



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Analysis of Photoreceptor Degeneration in
Experimental Models of Retinitis Pigmentosa,
Aging Macular Degeneration and Glaucoma

Análisis de la Degeneración de los Fotorreceptores
en Modelos Experimentales de Retinosis Pigmentaria,
Degeneración Macular Asociada a la Edad y Glaucoma

D. Arturo Ortín Martínez
2015



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía
Patológica

Facultad de Medicina

Programa de postgrado en Ciencias de la Visión

**“ANÁLISIS DE LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE RETINOSIS PIGMENTARIA,
DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD Y GLAUCOMA”**

Presentada por:

Arturo Ortín Martínez

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia
con la mención internacional de Doctor

Esta Tesis ha sido presentada en la modalidad de compendio de publicaciones

Dirigida por:

Manuel Vidal Sanz, Marta Agudo Barriuso y M^a Paz Villegas Pérez

2015



University of Murcia

Laboratory of Experimental Ophthalmology

Department of Ophthalmology, Optometry, Otolaryngology and Pathology

Faculty of Medicine

Postgraduate program in Visual Science

**“ANALYSIS OF PHOTORECEPTOR DEGENERATION
IN EXPERIMENTAL MODELS OF RETINITIS PIGMENTOSA,
AGING MACULAR DEGENERATION AND GLAUCOMA”**

Dissertation submitted by

Arturo Ortín Martínez

to obtain the PhD DEGREE from THE UNIVERSITY OF MURCIA
with the “INTERNATIONAL DOCTOR” mention

This PhD Thesis has been submitted in the form of “COMPENDIUM OF PUBLICATIONS”

Directed by:

Manuel Vidal Sanz, Marta Agudo Barriuso and M^a Paz Villegas Pérez

2015

A las superheroínas Sofía y Cloe.

A mis Padres.

A mi Lala Gema

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS -	
ACKNOWLEDGEMENTS.....	I
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS	IV
ANEXO DE DOCUMENTOS	
ADMINISTRATIVOS.	V
HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO	
TRABAJO.....	XX
CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS:	XX
<i>Publicaciones y comunicaciones en</i>	
<i>congresos.</i>	<i>xxi</i>
Capítulos de libro.	xxi
Artículos.	xxii
Contribuciones a congresos.	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS	XXXIV
1 RESUMEN.....	1
2 SUMMARY.....	4
3 INTRODUCCIÓN.....	6
3.1 LA RETINA EN EL SISTEMA NERVIOSO	
CENTRAL.	6
3.1.1 <i>El Sistema Visual.....</i>	<i>6</i>
3.1.2 <i>El ojo.....</i>	<i>7</i>
3.1.3 <i>La retina.....</i>	<i>8</i>
3.1.3.1 Fotorreceptores.	10
3.1.3.1.1 Opsinas.....	13
3.1.3.2 Epitelio pigmentario de la	
retina.	14
3.1.3.3 Especialización regional de	
la retina.	16
3.2 MODELOS EXPERIMENTALES.	17
3.2.1 <i>Modelos experimentales de</i>	
<i>Retinosis Pigmentaria.....</i>	<i>17</i>
3.2.2 <i>Modelos experimentales de</i>	
<i>DMAE.</i>	<i>18</i>
3.2.3 <i>Modelos experimentales de</i>	
<i>Glaucoma.</i>	<i>19</i>
3.3 NEUROPROTECCIÓN EN MODELOS DE	
DEGENERACIÓN RETINIANA.....	22
3.4 IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DISTINTAS	
POBLACIONES CELULARES EN LA RETINA.....	23
3.4.1 <i>Células Ganglionares de</i>	
<i>Retina.</i>	<i>24</i>
3.4.2 <i>Fotorreceptores.</i>	<i>26</i>
3.4.2.1 Bastones.	27
3.4.2.2 Conos.....	27
3.4.3 <i>Métodos cuantitativos.</i>	<i>28</i>
4 COMPENDIO DE PUBLICACIONES.....	30
5 CONCLUSIONES GENERALES	33
6 GENERAL CONCLUSIONS.....	35
7 BIBLIOGRAFÍA.....	37

