiley & Sons, Inc.
- Ganea E, Harding JJ (2006) Glutathione-related enzymes and the eye. *Current eye research* 31:1-11.
- Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Lima A, Roig P, De Nicola AF (2007) Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 107:228-237.
- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2006) Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21 Suppl 3:S3-6.
- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2007) Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22 Suppl 1:S38-42.
- Garcia-Sandoval B (2001) Diagnóstico oftalmológico de la retinosis pigmentaria. In: *La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético* (Estudios, S., ed) Madrid: Organización Nacional de Ciegos Españoles, Dirección de Autonomía Personal y Bienestar Social.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Progress in neurobiology* 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2006) Steroids and glial cell function. *Glia* 54:485-498.
- Garcia SC, Grotto D, Bulcao RP, Moro AM, Roehrs M, Valentini J, de Freitas FA, Paniz C, Bubols GB, Charao MF (2013) Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug and chemical toxicology* 36:306-312.
- 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 DL (1991) Ascorbic acid and the eye. *The American journal of clinical nutrition* 54:1198S-1202S.
- Gaspar JM, Martins A, Cruz R, Rodrigues CM, Ambrosio AF, Santiago AR (2013) Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience* 253:380-388.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 119:493-501.
- Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS (2006) Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of medicine* 38:450-471.
- Gerstner B, Lee J, DeSilva TM, Jensen FE, Volpe JJ, Rosenberg PA (2009) 17beta-estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain. *Journal of neuroscience research* 87:2078-2086.
- Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M (2014) Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue & cell* 46:54-58.
- Gibson CL, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP (2005) Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Experimental neurology* 193:522-530.
- Gibson CL, Gray LJ, Bath PM, Murphy SP (2008) Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain : a journal of neurology* 131:318-328.
- Giera M, Lingeman H, Niessen WM (2012) Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. *Chromatographia* 75:433-440.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2001) Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:959-975.
- Giove TJ, Deshpande MM, Eldred WD (2009) Identification of alternate transcripts of neuronal nitric oxide synthase in the mouse retina. *Journal of neuroscience research* 87:3134-3142.
- Gipp JJ, Bailey HH, Mulcahy RT (1995) Cloning and sequencing of the cDNA for the light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 206:584-589.
- Gipp JJ, Chang C, Mulcahy RT (1992) Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase. *Biochemical and biophysical research communications* 185:29-35.
- Girman SV, Wang S, Lund RD (2003) Cortical visual functions can be preserved by subretinal RPE cell grafting in RCS rats. *Vision research* 43:1817-1827.

- Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* 39:1529-1542.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 19:257-267.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Glickman RD, Lam KW (1992) Oxidation of ascorbic acid as an indicator of photooxidative stress in the eye. *Photochemistry and photobiology* 55:191-196.
- Gloesmann M, Hermann B, Schubert C, Sattmann H, Ahnelt PK, Drexler W (2003) Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science* 44:1696-1703.
- Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK (2010) Aqueous humor dynamics: a review. *The open ophthalmology journal* 4:52-59.
- Goldstein EB (2005) EB. Sensation and perception. Madrid: Thomson Paraninfo.
- Goldstein IM, Ostwald P, Roth S (1996) Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision research* 36:2979-2994.
- Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, Duran Y, Carvalho LS, Chu CJ, Naeem A, Blackford SJ, Georgiadis A, Lakowski J, Hubank M, Smith AJ, Bainbridge JW, Sowden JC, Ali RR (2013) Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nature biotechnology* 31:741-747.
- Gonzalez Deniselle MC, Garay L, Gonzalez S, Saravia F, Labombarda F, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2007) Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons. *Experimental neurology* 203:406-414.
- Gonzalez Deniselle MC, Lopez-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, Gonzalez SL, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2002a) Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiology of disease* 11:457-468.
- Gonzalez Deniselle MC, Lopez Costa JJ, Gonzalez SL, Labombarda F, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2002b) Basis of progesterone protection in spinal cord neurodegeneration. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 83:199-209.
- Gonzalez SL, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2004) Progesterone up-regulates neuronal brain-derived neurotrophic factor expression in the injured spinal cord. *Neuroscience* 125:605-614.
- Gonzalez SL, Lopez-Costa JJ, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2009) Progesterone effects on neuronal ultrastructure and expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in rats with acute spinal cord injury. *Cellular and molecular neurobiology* 29:27-39.

- Goss CW, Hoffman SW, Stein DG (2003) Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 76:231-242.
- Graham CH, Bartlett NR, Brown JL, Hsia Y, Mueller CG, Riggs LA (1965) *Vision and Visual Perception*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- 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.
- Green PS, Simpkins JW (2000) Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 18:347-358.
- Greene EL, Paller MS (1992) Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *The American journal of physiology* 263:F251-255.
- Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nature medicine* 10:704-711.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999) The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 73:209-267, xii.
- Grotto D, Santa-Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Juarez V, Batista J, Farina M (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for Malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 32:169-174.
- Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB (1996) Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:3035-3044.
- Guarneri P, Cascio C, Russo D, D'Agostino S, Drago G, Galizzi G, De Leo G, Piccoli F, Guarneri M, Guarneri R (2003) Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007:117-128.
- Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V (1994) Neurosteroidogenesis in rat retinas. *Journal of neurochemistry* 63:86-96.
- Guarneri P, Russo D, Cascio C, De Leo G, Piccoli F, Guarneri R (1998) Induction of neurosteroid synthesis by NMDA receptors in isolated rat retina: a potential early event in excitotoxicity. *The European journal of neuroscience* 10:1752-1763.
- Gunn BG, Brown AR, Lambert JJ, Belelli D (2011) Neurosteroids and GABA(A) Receptor Interactions: A Focus on Stress. *Frontiers in neuroscience* 5:131.
- Guo L, Ma Q, Chen Y, Zeng L (1994) [Studies on MDA and MDA/MDAa in patients with retinitis pigmentosa]. *Yan ke xue bao = Eye science / "Yan ke xue bao" bian ji bu* 10:224-226, 196.

- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 76:463-471.
- Guyton, Hall (2011) *Tratado de fisiología médica*. España: S.A. Elsevier
- Hackam AS, Strom R, Liu D, Qian J, Wang C, Otteson D, Gunatilaka T, Farkas RH, Chowers I, Kageyama M, Leveillard T, Sahel JA, Campochiaro PA, Parmigiani G, Zack DJ (2004) Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 45:2929-2942.
- Hakala K, Auriola S, Koivisto A, Lonnberg H (1999) Mass spectrometric (HPLC/ESI-MS/MS) quantification of pyrimido[1,3-a]purin-10(3H)-one, a guanine adduct formed by reaction of malondialdehyde with DNA. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 21:1053-1061.
- Hall AG (1999) Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *European journal of clinical investigation* 29:238-245.
- Halliwell B (2000) Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. In: Packer, L, Rosen, P, Tritschler, HJ, King, GL, Azzi, A *Antioxidants in Diabetes management*, pp 33-52 New York: Marcel Dekker.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics* 246:501-514.
- Hamel C (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet journal of rare diseases* 1:40.
- Han J, Dinculescu A, Dai X, Du W, Smith WC, Pang J (2013) Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. *Molecular vision* 19:2579-2589.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889.
- Hargrave PA (2001) Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 42:3-9.
- Hargrave PA, McDowell JH, Feldmann RJ, Atkinson PH, Rao JK, Argos P (1984) Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision research* 24:1487-1499.
- Harris H, Rubinsztein DC (2012) Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology* 8:108-117.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795-1809.
- Haverkamp S, Eldred WD (1998) Localization of nNOS in photoreceptor, bipolar and horizontal cells in turtle and rat retinas. *Neuroreport* 9:2231-2235.

- Hayashi T, Ishikawa T, Yamada K, Kuzuya M, Naito M, Hidaka H, Iguchi A (1994) Biphasic effect of estrogen on neuronal constitutive nitric oxide synthase via Ca(2+)-calmodulin dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 203:1013-1019.
- He J, Hoffman SW, Stein DG (2004) Allopregnanolone, a progesterone metabolite, enhances behavioral recovery and decreases neuronal loss after traumatic brain injury. *Restorative neurology and neuroscience* 22:19-31.
- He W, Cowan CW, Wensel TG (1998) RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 20:95-102.
- He Y, Zhang Y, Liu X, Ghazaryan E, Li Y, Xie J, Su G (2014) Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *International journal of molecular sciences* 15:14456-14474.
- Heckenlively JR (1988) *Retinitis pigmentosa*. Philadelphia: Lippincott ed.
- Herr I, Buchler MW (2010) Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer treatment reviews* 36:377-383.
- Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, Ryu M, Taguchi K, Yamamoto M, Nakazawa T (2013) Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Journal of neurochemistry* 127:669-680.
- Hoang QV, Linsenmeier RA, Chung CK, Curcio CA (2002) Photoreceptor inner segments in monkey and human retina: mitochondrial density, optics, and regional variation. *Visual neuroscience* 19:395-407.
- Hoang YD, Nakamura BN, Luderer U (2009) Follicle-stimulating hormone and estradiol interact to stimulate glutathione synthesis in rat ovarian follicles and granulosa cells. *Biology of reproduction* 81:636-646.
- Hodgkin AL, McNaughton PA, Nunn BJ (1987) Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. *The Journal of physiology* 391:347-370.
- Hogg N (2002) The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42:585-600.
- Hollander H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL, 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.
- Hollyfield JG (1968) Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. *Developmental biology* 18:163-179.
- Hu G, Wensel TG (2002) R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:9755-9760.
- Huang CS, Anderson ME, Meister A (1993a) Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 268:20578-20583.

- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A (1993b) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 268:19675-19680.
- Huang CS, Moore WR, Meister A (1988) On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2464-2468.
- Hughbanks-Wheaton DK, Birch DG, Fish GE, Spencer R, Pearson NS, Takacs A, Hoffman DR (2014) Safety assessment of docosahexaenoic acid in X-linked retinitis pigmentosa: the 4-year DHAX trial. *Investigative ophthalmology & visual science* 55:4958-4966.
- Hutter DE, Till BG, Greene JJ (1997) Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Experimental cell research* 232:435-438.
- Hytti M, Piippo N, Salminen A, Honkakoski P, Kaarniranta K, Kauppinen A (2015) Quercetin alleviates 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity and inflammation in ARPE-19 cells. *Experimental eye research* 132:208-215.
- Iloki A, S. B., Lewis Luján M, Fernández Angulo D, Gil-Salido AA, Lara Espinoza CL, Rubio-Pino JL (2015) Retino-protective effect of Bucida buceras against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human retinal pigment epithelial cells line. *BMC complementary and alternative medicine* 15.
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells* 22:1338-1345.
- Inoue T, Koyama T, Muraki A, Yamashita I (1993) Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 17:161-170.
- Isenoumi K, Kumai T, Kitaoka Y, Motoki M, Kitaoka Y, Kuribayashi K, Munemasa Y, Kogo J, Kobayashi S, Ueno S (2004) N-methyl-D-aspartate induces phosphorylation of cAMP response element (CRE)-binding protein and increases DNA-binding activity of CRE in rat retina. *Journal of pharmacological sciences* 95:108-114.
- Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y (2014) Neurosteroids are endogenous neuroprotectants in an ex vivo glaucoma model. *Investigative ophthalmology & visual science* 55:8531-8541.
- Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG (2012) Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience* 210:442-450.
- Izumi Y, Svrakic N, O'Dell K, Zorumski CF (2013) Ammonia inhibits long-term potentiation via neurosteroid synthesis in hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience* 233:166-173.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger

- KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW (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.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:8936-8946.
- Jia Z, Song Z, Zhao Y, Wang X, Liu P (2011) Grape seed proanthocyanidin extract protects human lens epithelial cells from oxidative stress via reducing NF-small ka, CyrillicB and MAPK protein expression. *Molecular vision* 17:210-217.
- Jiang C, Wang J, Li X, Liu C, Chen N, Hao Y (2009) Progesterone exerts neuroprotective effects by inhibiting inflammatory response after stroke. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 58:619-624.
- Jodhka PK, Kaur P, Underwood W, Lydon JP, Singh M (2009) The differences in neuroprotective efficacy of progesterone and medroxyprogesterone acetate correlate with their effects on brain-derived neurotrophic factor expression. *Endocrinology* 150:3162-3168.
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004) What turns CREB on? *Cellular signalling* 16:1211-1227.
- Johnsen-Soriano S, Genoves JM, Romero B, Garcia-Delpech S, Muriach M, Sancho-Tello M, Bosch-Morell F, Romero FJ (2007) [Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 82:757-762.
- Johnson NF (1976) Electronmicroscopy of acute retinal ischaemia in the rabbit and a study of the pattern of recovery. In: *Vision and Circulation* (Cant, J., ed), pp 79-92 St Louis: The C V Mosby Co.
- Jomary C, Vincent KA, Grist J, Neal MJ, Jones SE (1997) Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene therapy* 4:683-690.
- Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc RE (2012) Retinal remodeling. *Japanese journal of ophthalmology* 56:289-306.
- Junpeng M, Huang S, Qin S (2011) Progesterone for acute traumatic brain injury. *The Cochrane database of systematic reviews* CD008409.
- Kaczara P, Sarna T, Burke JM (2010) Dynamics of H2O2 availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 48:1064-1070.
- Kaempf S, Walter P, Salz AK, Thumann G (2008) Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium. *Journal of neuroscience methods* 173:47-58.

- 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, Tomisich G (1999) Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research* 18:811-866.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical reviews in food science and nutrition* 25:317-364.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M (1985) The regulation of hepatic glutathione. *Annual review of pharmacology and toxicology* 25:715-744.
- Karl MO, Reh TA (2010) Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in molecular medicine* 16:193-202.
- Karli P (1952-1953) [Retinae without visual cells; morphological, physiological and physiopathological research in rodents]. 35:1-76.
- Karpe G (1945) The basis of clinical electroretinography. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 23 suppl:84-85.
- Kas J, Blattna J (1986) Phospholipids in foodstuffs. *Acta Universitatis Carolinae Medica* 32:81-92.
- Kaur P, Jodhka PK, Underwood WA, Bowles CA, de Fiebre NC, de Fiebre CM, Singh M (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.
- Keats BJ, Savas S (2004) Genetic heterogeneity in Usher syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 130A:13-16.
- Keeler CE (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.
- Kelley MH, Taguchi N, Ardeshiri A, Kuroiwa M, Hurn PD, Traystman RJ, Herson PS (2008) Ischemic insult to cerebellar Purkinje cells causes diminished GABAA receptor function and allopregnanolone neuroprotection is associated with GABAA receptor stabilization. *Journal of neurochemistry* 107:668-678.
- Kennedy MJ, Lee KA, Niemi GA, Craven KB, Garwin GG, Saari JC, Hurley JB (2001) Multiple phosphorylation of rhodopsin and the in vivo chemistry underlying rod photoreceptor dark adaptation. *Neuron* 31:87-101.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26:239-257.
- Kim HN, Lee SJ, Koh JY (2012) The neurosteroids, allopregnanolone and progesterone, induce autophagy in cultured astrocytes. *Neurochemistry international* 60:125-133.
- Kim HS, Park CK (2005) Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain research* 1057:17-28.

- Kim IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH (1998) Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Experimental brain research* 121:419-424.
- Kim WT, Suh ES (2010) Retinal protective effects of resveratrol via modulation of nitric oxide synthase on oxygen-induced retinopathy. *Korean journal of ophthalmology* : KJO 24:108-118.
- Kim YN, Jung HY, Eum WS, Kim DW, Shin MJ, Ahn EH, Kim SJ, Lee CH, Yong JI, Ryu EJ, Park J, Choi JH, Hwang IK, Choi SY (2014) Neuroprotective effects of PEP-1-carbonyl reductase 1 against oxidative-stress-induced ischemic neuronal cell damage. *Free radical biology & medicine* 69:181-196.
- Kipp M, Beyer C (2009) Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Frontiers in neuroendocrinology* 30:188-200.
- Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ (2000) Biphasic elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Developmental biology* 222:326-335.
- Kitzman JO, Snyder MW, Ventura M, Lewis AP, Qiu R, Simmons LE, Gammill HS, Rubens CE, Santillan DA, Murray JC, Tabor HK, Bamshad MJ, Eichler EE, Shendure J (2012) Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Science translational medicine* 4:137ra176.
- Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, Kirov I, Shatos M, Coffey P, Young MJ (2004) Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Investigative ophthalmology & visual science* 45:4167-4173.
- Klauke S, Goertz M, Rein S, Hoehl D, Thomas U, Eckhorn R, Bremmer F, Wachtler T (2011) Stimulation with a wireless intraocular epiretinal implant elicits visual percepts in blind humans. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:449-455.
- Klein R, Klein BE, Jensen SC, Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Palta M (1999) Age-related maculopathy in a multiracial United States population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Ophthalmology* 106:1056-1065.
- Klein R, Rowland ML, Harris MI (1995) Racial/ethnic differences in age-related maculopathy. Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Ophthalmology* 102:371-381.
- Ko ML, Peng PH, Ma MC, Ritch R, Chen CF (2005) Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free radical biology & medicine* 39:365-373.
- Kolb H (2001) *Concepts and Challenges in Retinal Biology*. Amsterdam: Elsevier.
- Komeima K, Rogers BS, Campochiaro PA (2007) Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Journal of cellular physiology* 213:809-815.

- Komeima K, Rogers BS, Lu L, Campochiaro PA (2006) Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11300-11305.
- Kono M, Goletz PW, Crouch RK (2008) 11-cis- and all-transretinols can activate rod opsin: rational design of the visual cycle. *Biochemistry Biokhimiia* 47:7567-7571.
- Kovacs P, Juranek I, Stankovicova T, Svec P (1996) Lipid peroxidation during acute stress. *Die Pharmazie* 51:51-53.
- Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP (1997) Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5089-5100.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in neurosciences* 23:291-297.
- Kuffler SW (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of neurophysiology* 16:37-68.
- Kuffler SW (1973) The single-cell approach in the visual system and the study of receptive fields. *Investigative ophthalmology* 12:794-813.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhashi T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432:1032-1036.
- Kunchithapautham K, Rohrer B (2007) Autophagy is one of the multiple mechanisms active in photoreceptor degeneration. *Autophagy* 3:65-66.
- Kunwar A, Priyadarsini KI (2011) Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences* 1:53-60.
- Kusnyerik A, Greppmaier U, Wilke R, Gekeler F, Wilhelm B, Sachs HG, Bartz-Schmidt KU, Klose U, Stingl K, Resch MD, Hekmat A, Bruckmann A, Karacs K, Nemeth J, Suveges I, Zrenner E (2012) Positioning of electronic subretinal implants in blind retinitis pigmentosa patients through multimodal assessment of retinal structures. *Investigative ophthalmology & visual science* 53:3748-3755.
- Labombarda F, Gonzalez SL, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF (2009) Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* 57:884-897.
- Lamb TD (2013) Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Progress in retinal and eye research* 36:52-119.
- Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA (2006) Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12769-12774.
- Lange CA (2008) Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 108:203-212.