AGRADECIMIENTOS - ACKNOWLEDGEMENTS

Con el permiso de Jean de la Bruyère, que aseguró que "el único exceso permitido en el mundo, es el exceso de gratitud" e intentando no excederme, aunque presintiendo no conseguirlo... me gustaría comenzar estas líneas por donde inequívocamente he de comenzar... con **Don Manuel Vidal** estaré siempre en deuda, y no por haber sido ejemplo categórico de altísima capacidad de trabajo, no por demostrar cada día que el camino correcto es la búsqueda de lo estrictamente bien hecho sin la necesidad de obtener el éxito sino la importancia de conseguir el mérito, tampoco por recordarme constantemente con su actitud, que la exigencia es un reflejo de un cariño cuasi-paternal, ni por ayudarme a superar las adversidades cuando lo he necesitado. No, por todo eso no estaré endeudado, por todo eso y más, le estaré enormemente agradecido. La deuda parte de otra experiencia, la deuda se contrajo en el momento en que, como el mejor de los Maestros, consiguió despertar en mí el interés real por la Ciencia.

A **Marta Agudo** le agradezco sinceramente sus aportaciones diarias, que a nivel científico me han hecho evolucionar muchísimo y además han proporcionado valor científico a esta Tesis Doctoral, pero sobretodo quiero agradecer su paciencia, voluntad, interés, esfuerzo, constancia y ayuda en el día a día. Siempre tendré presente las conversaciones en la azotea, gracias.

El transcurso de mi doctorado ha permitido cerciorarme de mi admiración especial a **María Paz Villegas**, inteligencia, audacia, agudeza, juicio, sinceridad, trabajo, tenacidad, generosidad, dignidad y humanidad, son palabras que la acompañan, valores a los que cualquiera aspira para su crecimiento científico y humano y, en ella, suponen un ejemplo. Gracias.

Cuando comencé a trabajar en el laboratorio fueron dos personas las que se encargaron de, y consiguieron que, mis inicios fueran fáciles. Dos personas a las que admiro a nivel personal y a nivel científico, estoy seguro de que con su capacidad humana y científica ambos tendrán un futuro y un presente brillante, gracias **Manuel Salinas**, gracias **Javier Valiente**, no sólo por los primeros meses en el lab, sino por todo el tiempo que hemos trabajado juntos desde que llegué hasta el día de hoy.

Probablemente en la próxima edición del diccionario de la RAE "trabajo" se defina en una nueva acepción como **Francisco Nadal**, todos admiramos tu capacidad de trabajo y la perfección en el hacer a la que llegas siempre, pero lo que verdaderamente te agradezco es tu bondad y tu compañerismo.

Nuestro trabajo juntos ha ido "in crescendo" siendo últimamente un habitual, **Jose Manuel Bernal**, gracias por hacer tan cómodo el trabajo, gracias por tu disposición siempre, y gracias por trabajar siempre con buen humor que, a veces, es tan necesario.

Leticia Nieto, es el claro ejemplo de que en el lugar de trabajo también se puede encontrar la amistad, la amistad sincera, desinteresada, leal, y recíproca. Gracias por cada día de apoyo, cada día de risas cuando aún no necesitándolas, nos venían muy bien, y gracias por cada agobio que he desahogado a tu lado. Alba tendrá un gran ejemplo en ti.

Uno de los colegas con quien he pasado mucho tiempo por nuestro mutuo interés en los fotorreceptores es **Diego García**. Su capacidad de organización, planificación y eficiencia la envidio sanamente, y agradezco el tiempo que hemos trabajado juntos y su ayuda en mis inicios con los fotorreceptores.