- Lanthier A, Patwardhan VV (1988) In vitro steroid metabolism by rat retina. *Brain research* 463:403-406.
- LaVail MM (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194.
- LaVail MM, Mullen RJ (1976) Role of the pigment epithelium in inherited retinal degeneration analyzed with experimental mouse chimeras. *Experimental eye research* 23:227-245.
- LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11249-11253.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Investigative ophthalmology & visual science* 39:592-602.
- Le Goascogne C, Robel P, Guezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* 237:1212-1215.
- Lederman M, Hagbi-Levi S, Grunin M, Obolensky A, Berenshtein E, Banin E, Chevion M, Chowers I (2014) Degeneration modulates retinal response to transient exogenous oxidative injury. *PLoS one* 9:e87751.
- Lee B, Cao R, Choi YS, Cho HY, Rhee AD, Hah CK, Hoyt KR, Obrietan K (2009a) The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death. *Journal of neurochemistry* 108:1251-1265.
- Lee JE, Oh HA, Song H, Jun JH, Roh CR, Xie H, Dey SK, Lim HJ (2011a) Autophagy regulates embryonic survival during delayed implantation. *Endocrinology* 152:2067-2075.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158.
- Lee JK, Choi SS, Lee HK, Han KJ, Han EJ, Suh HW (2002) Effects of MK-801 and CNQX on various neurotoxic responses induced by kainic acid in mice. *Molecules and cells* 14:339-347.
- Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37:139-143.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675.
- Lee SJ, Cho KS, Koh JY (2009b) Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57:1351-1361.

- Lee SY, Usui S, Zafar AB, Oveson BC, Jo YJ, Lu L, Masoudi S, Campochiaro PA (2011b) N-Acetylcysteine promotes long-term survival of cones in a model of retinitis pigmentosa. *Journal of cellular physiology* 226:1843-1849.
- Lei B, Mace B, Dawson HN, Warner DS, Laskowitz DT, James ML (2014) Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *PloS one* 9:e103969.
- Lemasters JJ (2005) Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 129:351-360.
- Lenzi L, Coassin M, Lambiase A, Bonini S, Amendola T, Aloe L (2005) Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. *Vision research* 45:1491-1500.
- Leveillard T, Fridlich R, Clerin E, Ait-Ali N, Millet-Puel G, Jaillard C, Yang Y, Zack D, van-Dorselaer A, Sahel JA (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 GP, Fisher SK (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 G, Chen Y, Hu H, Liu L, Hu X, Wang J, Shi W, Yin D (2012) Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde. *Rejuvenation research* 15:257-264.
- Li J, Daly E, Campioli E, Wabitsch M, Papadopoulos V (2014) De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 289:747-764.
- Li T, Sandberg MA, Pawlyk BS, Rosner B, Hayes KC, Dryja TP, Berson EL (1998) Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11933-11938.
- Li Z, Dong X, Liu H, Chen X, Shi H, Fan Y, Hou D, Zhang X (2013) Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Molecular vision* 19:1656-1666.
- Li ZY, Kljavin IJ, Milam AH (1995) Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:5429-5438.
- Li ZY, Milam AH (1995) Apoptosis in retinitis pigmentosa. In: *Degenerative Diseases of the retina*, pp 1-8 New York, NY: Plenum Press.
- Liang FQ, Godley BF (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.
- Light JG, Fransen JW, Adekunle AN, Adkins A, Pangen G, Loudin J, Mathieson K, Palanker DV, McCall MA, Pardue MT (2014) Inner retinal preservation in rat

- models of retinal degeneration implanted with subretinal photovoltaic arrays. *Experimental eye research* 128:34-42.
- Lima FB, Ota FH, Cabral FJ, Del Bianco Borges B, Franci CR (2014) Estrogen, but not progesterone, induces the activity of nitric oxide synthase within the medial preoptic area in female rats. *Brain research* 1578:23-29.
- Linsenmeier RA (1986) Effects of light and darkness on oxygen distribution and consumption in the cat retina. *The Journal of general physiology* 88:521-542.
- Lipinski DM, Singh MS, MacLaren RE (2011) Assessment of cone survival in response to CNTF, GDNF, and VEGF165b in a novel ex vivo model of end-stage retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:7340-7346.
- Liu J, Mori A (1999) Stress, aging, and brain oxidative damage. *Neurochemical research* 24:1479-1497.
- Liu J, Wang X, Mori A (1994) Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *The International journal of biochemistry* 26:511-517.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN (1996) Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10:1532-1538.
- Liu L, Lao W, Ji QS, Yang ZH, Yu GC, Zhong JX (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 MH, Herson PS, Hurn PD (2010) Neuroprotection of sex steroids. *Minerva endocrinologica* 35:127-143.
- Locke JC, Morton WR (1965) Further studies of the viscosity of aspirated human vitreous fluid: with special reference to its use in retinal detachment surgery. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 63:129-145.
- Loewen CJ, Moritz OL, Molday RS (2001) Molecular characterization of peripherin-2 and rom-1 mutants responsible for digenic retinitis pigmentosa. *The Journal of biological chemistry* 276:22388-22396.
- Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG (1977) Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: simulation of an inherited disease. *Science* 196:664-666.
- Lou MF (2003) Redox regulation in the lens. *Progress in retinal and eye research* 22:657-682.
- Louzada-Junior P, Dias JJ, Santos WF, Lachat JJ, Bradford HF, Coutinho-Netto J (1992) Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. *Journal of neurochemistry* 59:358-363.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275.

- Lowy I, Weisz G (2005) French hormones: progestins and therapeutic variation in France. *Social science & medicine* 60:2609-2622.
- Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Xie B, Campochiaro PA (2009) Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling* 11:715-724.
- Lu N, Li C, Cheng Y, Du AL (2008a) [Protective effects of progesterone against high intraocular pressure-induced retinal ischemia-reperfusion in rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 28:2026-2029.
- Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:1169-1183.
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30:42-59.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008b) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of learning and memory* 89:312-323.
- Lu YB, Franze K, Seifert G, Steinhauser C, Kirchhoff F, Wolburg H, Guck J, Janmey P, Wei EQ, Kas J, Reichenbach A (2006) Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:17759-17764.
- Luczaj W, Skrzydlewska E (2003) DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular & molecular biology letters* 8:391-413.
- Luna G, Lewis GP, Banna CD, Skalli O, Fisher SK (2010) Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Muller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Molecular vision* 16:2511-2523.
- MacDonald IM, Sauve Y, Sieving PA (2007) Preventing blindness in retinal disease: ciliary neurotrophic factor intraocular implants. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie* 42:399-402.
- MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR (2006) Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444:203-207.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15:323-350.
- Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bencicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J (2009) Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374:1597-1605.
- Makino ER, Handy JW, Li T, Arshavsky VY (1999) The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G

- protein beta subunit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:1947-1952.
- Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Montas S, Coutifaris C (2000) Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in vitro. Annals of the New York Academy of Sciences 900:16-25.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schutz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nature genetics 31:47-54.
- Marigo V (2007) Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. Cell cycle 6:652-655.
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation research 424:83-95.
- Martinez-Fernandez de la Camara C, Hernandez-Pinto AM, Olivares-Gonzalez L, Cuevas-Martin C, Sanchez-Arago M, Hervas D, Salom D, Cuezva JM, de la Rosa EJ, Millan JM, Rodrigo R (2015) Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration. Scientific reports 5:11764.
- Martinez-Fernandez de la Camara C, Olivares-Gonzalez L, Hervas D, Salom D, Millan JM, Rodrigo R (2014) Infliximab reduces Zaprinst-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina. Journal of neuroinflammation 11:172.
- Martinez-Fernandez de la Camara C, Sequedo MD, Gomez-Pinedo U, Jaijo T, Aller E, Garcia-Tarraga P, Garcia-Verdugo JM, Millan JM, Rodrigo R (2013) Phosphodiesterase inhibition induces retinal degeneration, oxidative stress and inflammation in cone-enriched cultures of porcine retina. Experimental eye research 111:122-133.
- Martini M, Pradotto M, Panzica G (2011) Synergic effects of estradiol and progesterone on regulation of the hypothalamic neuronal nitric oxide synthase expression in ovariectomized mice. Brain research 1404:1-9.
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nature reviews Molecular cell biology 1:120-129.
- May CA, 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.
- McCullough LD, Hurn PD (2003) Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 14:228-235.
- McEwen BS (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. Neurobiology of aging 23:921-939.
- McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP (1995) Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:3249-3253.

- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 4:130-134.
- McHugh KJ, Saint-Geniez M, Tao SL (2013) Topographical control of ocular cell types for tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 101:1571-1584.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52:711-760.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain research Brain research reviews* 37:3-12.
- Mellon SH, Vaudry H (2001) Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *International review of neurobiology* 46:33-78.
- Menci S (2012) Mechanisms of cone photoreceptor cell death in models for inherited retinal degeneration. In: *Mathematics and Natural Science Faculty*, p 104 Tübingen: Universität Tübingen.
- Merendino RA, Salvo F, Saija A, Di Pasquale G, Tomaino A, Minciullo PL, Fraccica G, Gangemi S (2003) Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? *Mediators of inflammation* 12:127-128.
- Mervin K, Stone J (2002) Developmental death of photoreceptors in the C57BL/6J mouse: association with retinal function and self-protection. *Experimental eye research* 75:703-713.
- Metrailler S, Schorderet DF, Cottet S (2012) Early apoptosis of rod photoreceptors in Rpe65(-/-) mice is associated with the upregulated expression of lysosomal-mediated autophagic genes. *Experimental eye research* 96:70-81.
- Miller WL, Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews* 32:81-151.
- Miranda M, Arnal E, Ahuja S, Alvarez-Nolting R, Lopez-Pedrajas R, Ekstrom P, Bosch-Morell F, van Veen T, Romero FJ (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* : JMI 59:1-11.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science* 16:300-309.
- Mohamed IN, Soliman SA, Alhusban A, Matragoon S, Pillai BA, Elmarkaby AA, El-Remessy AB (2012) Diabetes exacerbates retinal oxidative stress, inflammation, and microvascular degeneration in spontaneously hypertensive rats. *Molecular vision* 18:1457-1466.

- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine* 329:2002-2012.
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends in neurosciences* 13:184-188.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH (1986) Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:6682-6686.
- Moore K, Roberts LJ, 2nd (1998) Measurement of lipid peroxidation. *Free radical research* 28:659-671.
- Moore KLDA, Agur AMR (2007) *Anatomía con orientación clínica*: Panamericana, E. M.
- Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ (2005) Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Experimental gerontology* 40:295-302.
- Mor G, Nilsen J, Horvath T, Bechmann I, Brown S, Garcia-Segura LM, Naftolin F (1999) Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain. *Journal of neurobiology* 40:484-496.
- Motyl T, Gajewska M, Zarzynska J, Sobolewska A, Gajkowska B (2007) Regulation of autophagy in bovine mammary epithelial cells. *Autophagy* 3:484-486.
- Mullen RJ, LaVail MM (1976) Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* 192:799-801.
- Muller A, Villain M, Bonne C (1997) The release of amino acids from ischemic retina. *Experimental eye research* 64:291-293.
- Muller E, Kerschbaum HH (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.
- Müller H (1856) *Anatomisch-physiologische Untersuchungen Über die Retina des Menschen und der Wirbelthiere*.
- Mullins RF, Kuehn MH, Radu RA, Enriquez GS, East JS, Schindler EI, Travis GH, Stone EM (2012) Autosomal recessive retinitis pigmentosa due to ABCA4 mutations: clinical, pathologic, and molecular characterization. *Investigative ophthalmology & visual science* 53:1883-1894.
- Munaut C, Lambert V, Noel A, Frankenne F, Deprez M, Foidart JM, Rakic JM (2001) Presence of oestrogen receptor type beta in human retina. *The British journal of ophthalmology* 85:877-882.
- Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, Nakazawa T, Ishibashi T, Miller JW, Vavvas DG (2013) Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Progress in retinal and eye research* 37:114-140.

- Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Duckles SP (2000) Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31:1173-1178.
- Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL (1991) Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Molecular and cellular biology* 11:5032-5043.
- Nag TC, Wadhwa S (2012) Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states. *Micron* 43:759-781.
- Nakamura Y, Feng Q, Kumagai T, Torikai K, Ohigashi H, Osawa T, Noguchi N, Niki E, Uchida K (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.
- Nakatani K, Yau KW (1988) Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *The Journal of physiology* 395:695-729.
- Nakazawa M, Ohguro H, Takeuchi K, Miyagawa Y, Ito T, Metoki T (2011) Effect of nilvadipine on central visual field in retinitis pigmentosa: a 30-month clinical trial. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde* 225:120-126.
- Nakazawa T, Takahashi H, Shimura M (2006) Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain research* 1093:141-149.
- Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J (1994) Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *Journal of neurochemistry* 62:1025-1033.
- Nelson R, Connaughton V (1995) Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina. In: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (Kolb, H. et al., eds) Salt Lake City (UT).
- Newsome DA, Michels RG (1988) Detection of lymphocytes in the vitreous gel of patients with retinitis pigmentosa. *American journal of ophthalmology* 105:596-602.
- Nguyen CT, Vingrys AJ, Bui BV (2008) Dietary omega-3 fatty acids and ganglion cell function. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3586-3594.
- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of biological chemistry* 278:31426-31433.

- Nilsen J, Brinton RD (2002) Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 143:205-212.
- Nilsen J, Brinton RD (2003) Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10506-10511.
- Nilsen J, Diaz Brinton R (2003) Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2842-2847.
- Nir I, Haque R, Iuvone PM (2001) Regulation of cAMP by light and dopamine receptors is dysfunctional in photoreceptors of dystrophic retinal degeneration slow(rds) mice. *Experimental eye research* 73:265-272.
- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* 19:983-997.
- Njie-Mbye YF, Kulkarni-Chitnis M, Opere CA, Barrett A, Ohia SE (2013) Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Frontiers in physiology* 4:366.
- Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, Yamashiro K, Miyamoto K, Nishiwaki H, Mandai M, Honda Y, Ogura Y (2000) Administration of 17beta-estradiol attenuates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:2689-2696.
- Norman JM, Cohen GM, Bampton ET (2010) The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy* 6:1042-1056.
- O'Day WT, Young RW (1978) Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish. *The Journal of cell biology* 76:593-604.
- O'Kane RL, Martinez-Lopez I, DeJoseph MR, Vina JR, Hawkins RA (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *The Journal of biological chemistry* 274:31891-31895.
- O'Steen WK (1977) Ovarian steroid effects on light-induced retinal photoreceptor damage. *Experimental eye research* 25:361-369.
- Oboh G, Olasehinde TA, Ademosun AO (2014) Essential oil from lemon peels inhibit key enzymes linked to neurodegenerative conditions and pro-oxidant induced lipid peroxidation. *Journal of oleo science* 63:373-381.
- Ogando D, Farina M, Ribeiro ML, Perez Martinez S, Cella M, Rettori V, Franchi A (2003) Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. *Reproduction, fertility, and development* 15:269-274.
- Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB (1999) Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Investigative ophthalmology & visual science* 40:1906-1911.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95:351-358.
- Ohnaka M, Miki K, Gong YY, Stevens R, Iwase T, Hackett SF, Campochiaro PA (2012) Long-term expression of glial cell line-derived neurotrophic factor slows, but does not stop retinal degeneration in a model of retinitis pigmentosa. *Journal of neurochemistry* 122:1047-1053.
- Oja SS, Janaky R, Varga V, Saransaari P (2000) Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemistry international* 37:299-306.
- Okoye G, Zimmer J, Sung J, Gehlbach P, Deering T, Nambu H, Hackett S, Melia M, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA (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 : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:4164-4172.
- Ola MS, Hosoya K, LaNoue KF (2011) Regulation of glutamate metabolism by hydrocortisone and branched chain keto acids in cultured rat retinal Muller cells (TR-MUL). *Neurochemistry international* 59:656-663.
- Olive DL, Pritts EA (2001) Treatment of endometriosis. *The New England journal of medicine* 345:266-275.
- Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC (2000) Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *Journal of neurochemistry* 74:785-791.
- Ong JM, da Cruz L (2012) A review and update on the current status of stem cell therapy and the retina. *British medical bulletin* 102:133-146.
- Ono SJ (2003) Immunity in the eye: lessons in organ-specific responses. *Journal of leukocyte biology* 74:149-150.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience* 14:453-501.
- Oppenheimer L, Wellner VP, Griffith OW, Meister A (1979) Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *The Journal of biological chemistry* 254:5184-5190.
- Orizaba-Chávez B, Alba-Jasso GA, Ocharán-Hernández ME (2013) Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Mex* 80:59-66.
- Orr HT, Cohen AI, Carter JA (1976) The levels of free taurine, glutamate, glycine and gamma-amino butyric acid during the postnatal development of the normal and dystrophic retina of the mouse. *Experimental eye research* 23:377-384.
- Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, Heckenlively J, Friedlander M (2004) Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *The Journal of clinical investigation* 114:765-774.
- Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, Lee SY, Usui S, Sedlak TW, Snyder SH, Campochiaro PA, Sung JU (2011) Constituents of bile, bilirubin and TUDCA,

- protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *Journal of neurochemistry* 116:144-153.
- Ozacmak VH, Sayan H (2009) The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 58:909-912.
- Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A (2000) *Antioxidants in Diabetes Management*. New York.: Marcel Dekker.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ, Wessel K, Ulrich H (1995) Antioxidant properties and clinical implications of alpha-lipoic acid. In: *Biothols in health and disease* (Dekker, ed), pp 479-484 New York.
- Pajovic S, Saicic ZS, Spasic MB, Petrovic VM, Martinovic JV (1996) Effect of progesterone and estradiol benzoate on superoxide dismutase activity in the brain of male rats. *Experientia* 52:221-224.
- Pajovic SB, Saicic ZS, Spasic MB, Petrovic VM, Martinovic JV (1999) Effects of progesterone and estradiol benzoate on glutathione dependent antioxidant enzyme activities in the brain of female rats. *General physiology and biophysics* 18:35-44.
- Palczewski K, Sokal I, Baehr W (2004) Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochemical and biophysical research communications* 322:1123-1130.
- Pan DS, Liu WG, Yang XF, Cao F (2007) Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. *Biomedical and environmental sciences : BES* 20:432-438.
- Panfoli I, Calzia D, Ravera S, Morelli AM, Traverso CE (2012) Extra-mitochondrial aerobic metabolism in retinal rod outer segments: new perspectives in retinopathies. *Medical hypotheses* 78:423-427.
- Pang JJ, Boye SL, Kumar A, Dinculescu A, Deng W, Li J, Li Q, Rani A, Foster TC, Chang B, Hawes NL, Boatright JH, Hauswirth WW (2008a) AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:4278-4283.
- Pang JJ, Dai X, Boye SE, Barone I, Boye SL, Mao S, Everhart D, Dinculescu A, Liu L, Umino Y, Lei B, Chang B, Barlow R, Strettoi E, Hauswirth WW (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 JJ, Gao F, Wu SM (2010) Light responses and morphology of bNOS-immunoreactive neurons in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology* 518:2456-2474.
- Pang JJ, Lauramore A, Deng WT, Li Q, Doyle TJ, Chiodo V, Li J, Hauswirth WW (2008b) Comparative analysis of in vivo and in vitro AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration. *Vision research* 48:377-385.