Sin el esfuerzo de **Manuel Jiménez**, esta Tesis Doctoral no hubiera podido realizarse, sin el desarrollo técnico de los macros del programa de análisis de imagen no contaríamos nada, y el desarrollo de los buenos ratos que nos has hecho pasar a todos, con su exquisito humor manchego, son muy de agradecer.

Luis Alarcón ha sido coautor de dos de los trabajos que en esta Tesis se presentan pero en el tiempo que compartimos en el lab estuvo siempre dispuesto a dar su siempre constructiva ayuda tanto en aspectos científicos como personales, gracias.

A **Marcelino Avilés**, además de su colaboración científica, he de agradecer su disposición total, permanente e inagotable por el buen funcionamiento del laboratorio, tarea para lo que reconozco se hace necesaria una paciencia casi infinita.

A los demás compañeros del lab, **Caridad Galindo**, **Miriam Sánchez-Migallón** y **Johnny Di Pierdomenico**, que ya son años trabajando juntos y son suficientes para entender que además de buenos en el lab sois personas con buenos valores, os agradezco el día a día. Además me gustaría agradecer a Cari, su tiempo y generosidad para poner los puntos sobre las íes a esta Tesis.

A los que por razones logísticas hemos pasado menos tiempo juntos pero no olvido, **Isabel Cánovas**, **Luis Montalbán** y **Juanjo Alburquerque**. A los visitantes del Lab, **Frabicio Bezerra**, **Giuseppe Rovere** y **Maria Helena Madeira**.

Por último a **Juan Antonio Miralles de Imperial** y **Sergio Rodríguez**, he de decir sinceramente que estoy seguro que vuestro futuro va a ser muchísimo mejor del que podeis esperar, a nivel profesional sois muy muy buenos, a nivel personal, sois mejores, y eso es lo que se necesita para llegar al éxito a través del mérito.

A los coautores de los artículos de fuera de nuestro lab, cuya colaboración ha permitido desarrollar con éxito los experimentos que se plasman en las publicaciones del compendio, **Yves Sauvé**, **Nicolás Cuenca**, **Isabel Pinilla** y **Larry Wheeler**.

Lo dejo para el final pero por simple cuestión de protocolo. Aunque no hemos sido compañeros en el aspecto científico, **M^aDolores Soria**, ha sido más que compañera a nivel de trabajo y a nivel personal, sin los administrativos el trabajo científico no podría desarrollarse y sin personas como ella a mi lado, hubiera sido más difícil levantarme determinados días para llegar a trabajar, ha sido en muchísimas ocasiones como mi hermana mayor, mis más sincero agradecimiento.

I would like to thank the people who gave me the opportunity to visit a foreign Laboratory. Thanks to all the members of the Department of Biological Science of Allergan in California, particularly to **Larry Wheeler, Guadalupe Ruiz** and **Merci Wijono**. I spent five memorable weeks in Irvine.

Many thanks to **Pete Coffey, Anthony Vugler** and **Ma'ayan Semo** for their kind welcome in their research, for the amazing scientific collaboration that began that summer and it continues today, and hopefully will continue much longer. Thank to all the staff of the Division of Cellular Therapy of the Institute of Ophthalmology at the University College of London, especially to **Carlos Gias, Matt Smart** and **Yasmyn Rybak-Rajewski** who made me feel at home. I will be forever grateful to you all.

Una vez enumeradas todas las personas que han contribuido de una manera u otra a nivel científico en la consecución de esta Tesis Doctoral, no puedo olvidar mencionar a todas las personas que, sin participación científica en la misma, han hecho posible sin duda alguna, que esta Tesis concluya de forma satisfactoria. Por supuesto son aquellas personas que, al igual que esta Tesis, han formado parte de mi vida de forma muy estrecha durante estos años.