- Paquet-Durand F, Azadi S, Hauck SM, 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, Johnson L, Ekstrom P (2007) Calpain activity in retinal degeneration. *Journal of neuroscience research* 85:693-702.
- Park WS, Jung WK, Lee DY, Moon C, Yea SS, Park SG, Seo SK, Park C, Choi YH, Kim GY, Choi JS, Choi IW (2010) Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF-kappaB inactivation: not involved in cAMP mechanisms. *International immunopharmacology* 10:1077-1085.
- Parmeggiani F, Sato G, De Nadai K, Romano MR, Binotto A, Costagliola C (2011) Clinical and Rehabilitative Management of Retinitis Pigmentosa: Up-to-Date. *Current genomics* 12:250-259.
- Pasqualini JR, Paris J, Sitruk-Ware R, Chetrite G, Botella J (1998) Progestins and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 65:225-235.
- Paul SM, Purdy RH (1992) Neuroactive steroids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6:2311-2322.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 23:75-93.
- Pawlyk BS, Li T, Scimeca MS, Sandberg MA, Berson EL (2002) Absence of photoreceptor rescue with D-cis-diltiazem in the rd mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:1912-1915.
- Pearce-Kelling SE, Aleman TS, Nickle A, Laties AM, Aguirre GD, Jacobson SG, Acland GM (2001) Calcium channel blocker D-cis-diltiazem does not slow retinal degeneration in the PDE6B mutant rcd1 canine model of retinitis pigmentosa. *Molecular vision* 7:42-47.
- Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, Duran Y, Smith AJ, Chuang JZ, Azam SA, Luhmann UF, Benucci A, Sung CH, Bainbridge JW, Carandini M, Yau KW, Sowden JC, Ali RR (2012) Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 485:99-103.
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews* 94:1077-1098.
- Peluso JJ, Liu X, Gawkowska A, Johnston-MacAnanny E (2009) Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:2644-2649.
- Peng B, Xiao J, Wang K, So KF, Tipoe GL, 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.

- Pennesi ME, Michaels KV, Magee SS, Maricle A, Davin SP, Garg AK, Gale MJ, Tu DC, Wen Y, Erker LR, Francis PJ (2012) Long-term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 mice using spectral domain optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science* 53:4644-4656.
- Pennesi ME, Nishikawa S, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM (2008) The relationship of photoreceptor degeneration to retinal vascular development and loss in mutant rhodopsin transgenic and RCS rats. *Experimental eye research* 87:561-570.
- Penniston KL, Tanumihardjo SA (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *The American journal of clinical nutrition* 83:191-201.
- Perlman I, Kolb H, Nelson R (2012) S-Potentials and Horizontal Cells. <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, Brewer DN, Del Pino Sans J, Lopez JA (2013) Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Frontiers in neuroscience* 7:164.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry* 83:346-356.
- Petit L, Lheriteau E, Weber M, Le Meur G, Deschamps JY, Provost N, Mendes-Madeira A, Libeau L, Guihal C, Colle MA, Moullier P, Rolling F (2012) Restoration of vision in the pde6beta-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20:2019-2030.
- Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Deng WT, Pang JJ, Min SH, Chiodo V, Neeley AW, Govindasamy L, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Zhong L, Li B, Jayandharan GR, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW (2011) Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:293-301.
- Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW (2009) High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17:463-471.
- Petrs-Silva H, Linden R (2014) Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clinical ophthalmology* 8:127-136.
- Pettus EH, Wright DW, Stein DG, Hoffman SW (2005) Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. *Brain research* 1049:112-119.
- Phillips MJ, Otteson DC, Sherry DM (2010) Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *The Journal of comparative neurology* 518:2071-2089.
- Phillips MJ, Walker TA, Choi HY, Faulkner AE, Kim MK, Sidney SS, Boyd AP, Nickerson JM, Boatright JH, Pardue MT (2008) Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:2148-2155.

- Piconi L, Quagliario L, Ceriello A (2003) Oxidative stress in diabetes. *Clinical chemistry and laboratory medicine* : CCLM / FESCC 41:1144-1149.
- Pittler SJ, Baehr W (1991) Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:8322-8326.
- Pittler SJ, Keeler CE, Sidman RL, Baehr W (1993) PCR analysis of DNA from 70-year-old sections of rodless retina demonstrates identity with the mouse rd defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9616-9619.
- Plassart-Schiess E, Baulieu EE (2001) Neurosteroids: recent findings. *Brain research Brain research reviews* 37:133-140.
- Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Slater TF, Lang J, Esterbauer H (1985) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *The Biochemical journal* 227:629-638.
- Poli G, Parola M (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. *Free radical biology & medicine* 22:287-305.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* 66:1499-1503.
- Pow DV, Crook DK (1995) Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neuroscience letters* 193:25-28.
- Prentice HM, Biswal MR, Dorey CK, Blanks JC (2011) Hypoxia-regulated retinal glial cell-specific promoter for potential gene therapy in disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:8562-8570.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:340-345.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:600-605.
- Pryor WA (1989) On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free radical biology & medicine* 7:177-178.
- Pugh EN, Jr., Cobbs WH (1986) Visual transduction in vertebrate rods and cones: a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. *Vision research* 26:1613-1643.
- Pugh EN, Jr., Duda T, Sitaramayya A, Sharma RK (1997) Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Bioscience reports* 17:429-473.
- Punzo C, Xiong W, Cepko CL (2012) Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *The Journal of biological chemistry* 287:1642-1648.

- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH, Jr., Paul SM (1991) Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4553-4557.
- Puthussery T, Gayet-Primo J, Pandey S, Duvoisin RM, Taylor WR (2009) Differential loss and preservation of glutamate receptor function in bipolar cells in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *The European journal of neuroscience* 29:1533-1542.
- Qi Y, Dai X, Zhang H, He Y, Zhang Y, Han J, Zhu P, Zhang Y, Zheng Q, Li X, Zhao C, Pang J (2015) Trans-Corneal Subretinal Injection in Mice and Its Effect on the Function and Morphology of the Retina. *PloS one* 10:e0136523.
- Radu RA, Yuan Q, Hu J, Peng JH, Lloyd M, Nusinowitz S, Bok D, Travis GH (2008) Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3821-3829.
- Rafati DS, Geissler K, Johnson K, Unabia G, Hulsebosch C, Nestic-Taylor O, Perez-Polo JR (2008) Nuclear factor-kappaB decoy amelioration of spinal cord injury-induced inflammation and behavior outcomes. *Journal of neuroscience research* 86:566-580.
- Rahi AH (1970) Autoimmunity and the retina. I. Antigenic specificity of photoreceptor cells. *The British journal of ophthalmology* 54:441-444.
- Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Shekhar HU (2012) Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3:997-1019.
- Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart MJ, da Cruz L, Coffey PJ (2013) Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 140:2576-2585.
- Rawn JD (1989) *Biochemistry*. Madrid: McGraw Hill-Interamericana.
- Raymond SM, Jackson IJ (1995) The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. *Current biology : CB* 5:1286-1295.
- Reddy DS, Rogawski MA (2009) Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6:392-401.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical biochemistry* 106:55-62.
- Reh TA (1987) Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:3317-3324.
- Reh TA (2006) Neurobiology: right timing for retina repair. *Nature* 444:156-157.

- Reichenbach A, Bringmann A (2010) Müller cells in the healthy and diseased retina. New York: Springer.
- Reiss GR, Werness PG, Zollman PE, Brubaker RF (1986) Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Archives of ophthalmology* 104:753-755.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J (2011) Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. *Polish journal of veterinary sciences* 14:149-158.
- Rhee KD, Yang XJ (2010) Function and mechanism of CNTF/LIF signaling in retinogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 664:647-654.
- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2000:pe1.
- Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A (1992) High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of chromatography* 577:9-18.
- Richman PG, Meister A (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *The Journal of biological chemistry* 250:1422-1426.
- Rider V, Psychoyos A (1994) Inhibition of progesterone receptor function results in loss of basic fibroblast growth factor expression and stromal cell proliferation during uterine remodelling in the pregnant rat. *The Journal of endocrinology* 140:239-249.
- Rigg JL, Elovic EP, Greenwald BD (2005) A review of the effectiveness of antioxidant therapy to reduce neuronal damage in acute traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation* 20:389-391.
- Riley MV, Meyer RF, Yates EM (1980) Glutathione in the aqueous humor of human and other species. *Investigative ophthalmology & visual science* 19:94-96.
- Ringvold A (1996) The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Experimental eye research* 62:261-264.
- Robinson PR, Cohen GB, Zhukovsky EA, Oprian DD (1992) Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* 9:719-725.
- Rodriguez-Muela N, Germain F, Marino G, Fitze PS, Boya P (2012) Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell death and differentiation* 19:162-169.
- Rodriguez-Muela N, Hernandez-Pinto AM, Serrano-Puebla A, Garcia-Ledo L, Latorre SH, de la Rosa EJ, Boya P (2015) Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Cell death and differentiation* 22:476-487.