A nivel académico y sin excluir lo personal quiero agradecer al maestro que, ya en mi infancia, me enseñó a tener un espíritu crítico y supo alentar en mí la búsqueda del conocimiento, **Don José Toledo**. A **Pepa Garrido, Carmina Cánovas** y **Belén Marín** y junto a ella a **Luis** y **Nacho Pérez-Cuadrado** y **Antonio García**, debo agradecerles ser soporte emocional y fuente de ánimo cuando más lo he necesitado.

En el trascurso de esta tesis he pasado muchísimos momentos muy buenos, pero por "justicia de vida" (supongo) ha habido demasiados momentos muy duros, y por supuesto y como siempre, han estado conmigo los de siempre, los amigos. Los que conocí en la temprana infancia **Elena Peñalver** y **Javier Hernández**, los amigos de la Universidad, **Germán Teruel, Rubén Giménez, José Miguel Gómez, José Fulgencio Angosto** y las amigas del Máster **Ana Gargallo** y **Luchi Hervella**.

Omitiendo esos momentos tan difíciles pero recordando que como siempre los hemos superado juntos y entre todos, y sin poder desvincular esta Tesis de parte de mi vida. Como todo en mi vida, esta Tesis Doctoral está construida, en parte, por mi familia: **mis Abuelos** y **mis Lalas, mi Madre** y **mi Padre**, mis hermanos **Víctor** y **Zaira**, mis cuñados **Merche** y **David** mi sobrina **Cloe** y mi ahijada **Sofía**, y en mención especial mi pareja, **Jorge Galán**, coautor de mi felicidad.

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Esta Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de "Tesis Doctoral como compendio de publicaciones" con acuerdo a lo expuesto en el artículo 11.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero. Además se solicita para el Doctorando la mención de "Doctor Internacional" cumpliendo con lo expuesto en el Real Decreto 1393/2007, de 29 de Octubre que regula los Programas de Doctorado.

Por consiguiente, y para cumplir los requisitos recogidos en la normativa, se adjunta en su presentación para la correspondiente autorización en la Comisión General de Doctorado:

- o Una copia de cada trabajo publicado en relación a esta Tesis Doctoral incluido en el compendio.
- o Informe de los codirectores de la tesis justificando el compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.
- o Informe del doctorando, avalado por los codirectores, en el que se especifica las aportaciones a los trabajos adjuntados al compendio.
- o Documentación de conformidad, con el compromiso de no presentar los trabajos presentados en esta tesis como parte de de otra Tesis Doctoral y la declaración de la relevancia de las aportaciones del doctorando a estos trabajos, por cada uno de los trabajos que componen esta tesis.
- o Acreditación de una estancia de Investigación de tres meses en la "Division of Cellular Therapy" en el "Institute of Ophthalmology" en el "University College of London" bajo la supervisión y tutela del Profesor Pete Coffey, subvencionada por una beca de movilidad para estudiantes de doctorado para la consecución de la mención internacional en el título de doctor, del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, en el año 2010.
- o Informes favorables de los Doctores Anthony Vugler (University College of London) y António Francisco Ambrósio (University of Coimbra).

Asimismo, y cumpliendo con la normativa que regula esta modalidad de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones y la solicitud de la mención de Doctor internacional, en esta tesis aparece:

- o Un resumen global en castellano e inglés en el que se presentan como una unidad científica todos los trabajos aportados al compendio, a la vez que se documenta el objetivo general de la tesis y los objetivos específicos y las conclusiones finales de los trabajos que compilan esta Tesis Doctoral.
- o Una introducción que presenta conceptos necesarios para la comprensión de los trabajos y justifica la unidad científica de la tesis.

ANEXO DE DOCUMENTOS ADMINISTRATIVOS.

En los siguientes anexos se encuentra:

1. Informe del presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión.
2. Autorización de los Directores de la Tesis Doctoral para su presentación.
3. Acreditación de estancia de tres meses en en la *Division of Cellular Therapy* en el *Institute of Ophthalmology* en el *University College of London* bajo la supervisión y tutela del Profesor Pete Coffey.
4. Informe favorable del Dr. António Francisco Ambrosio del *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences* de la *University of Coimbra* en Portugal.
5. Informe Favorable de Dr. Anthony Vugler del *Institute of Ophthalmology* en el *University College of London* en Reino Unido.
6. Informe de los Directores de la Tesis Doctoral justificando su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones.
7. Informe del Doctorando avalado por los Directores de las aportaciones a cada trabajo presentado.
8. Declración de los coautores por cada artículo presentado.

Informe del presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología y Presidente de la Comisión Académica del Programa de Ciencias de la Visión,

INFORMA:

Que el Proyecto de Tesis Doctoral titulado “**ANÁLISIS DE LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES EN MODELOS EXPERIMENTALES DE RETINOSIS PIGMENTARIA, DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD Y GLAUCOMA**”, ha sido realizado por D. **Arturo Ortín Martínez**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Manuel Vidal Sanz, Dña. Marta Agudo Barriuso y Dña. María Paz Villegas Pérez, y que la Comisión Académica ha dado su conformidad para que sea presentado ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a veintidós de abril de dos mil quince.

Fdo.: Prof. Manuel Vidal Sanz

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 883961 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

Autorización de los Directores de la Tesis Doctoral para su presentación.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, y

Dña. Marta Agudo Barriuso, Investigadora de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS),

Dña. María Paz Villegas Pérez, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“ANÁLISIS DE LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES EN MODELOS EXPERIMENTALES DE RETINOSIS PIGMENTARIA, DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD Y GLAUCOMA”**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia, con mención internacional y bajo la modalidad de compendio de publicaciones.

En Murcia, a veintidós de abril de dos mil quince.

Prof. Manuel Vidal Sanz Dra. Marta Agudo Barriuso Prof. María Paz Villegas Pérez

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia
T. 868 883961 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

Acreditación de estancia de tres meses en en la *Division of Cellular Therapy* en el *Institute of Ophthalmology* en el *University College of London* bajo la supervisión y tutela del Profesor Pete Coffey.

UCL INSTITUTE OF OPHTHALMOLOGY
OCULAR BIOLOGY & THERAPEUTICS



28 September 2010

To Whom It May Concern:

Re: Arturo Ortin Martinez

It has been an immense pleasure to host Arturo Ortin Martinez in my laboratory in the department of Ocular Biology and Therapeutics at the Institute of Ophthalmology, University College London, UK, from the period of 1st July 2010 – 30 Sept 2010.

During his time with us, Arturo was involved in neuro-anatomical research projects to identify regions of the brain that are light activated by the melanopsin pathway. He was also investigating melanopsin cell numbers in the aging retina in normal and degenerating retinæ. These projects involved the competent use of techniques such as fluorescent immunohistochemistry and confocal microscopy.

Arturo is an extremely dedicated individual and took part in weekly laboratory meetings during his stay, completing his time with us by presenting his work to my lab group in his final weekly lab meeting.

With kind regards,

Professor Peter J. Coffey
Head of Ocular Biology & Therapeutics

UCL Institute of Ophthalmology
Ocular Biology & Therapeutics, 11-43 Bath Street, London EC1V 9EL
Tel: +44 (0)20 7608 4039 Fax: +44 (0)20 7608 6929
p.coffey@ucl.ac.uk
www.ucl.ac.uk/fo

Informe favorable del Dr. António Francisco Ambrósio del *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences* de la *University of Coimbra* en Portugal.



Prof. Manuel Vidal-Sanz
Departamento de Oftalmología
Facultad de Medicina, Universidad de Murcia
Campus Universitario de Espinardo
E-30100 Espinardo, Murcia, Spain
Fax: 868 883962. e.mail: manuel.vidal@um.es

March 16th, 2015

Re: Arturo ORTIN-MARTÍNEZ, Ph.D. Thesis Report

The thesis entitled "Análisis de la degeneración de los fotorreceptores en modelos experimentales de retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y glaucoma" presents the work accomplished by Arturo Ortín-Martínez, towards his Doctor of Philosophy degree within the Programme of Visual Science.