- Roessler G, Laube T, Brockmann C, Kirschkamp T, Mazinani B, Goertz M, Koch C, Krisch I, Sellhaus B, Trieu HK, Weis J, Bornfeld N, Rothgen H, Messner A, Mokwa W, Walter P (2009) Implantation and explantation of a wireless epiretinal retina implant device: observations during the EPIRET3 prospective clinical trial. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:3003-3008.
- Rolling F (2004) Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene therapy* 11 Suppl 1:S26-32.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J (1998) Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental health perspectives* 106 Suppl 5:1229-1234.
- Rone MB, 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.
- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG (1994) Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Experimental neurology* 129:64-69.
- Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG (1996) Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Experimental neurology* 138:246-251.
- Roof RL, Hall ED (2000) Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *Journal of neurotrauma* 17:367-388.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG (1997) Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* 31:1-11.
- Rosch S, Johnen S, Muller F, Pfarrer C, Walter P (2014) Correlations between ERG, OCT, and Anatomical Findings in the rd10 Mouse. *Journal of ophthalmology* 2014:874751.
- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1992) A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 1:209-213.
- Roska B, Busskamp V, Sahel JA, Picaud S (2013) [Retinitis pigmentosa: eye sight restoration by optogenetic therapy]. *Biologie aujourd'hui* 207:109-121.
- Ross JW, Fernandez de Castro JP, Zhao J, Samuel M, Walters E, Rios C, Bray-Ward P, Jones BW, Marc RE, Wang W, Zhou L, Noel JM, McCall MA, DeMarco PJ, Prather RS, Kaplan HJ (2012) Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 53:501-507.
- Ross MH (2013) *Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires: Lippicott Williams & Wilkins. Inc. EE.UU.

- Rozanowska M, Bakker L, Boulton ME, Rozanowski 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.
- Rupprecht R, Berning B, Hauser CA, Holsboer F, Reul JM (1996) Steroid receptor-mediated effects of neuroactive steroids: characterization of structure-activity relationship. *European journal of pharmacology* 303:227-234.
- Rutar M, Provis JM, Valter K (2010) Brief exposure to damaging light causes focal recruitment of macrophages, and long-term destabilization of photoreceptors in the albino rat retina. *Current eye research* 35:631-643.
- Sahara S, Yamashima T (2010) Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochemical and biophysical research communications* 393:806-811.
- Sahel J, Bonnel S, Mrejen S, Paques M (2010) Retinitis pigmentosa and other dystrophies. *Developments in ophthalmology* 47:160-167.
- Sahel JA, Roska B (2013) Gene therapy for blindness. *Annual review of neuroscience* 36:467-488.
- Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, Romano MR, Parmeggiani F (2011) Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Current genomics* 12:276-284.
- Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of neurochemistry* 116:1-9.
- Sánchez-Vallejo V, Benlloch-Navarro S, López-Pedrajasa R, Romero FJ, Miranda M (2015) Neuroprotective actions of progesterone in an in vivo model of retinitis pigmentosa. *Pharmacological Research* 99:276-288.
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekstrom P, Paquet-Durand F (2008) Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Molecular neurobiology* 38:253-269.
- Sancho-Tello M, Muriach M, Barcia J, Bosch-Morell F, Genoves JM, Johnsen-Soriano S, Romero B, Almansa I, Diaz-Llopis M, Garcia-Delpech S, Roma J, Romero FJ (2008) Chronic alcohol feeding induces biochemical, histological, and functional alterations in rat retina. *Alcohol and alcoholism* 43:254-260.
- Sandberg MA, Brockhurst RJ, Gaudio AR, Berson EL (2005) The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:3349-3354.
- SanGiovanni JP, Chew EY (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research* 24:87-138.
- Sanvicens N, Cotter TG (2006) Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells. *Journal of neurochemistry* 98:1432-1444.

- Sanvicens N, Gomez-Vicente V, Masip I, Messeguer A, Cotter TG (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.
- Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, Rao VR (2009) Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European review for medical and pharmacological sciences* 13:129-132.
- Sanz MM, Johnson LE, Ahuja S, Ekstrom PA, 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 AR, 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.
- Sarthy V, Ripps H (2001) Role in retinal pathophysiology. In: *The retinal Müller Cell Structure and Function* (Blakemore, C., ed), pp 181-215 New York: Kluwer Academic/Plenum publishers.
- Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Noda K, Imamura Y, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K (2009) Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:1433-1439.
- Sator MO, Joura EA, Frigo P, Kurz C, Metka M, Hommer A, Huber JC (1997) Hormone replacement therapy and intraocular pressure. *Maturitas* 28:55-58.
- Sayed I, Guo Q, Hoffman SW, Stein DG (2006) Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Annals of emergency medicine* 47:381-389.
- Sayed I, Stein DG (2009) Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Progress in brain research* 175:219-237.
- Sayed I, Wali B, Stein DG (2007) Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restorative neurology and neuroscience* 25:151-159.
- Scott BL, Racz E, Lolley RN, Bazan NG (1988) Developing rod photoreceptors from normal and mutant Rd mouse retinas: altered fatty acid composition early in development of the mutant. *Journal of neuroscience research* 20:202-211.
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* 30:1191-1212.
- Schallenberg M, Charalambous P, Thanos S (2012) GM-CSF protects rat photoreceptors from death by activating the SRC-dependent signalling and elevating anti-apoptotic factors and neurotrophins. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 250:699-712.

- Schneider JL, Cuervo AM (2014) Autophagy and human disease: emerging themes. *Current opinion in genetics & development* 26:16-23.
- Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE (2000) Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *Journal of neurocytology* 29:307-326.
- Schumacher M, Guennoun R, Stein DG, De Nicola AF (2007) Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacology & therapeutics* 116:77-106.
- Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghoumari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in neuroscience* 6:10.
- Schutte M, Werner P (1998) Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neuroscience letters* 246:53-56.
- Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R (2014) Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*.
- Seelig GF, Simonsen RP, Meister A (1984) Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *The Journal of biological chemistry* 259:9345-9347.
- Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O (2001) Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *The Journal of clinical investigation* 107:717-725.
- Shadyro OI, Yurkova IL, Kisel MA (2002) Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *International journal of radiation biology* 78:211-217.
- Shaheen AA, Hamdy MA, Kheir-Eldin AA, Lindstrom P, el-Fattah AA (1993) Effect of pretreatment with vitamin E or diazepam on brain metabolism of stressed rats. *Biochemical pharmacology* 46:194-197.
- Shahrokhi N, Khaksari M, Soltani Z, Mahmoodi M, Nakhaee N (2010) Effect of sex steroid hormones on brain edema, intracranial pressure, and neurologic outcomes after traumatic brain injury. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 88:414-421.
- Shan Y, Sun C, Zhao X, Wu K, Cassidy A, Bao Y (2006) Effect of sulforaphane on cell growth, G(0)/G(1) phase cell progression and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *International journal of oncology* 29:883-888.
- Sharma N, Nehru B (2015) Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochemistry international*.
- Sharma RK, Agarwal AK (2004) Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reproductive medicine and Biology* 4:177-199.

- Shen J, Yang X, Dong A, Petters RM, Peng YW, Wong F, Campochiaro PA (2005) Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of cellular physiology* 203:457-464.
- Shichi H (2004) Cataract formation and prevention. *Expert opinion on investigational drugs* 13:691-701.
- Shin JY, Yu HG (2014) Chlorogenic acid supplementation improves multifocal electroretinography in patients with retinitis pigmentosa. *Journal of Korean medical science* 29:117-121.
- Sidman RL, Green MC (1965) Retinal Degeneration in the Mouse: Location of the Rd Locus in Linkage Group Xvii. *The Journal of heredity* 56:23-29.
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* 91:31S-38S.
- Singh M (2001) Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine* 14:407-415.
- Singh M (2006) Progesterone-induced neuroprotection. *Endocrine* 29:271-274.
- Singh M, Meyer EM, Simpkins JW (1995) The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* 136:2320-2324.
- Singh M, Su C (2013) Progesterone and neuroprotection. *Hormones and behavior* 63:284-290.
- Singh MS, Charbel Issa P, Butler R, Martin C, Lipinski DM, Sekaran S, Barnard AR, MacLaren RE (2013) Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1101-1106.
- Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R (2011) Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina* 31:1207-1214.
- Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR (2012) Gene supplementation therapy for recessive forms of inherited retinal dystrophies. *Gene therapy* 19:154-161.
- Smith LE (2004) Bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa. *The Journal of clinical investigation* 114:755-757.
- Sodha S, Wall K, Redenti S, Klassen H, Young MJ, Tao SL (2011) Microfabrication of a three-dimensional polycaprolactone thin-film scaffold for retinal progenitor cell encapsulation. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 22:443-456.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32:638-647.
- Soufi FG, Mohammad-Nejad D, Ahmadi H (2012) Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress - nuclear factor kappaB - apoptosis pathway. *Pharmacological reports : PR* 64:1505-1514.