The experimental work has been done primarily in the rodent visual system, both in adult rats and mice. The thesis has the format of a collection of original manuscripts recently published in which Arturo Ortín-Martínez has played a major role as a first author or first co-author. In the first two papers, Arturo has worked out the methodology to allow a systematic and automatic quantitation of the L- and S-cone-photoreceptors, both in adult albino and pigmented rats, as well as in adult and albino pigmented mice. This work was done taking advantage of the immunohistochemical localization of the outer segments of these cone photoreceptors as well as of the methodologies recently developed by the Laboratory to count retinal neurons. The following three papers are based on the methodology developed in rats to study in three different models the effects of: i) inherited retinal degeneration (using the P23H-1 rat as a model); ii) focal lesion of the retina induced by a light emitting diode that produces a localized region of cone-degeneration in the superotemporal quadrant of the retina, where cone-photoreceptors present highest densities, and; iii) ocular hypertension induced by lasering the limbal tissues, on the survival of the retinal neurons in the ganglion cell layer (that is retinal ganglion cells and displaced amacrine cells) and in the outer layers of the retina (that is rods and L- and S-cone photoreceptors).

Arturo has developed great skill in a variety of modern neurobiological techniques, which include the induction of ocular hypertension using a laser beam to cauterize the episcleral and limbal veins, as well as a number of anatomical tracers to identify by retrograde axoplasmic transport the RGCs, immunocytochemical markers such as Brn3a, and L- and S-opsin to identify the populations of retinal ganglion cells, displaced amacrine cells as well as L- and S-cones.

This work by Arturo Ortín-Martínez appears published in several original publications in the following prestigious journals: i) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:3171-3182; ii) *PLoS ONE* 2014; 9(7) e102392; iii) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 5888-5900; iv) *PLoS ONE* 2014; 9(12): e113798; v) *Exp Eye Res* 2015; 132: 17-33. In addition, during his PhD training Arturo has contributed to a number of other important scientific communications that have also been published in a number of scientific journals.

Overall, the experimental work presented in this Thesis is of a very good quality, and **thus I do inform very favourably this work to obtain the Ph.D. Degree within the postgraduate program of Visual Sciences.**

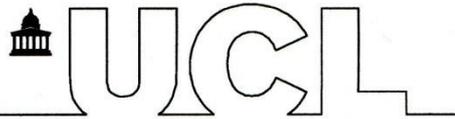
António Francisco Ambrósio, PhD
Principal Investigator
Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences - IBILI
Faculty of Medicine, University of Coimbra
Azinhaga de Santa Comba
3000-548 Coimbra
Portugal
Phone: +351 239480093 (ext: 15353)
Fax: +351 239480280
Mobile: +351 938312647

Azinhaga Santa Comba,
Celas
3000-548
COIMBRA

T: +351 239 480 200
F: +351 239 480 217
W: ibili.uc.pt
E: direccao@ibili.uc.pt

Informe Favorable de Dr. Anthony Vugler del *Institute of Ophthalmology* en el *University College of London* en Reino Unido.

UCL INSTITUTE OF OPHTHALMOLOGY



27 March 2015

Re: Arturo ORTÍN-MARTÍNEZ Ph.D. Thesis Report

The thesis entitled "**Análisis de la degeneración de los fotorreceptores en modelos experimentales de retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y glaucoma**" presents the work accomplished by Arturo ORTÍN-MARTÍNEZ, towards his Doctor of Philosophy degree in the Visual Sciences Programme.