- Spalton DJ, Rahi AH, Bird AC (1978) Immunological studies in retinitis pigmentosa associated with retinal vascular leakage. *The British journal of ophthalmology* 62:183-187.
- Spitznas M (1974) The fine structure of the chorioretinal border tissues of the adult human eye. *Advances in ophthalmology = Fortschritte der Augenheilkunde = Progres en ophtalmologie* 28:78-174.
- Sram RJ, Farmer P, Singh R, Garte S, Kalina I, Popov TA, Binkova B, Ragin C, Taioli E (2009) Effect of vitamin levels on biomarkers of exposure and oxidative damage-the EXPAH study. *Mutation research* 672:129-134.
- Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L, Banik NL (2004) 17beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *Journal of neuroscience research* 76:688-696.
- Stadler J, Bergonia HA, Di Silvio M, Sweetland MA, Billiar TR, Simmons RL, Lancaster JR, Jr. (1993) Nonheme iron-nitrosyl complex formation in rat hepatocytes: detection by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics* 302:4-11.
- Stearns G, Evangelista M, Fadool JM, Brockerhoff SE (2007) A mutation in the cone-specific *pde6* gene causes rapid cone photoreceptor degeneration in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:13866-13874.
- Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1526-1530.
- Stein DG (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends in neurosciences* 24:386-391.
- Stein DG (2008) Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain research reviews* 57:386-397.
- Stein DG (2011) Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury? *Dialogues in clinical neuroscience* 13:352-359.
- Stein DG (2013) A clinical/translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Hormones and behavior* 63:291-300.
- Stein DG, Wright DW (2010) Progesterone in the clinical treatment of acute traumatic brain injury. *Expert opinion on investigational drugs* 19:847-857.
- Stein DG, Wright DW, Kellermann AL (2008) Does progesterone have neuroprotective properties? *Annals of emergency medicine* 51:164-172.
- Stein GD, Hurn PD (2009) Effects of sexsteroids on damaged neural systems. In: *Hormones, Brain and Behaviour*, vol. 2 (Pfaff, D. W. et al., eds), pp 2223-2258 Oxford, UK: Elsevier.

- Steinberg RH (1986) Research update: report from a workshop on cell biology of retinal detachment. *Experimental eye research* 43:695-706.
- Stingl K, Bartz-Schmidt KU, Gekeler F, Kusnyerik A, Sachs H, Zrenner E (2013) Functional outcome in subretinal electronic implants depends on foveal eccentricity. *Investigative ophthalmology & visual science* 54:7658-7665.
- Stoffel-Wagner B (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 145:669-679.
- Stone EM (2003) Finding and interpreting genetic variations that are important to ophthalmologists. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 101:437-484.
- Stoyanovsky DA, Goldman R, Darrow RM, Organisciak DT, Kagan VE (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 JW (2003) Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 74:179-185.
- Stryer L (1991) Visual excitation and recovery. *The Journal of biological chemistry* 266:10711-10714.
- Stryer L, Bourne HR (1986) G proteins: a family of signal transducers. *Annual review of cell biology* 2:391-419.
- Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF (1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *The Journal of experimental medicine* 169:1011-1020.
- Su C, Cunningham RL, Rybalchenko N, Singh M (2012) Progesterone increases the release of brain-derived neurotrophic factor from glia via progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1)-dependent ERK5 signaling. *Endocrinology* 153:4389-4400.
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (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.
- Sugino N, Shimamura K, Tamura H, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, Kato H (1996) Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 137:749-754.
- Sun D, Enzmann V, Lei S, Sun SL, Kaplan HJ, Shao H (2003) Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC

- class II molecules, but inhibit T cell activation when they express restricted levels. *Journal of neuroimmunology* 144:1-8.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A (1990) Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:3343-3347.
- Svensson EC, Markstrom E, Andersson M, Billig H (2000) Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biology of reproduction* 63:1457-1464.
- Swiatek-De Lange M, Stampfl A, Hauck SM, Zischka H, Gloeckner CJ, Deeg CA, Ueffing M (2007) Membrane-initiated effects of progesterone on calcium dependent signaling and activation of VEGF gene expression in retinal glial cells. *Glia* 55:1061-1073.
- Szelag M, Mikulski D, Molski M (2012) Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of alpha-lipoic acid and its metabolites. *Journal of molecular modeling* 18:2907-2916.
- Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, Gage FH (1999) Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *Journal of virology* 73:7812-7816.
- Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1998) Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Molecular and cellular neurosciences* 12:340-348.
- Takano Y, Ohguro H, Dezawa M, Ishikawa H, Yamazaki H, Ohguro I, Mamiya K, Metoki T, Ishikawa F, Nakazawa M (2004) Study of drug effects of calcium channel blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 313:1015-1022.
- Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, Chandross KJ (2004) 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *Journal of neurochemistry* 89:660-673.
- Tamasi V, Jeffries JM, Arteel GE, Falkner KC (2004) Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription. *Archives of biochemistry and biophysics* 431:161-168.
- Tan SM, Deliyanti D, Figgitt WA, Talia DM, de Haan JB, Wilkinson-Berka JL (2015) Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Muller cell and vascular injury in the retina. *Experimental eye research* 136:1-8.
- Tanito M, Nishiyama A, Tanaka T, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J, Ohira A (2002) Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photooxidative damage. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:2392-2400.
- Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman SD, O'Rourke PJ, Stabila PF, Bell WJ, Dean BJ, Kauper KA, Budz VA, Tsiaras WG, Acland GM, Pearce-Kelling S, Laties AM, Aguirre GD (2002) Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces

photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:3292-3298.

- Terenzi F, Diaz-Guerra MJ, Casado M, Hortelano S, Leoni S, Bosca L (1995) Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. *The Journal of biological chemistry* 270:6017-6021.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Tian C, Zhao T, Zeng Y, Yin ZQ (2011) Increased Muller cell de-differentiation after grafting of retinal stem cell in the sub-retinal space of Royal College of Surgeons rats. *Tissue engineering Part A* 17:2523-2532.
- Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J (2013) Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology* 14:461-482.
- Tokuda K, Izumi Y, Zorumski CF (2013) Locally-generated Acetaldehyde Contributes to the Effects of Ethanol on Neurosteroids and LTP in the Hippocampus. *Neurology and clinical neuroscience* 1:138-147.
- Tomita T (1965) Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 30:559-566.
- Tornquist P, Alm A (1979) Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs. *Acta physiologica Scandinavica* 106:351-357.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 57:145-155.
- Travis GH, Christerson L, Danielson PE, Klisak I, Sparkes RS, Hahn LB, Dryja TP, Sutcliffe JG (1991) The human retinal degeneration slow (RDS) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA. *Genomics* 10:733-739.
- Trifunovic D, Sahaboglu A, Kaur J, Menci S, Zrenner E, Ueffing M, Arango-Gonzalez B, Paquet-Durand F (2012) Neuroprotective strategies for the treatment of inherited photoreceptor degeneration. *Current molecular medicine* 12:598-612.
- Tripathi BJ, Tripathi RC, Livingston AM, Borisuth NS (1991) The role of growth factors in the embryogenesis and differentiation of the eye. *The American journal of anatomy* 192:442-471.
- Trotta PP, Platzer KE, Haschemeyer RH, Meister A (1974) Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71:4607-4611.

- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE (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.
- Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FB, Huang SS (2007) Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *Journal of vascular surgery* 46:346-353.
- Tsubura A, Yuri T, Yoshizawa K, Uehara N, Takada H (2009) Role of fatty acids in malignancy and visual impairment: epidemiological evidence and experimental studies. *Histology and histopathology* 24:223-234.
- Tsui I, Song B, Chyuan-Shen L, Tsang SH (2007) *A Practical Approach to Retinal Dystrophies*
- Tucker BA, Mullins RF, Stone EM (2014) Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease. *Human molecular genetics* 23:R9-R16.
- Tuckey RC (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26:273-281.
- Tuntivanich N, Pittler SJ, Fischer AJ, Omar G, Kiupel M, Weber A, Yao S, Steibel JP, Khan NW, Petersen-Jones SM (2009) Characterization of a canine model of autosomal recessive retinitis pigmentosa due to a PDE6A mutation. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:801-813.
- Turkmen S, Backstrom T, Wahlstrom G, Andreen L, Johansson IM (2011) Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *British journal of pharmacology* 162:311-327.
- Uchida K, Stadtman ER (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *The Journal of biological chemistry* 268:6388-6393.
- Uchiyama Y (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Archives of histology and cytology* 64:233-246.
- Umapathy A, Donaldson P, Lim J (2013) Antioxidant delivery pathways in the anterior eye. *BioMed research international* 2013:207250.
- Uno K, Prow TW, Bhutto IA, Yerrapureddy A, McLeod DS, Yamamoto M, Reddy SP, Luttly GA (2010) Role of Nrf2 in retinal vascular development and the vaso-obliterative phase of oxygen-induced retinopathy. *Experimental eye research* 90:493-500.
- Usui S, Komeima K, Lee SY, Jo YJ, Ueno S, Rogers BS, Wu Z, Shen J, Lu L, Oveson BC, Rabinovitch PS, Campochiaro PA (2009a) Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17:778-786.
- Usui S, Oveson BC, Iwase T, Lu L, Lee SY, Jo YJ, Wu Z, Choi EY, Samulski RJ, Campochiaro PA (2011) Overexpression of SOD in retina: need for increase in

- H2O2-detoxifying enzyme in same cellular compartment. *Free radical biology & medicine* 51:1347-1354.
- Usui S, Oveson BC, Lee SY, Jo YJ, Yoshida T, Miki A, Miki K, Iwase T, Lu L, Campochiaro PA (2009b) NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of neurochemistry* 110:1028-1037.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, 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.
- Vallee M, Rivera JD, Koob GF, Purdy RH, Fitzgerald RL (2000) Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 287:153-166.
- van Reyk DM, Gillies MC, Davies MJ (2003) The retina: oxidative stress and diabetes. *Redox report : communications in free radical research* 8:187-192.
- Vandenbergh LH, Auricchio A (2012) Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene therapy* 19:162-168.
- VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ (2003) Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14247-14252.
- Vasireddy V, Chavali VR, Joseph VT, Kadam R, Lin JH, Jamison JA, Kompella UB, Reddy GB, Ayyagari R (2011) Rescue of photoreceptor degeneration by curcumin in transgenic rats with P23H rhodopsin mutation. *PloS one* 6:e21193.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC (2015) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*.
- Vedder H, Anthes N, Stumm G, Wurz C, Behl C, Krieg JC (1999) Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *Journal of neurochemistry* 72:2531-2538.
- Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R (2000) Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:927-936.
- Wali B, Ishrat T, Won S, Stein DG, Sayeed I (2014) Progesterone in experimental permanent stroke: a dose-response and therapeutic time-window study. *Brain : a journal of neurology* 137:486-502.
- Wang DY, Chan WM, Tam PO, Chiang SW, Lam DS, Chong KK, Pang CP (2005) Genetic markers for retinitis pigmentosa. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine* 11:281-288.
- Wang JM, Liu L, Irwin RW, Chen S, Brinton RD (2008) Regenerative potential of allopregnanolone. *Brain research reviews* 57:398-409.

- Wang K, Xiao J, Peng B, Xing F, So KF, Tipoe GL, Lin B (2014) Retinal structure and function preservation by polysaccharides of wolfberry in a mouse model of retinal degeneration. *Scientific reports* 4:7601.
- Wang Q, Chen Q, Zhao K, Wang L, Wang L, Traboulsi EI (2001) Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic genetics* 22:133-154.
- Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, Smith LD (1980) Progesterone induces a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:1534-1536.
- Watson BD (1993) Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. *Progress in brain research* 96:69-95.
- Wei W, Li L, Zhang Y, Geriletu, Yang J, Zhang Y, Xing Y (2014) Vitamin C protected human retinal pigmented epithelium from oxidant injury depending on regulating SIRT1. *TheScientificWorldJournal* 2014:750634.
- Weiland JD, Cho AK, Humayun MS (2011) Retinal prostheses: current clinical results and future needs. *Ophthalmology* 118:2227-2237.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:5212-5216.
- Welsch U, Sobotta J (2008) *Histología*. Madrid: Panamericana, E. M.
- Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA (2012) CNTF and retina. *Progress in retinal and eye research* 31:136-151.
- Wensel TG (2008) Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments. *Vision research* 48:2052-2061.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in retinal and eye research* 24:275-306.
- Werblin FS, Dowling JE (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *Journal of neurophysiology* 32:339-355.
- Wert KJ, Davis RJ, Sancho-Pelluz J, Nishina PM, Tsang SH (2013) Gene therapy provides long-term visual function in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics* 22:558-567.
- West EL, Gonzalez-Cordero A, Hippert C, Osakada F, Martinez-Barbera JP, Pearson RA, Sowden JC, Takahashi M, Ali RR (2012) Defining the integration capacity of embryonic stem cell-derived photoreceptor precursors. *Stem cells* 30:1424-1435.
- West JB (1986) *Best y Taylor Bases fisiológicas de la práctica médica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA (2000) Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 78:146-153.

- Widomska J, Subczynski WK (2014) Why has Nature Chosen Lutein and Zeaxanthin to Protect the Retina? *Journal of clinical & experimental ophthalmology* 5:326.
- Wilden U, Hall SW, Kuhn H (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:1174-1178.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75:1149-1163.
- Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, Jahreiss L, Fleming A, Pask D, Goldsmith P, O'Kane CJ, Floto RA, Rubinsztein DC (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature chemical biology* 4:295-305.
- Williams DS (2008) Usher syndrome: animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy. *Vision research* 48:433-441.
- Winkler BS (2008) An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3259-3261.
- Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P (1999) Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular vision* 5:32.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M (2001) Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 142:969-973.
- Witkin AJ, Ko TH, Fujimoto JG, Chan A, Drexler W, Schuman JS, Reichel E, Duker JS (2006) Ultra-high resolution optical coherence tomography assessment of photoreceptors in retinitis pigmentosa and related diseases. *American journal of ophthalmology* 142:945-952.
- Woo JM, Shin DY, Lee SJ, Joe Y, Zheng M, Yim JH, Callaway Z, Chung HT (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.
- Wright DW, Kellermann AL, Hertzberg VS, Clark PL, Frankel M, Goldstein FC, Salomone JP, Dent LL, Harris OA, Ander DS, Lowery DW, Patel MM, Denson DD, Gordon AB, Wald MM, Gupta S, Hoffman SW, Stein DG (2007) ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Annals of emergency medicine* 49:391-402, 402 e391-392.
- Wright LS, Phillips MJ, Pinilla I, Hei D, Gamm DM (2014) Induced pluripotent stem cells as custom therapeutics for retinal repair: progress and rationale. *Experimental eye research* 123:161-172.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *The European journal of neuroscience* 19:1699-1707.

- Wu J, Seregard S, Algvare PV (2006) Photochemical damage of the retina. *Survey of ophthalmology* 51:461-481.
- Xiao G, Wei J, Yan W, Wang W, Lu Z (2008) Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Critical care* 12:R61.
- Xu X, Hang L, Huang B, Wei Y, Zheng S, Li W (2013) Efficacy of Ethanol Extract of *Fructus lycii* and Its Constituents Lutein/Zeaxanthin in Protecting Retinal Pigment Epithelium Cells against Oxidative Stress: In Vivo and In Vitro Models of Age-Related Macular Degeneration. *Journal of ophthalmology* 2013:862806.
- Xu Z, Wei Y, Gong J, Cho H, Park JK, Sung ER, Huang H, Wu L, Eberhart C, Handa JT, Du Y, Kern TS, Thimmulappa R, Barber AJ, Biswal S, Duh EJ (2014) NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* 57:204-213.
- Yan N, Meister A (1990) Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 265:1588-1593.
- Yanai D, Weiland JD, Mahadevappa M, Greenberg RJ, Fine I, Humayun MS (2007) Visual performance using a retinal prosthesis in three subjects with retinitis pigmentosa. *American journal of ophthalmology* 143:820-827.
- Yang LP, Li Y, Zhu XA, Tso MO (2007) Minocycline delayed photoreceptor death in rds mice through iNOS-dependent mechanism. *Molecular vision* 13:1073-1082.
- Yang RB, Robinson SW, Xiong WH, Yau KW, Birch DG, Garbers DL (1999) Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:5889-5897.
- Yang XL (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in neurobiology* 73:127-150.
- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP (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.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ (2007) Estrogen regulates *Bcl-w* and *Bim* expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1422-1433.
- Yara S, Lavoie JC, Beaulieu JF, Delvin E, Amre D, Marcil V, Seidman E, Levy E (2013) Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PloS one* 8:e63456.
- Yates MA, Li Y, Chlebeck P, Proctor T, Vandenbark AA, Offner H (2010) Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 220:136-139.
- Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Developmental biology* 274:233-244.

- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews* 111:5944-5972.
- Yin P, Lin Z, Cheng YH, Marsh EE, Utsunomiya H, Ishikawa H, Xue Q, Reierstad S, Innes J, Thung S, Kim JJ, Xu E, Bulun SE (2007) Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:4459-4466.
- Yoshida K, Imaki J, Matsuda H, Hagiwara M (1995) Light-induced CREB phosphorylation and gene expression in rat retinal cells. *Journal of neurochemistry* 65:1499-1504.
- Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T (2013a) Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 120:100-105.
- Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T (2013b) Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 120:e5-12.
- Young MJ, Ray J, Whiteley SJ, Klassen H, Gage FH (2000) Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Molecular and cellular neurosciences* 16:197-205.
- Young RW (1974) Proceedings: Biogenesis and renewal of visual cell outer segment membranes. *Experimental eye research* 18:215-223.
- Young RW (1977) The daily rhythm of shedding and degradation of cone outer segment membranes in the lizard retina. *Journal of ultrastructure research* 61:172-185.
- Young RW (1978) The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 17:105-116.
- Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *The Journal of comparative neurology* 229:362-373.
- Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *The Journal of cell biology* 42:392-403.
- Yu CC, Nandrot EF, Dun Y, Finnemann SC (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 DY, 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 DY, Cringle SJ, Su EN, Yu PK (2000) Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:3999-4006.

- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
- Yucel I, Akar Y, Yucel G, Ciftcioglu MA, Keles N, Aslan M (2005) Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision research* 45:1107-1114.
- Zaidi SM, Banu N (2004) Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 340:229-233.
- Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K (2013) Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of proteomics* 92:239-247.
- Zhang M, Zhou J, Marshall B, Xin H, Atherton SS (2007) Lack of iNOS facilitates MCMV spread in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 48:285-292.
- Zhang S, Wu J, Wu X, Xu P, Tian Y, Yi M, Liu X, Dong X, Wolf F, Li C, Huang Q (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.
- Zhang TZ, Fan B, Chen X, Wang WJ, Jiao YY, Su GF, Li GY (2014) Suppressing autophagy protects photoreceptor cells from light-induced injury. *Biochemical and biophysical research communications* 450:966-972.
- Zhang Y, Talalay P (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer research* 54:1976s-1981s.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:2399-2403.
- Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, Liu P (2010) Resveratrol protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Molecular vision* 16:1467-1474.
- Zhu Y, Park SH, Ozden O, Kim HS, Jiang H, Vassilopoulos A, Spitz DR, Gius D (2012) Exploring the electrostatic repulsion model in the role of Sirt3 in directing MnSOD acetylation status and enzymatic activity. *Free radical biology & medicine* 53:828-833.
- Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H, Besch D, Bruckmann A, Gabel VP, Gekeler F, Greppmaier U, Harscher A, Kibbel S, Koch J, Kusnyerik A, Peters T, Stingl K, Sachs H, Stett A, Szurman P, Wilhelm B, Wilke R (2011) Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 278:1489-1497.