This Thesis is presented as a series of published manuscripts in which Arturo played a pivotal role, leading the work accomplished in each one of the publications. In addition, there is a very informative and well-written general Introduction. There is also a nicely written chapter relating to the general conclusions of his work, which highlights the main novel findings of the experiments undertaken. Overall it is an excellent, well thought out and scholarly contribution to the Ph.D. degree. Experiments are performed on the visual system of adult rodents (rats and mice) and the work is presented as five independent original contributions. The first two are related to the characterization of the cone photoreceptor populations in adult albino / pigmented rats and adult albino / pigmented mice. These papers describe the normal situation in adult rodents, and constitute the anatomical basis for the three experimental papers that follow. The first of these experimental papers details changes that appear in the cone-photoreceptor mosaic in a model of inherited retinal degeneration (the P23-H1 rat) and the implications this has for rod-cone dependent survival. The second paper describes a new model in rodents of focal phototoxicity induced by a light emitting diode that results in circumscribed damage within the superotemporal region of the retina, where cone-photoreceptors are at their highest density. This is important because the pathology described by Arturo may mimic the findings in human age related macular degeneration. The third experimental paper relates to the long-term effects of laser-induced ocular hypertension on the innermost and outermost retinal layers, and shows that in addition to the selective retrograde degeneration of the Retinal ganglion cells within the ganglion cell layer of the retina, there is also a protracted and severe alteration to the outermost layers of the retina that includes the photoreceptors and their outer segments.

Arturo has mastered a number of difficult techniques to accomplish the objectives of his work (laser-induced ocular hypertension, retrograde neural tracing and immunohistochemistry to identify RGCs, S-cones and L-cones. All of these contributions have been published as separate original articles in prestigious ophthalmology journals: i) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:3171-3182; ii) *PLoS ONE* 2014; 9(7) e102392; iii) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 5888-5900; iv) *PLoS ONE* 2014; 9(12): e113798; v) *Exp Eye Res* 2015; 132: 17-33. It is my considered opinion that the experimental work presented in this Thesis is of truly EXCELLENT scientific quality and makes an important contribution to the field of visual neuroscience. **Thus, I unreservedly recommend this work to obtain the Ph.D. Degree in the postgraduate programme of Visual Sciences.**

Anthony Vugler Ph.D

Dr Anthony Vugler, Lecturer in Retinal Neurobiology, Ocular Biology and Therapeutics,
UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath Street, London EC1V 9EL
Tel: +44 (0)20 7608 4064. Email: a.vugler@ucl.ac.uk

Informe de los Directores de la Tesis Doctoral justificando su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones (1/2).



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Por este informe, se solicita a la Comisión General de Doctorado que la **Tesis Doctoral** titulada "**Análisis de la degeneración de los fotorreceptores en modelos experimentales de retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y glaucoma**" realizada por **Arturo Ortín Martínez**, para la obtención del título de Doctor en el programa de doctorado en Ciencias de la Visión, se autorice presentar bajo la modalidad de **compendio de publicaciones**. Durante el periodo de formación del Doctorando, su producción científica ha sido más que satisfactoria, habiendo publicado entre otros, cinco artículos como primer autor, en revistas con una excelente posición en el campo científico, todas ellas en el primer cuartil del Journal Citation Report (JCR), que además configuran una unidad científica como Tesis Doctoral.

Los artículos que se presentan son los siguientes:

Ortín-Martínez A*, Jiménez-López M*, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jun;51(6):3171-83. doi: 10.1167/iops.09-4861. Epub 2010 Jan 13. PubMed PMID: 20071667. **Impact factor:** 3.466; **Rank:** Ophthalmology: 5/56; Q1. (*First joint authors).

García-Ayuso D*, **Ortín-Martínez A***, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Aug 28;54(8):5888-900. doi: 10.1167/iops.13-12643. PubMed PMID: 23908186. **Impact factor:** 3.661; **Rank:** Ophthalmology: 6/58; Q1. (*First joint authors).

Ortín-Martínez A*, Nadal-Nicolás FM*, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.** *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392. eCollection 2014. PubMed PMID: 25029531; PubMed Central PMCID: PMC4100816. **Impact factor:** 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1. (*First joint authors).

Ortín-Martínez A*, Valiente-Soriano FJ*, García-Ayuso D, Alarcón Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. **A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.** *PLoS One.* 2014 Dec 2;9(12):e113798. doi: 10.1371/journal.pone.0113798. eCollection 2014. PubMed PMID: 25464513; PubMed Central PMCID: PMC4252057. **Impact factor:** 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1. (*First joint authors).

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica

Facultad de Medicina

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 887574 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

Informe de los Directores de la Tesis Doctoral justificando su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones (2/2).



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Ortín-Martínez A*, Salinas-Navarro M*, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Laser-induced ocularhypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.** *Exp Eye Res.* 2015 Mar;132:17-33. doi:10.1016/j.exer. 2015.01.006. Epub 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25576772. **Impact factor:** 3.015; **Rank:** Ophthalmology: 9/58; Q1. (*First joint authors).

Por todo lo anteriormente expuesto, bajo el criterio de los codirectores de esta Tesis, queda justificada la presentación del compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.

Manuel Vidal Sanz

Marta Agudo Barriuso

María Paz Villegas Pérez

Informe del Doctorado avalado por los Directores de las aportaciones a cada trabajo presentado (1/2).



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Por este informe, se solicita a la Comisión General de Doctorado que la **Tesis Doctoral** titulada "**Análisis de la degeneración de los fotorreceptores en modelos experimentales de retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y glaucoma**" para la obtención del título de Doctor en el programa de doctorado en Ciencias de la Visión se autorice presentar bajo la modalidad de **compendio de publicaciones**.

Mis aportaciones, en cada uno de los cinco artículos que se presenta que abajo se referencian y se adjuntan, han sido las de:

- Participación como autor principal en cada uno de los artículos
- Contribución a la concepción y diseño de los experimentos
- Desarrollo de los experimentos
- Análisis de los resultados
- Escritura del artículo

Los artículos que se presentan son los siguientes:

Ortín-Martínez A*, Jiménez-López M*, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jun;51(6):3171-83. doi: 10.1167/iops.09-4861. Epub 2010 Jan 13. PubMed PMID: 20071667. **Impact factor:** 3.466; **Rank:** Ophthalmology: 5/56; Q1. (*First joint authors).

García-Ayuso D*, **Ortín-Martínez A***, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Aug 28;54(8):5888-900. doi: 10.1167/iops.13-12643. PubMed PMID: 23908186. **Impact factor:** 3.661; **Rank:** Ophthalmology: 6/58; Q1. (*First joint authors).

Ortín-Martínez A*, Nadal-Nicolás FM*, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.** *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392. eCollection 2014. PubMed PMID: 25029531; PubMed Central PMCID: PMC4100816. **Impact factor:** 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1. (*First joint authors).

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

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 887574 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

Informe del Doctorando avalado por los Directores de las aportaciones a cada trabajo presentado (2/2).



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Ortín-Martínez A*, Valiente-Soriano FJ*, García-Ayuso D, Alarcón Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. **A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.** *PLoS One.* 2014 Dec 2;9(12):e113798. doi: 10.1371/journal.pone.0113798. eCollection 2014. PubMed PMID: 25464513; PubMed Central PMCID: PMC4252057. **Impact factor:** 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1. (*First joint authors).

Ortín-Martínez A*, Salinas-Navarro M*, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Laser-induced ocularhypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.** *Exp Eye Res.* 2015 Mar;132:17-33. doi:10.1016/j.exer. 2015.01.006. Epub 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25576772. **Impact factor:** 3.015; **Rank:** Ophthalmology: 9/58; Q1. (*First joint authors).

Por todo lo anteriormente expuesto y bajo el aval de los codirectores de esta Tesis, queda justificada la presentación del compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.

Arturo Ortín Martínez

Manuel Vidal Sanz

Marta Agudo Barriuso

María Paz Villegas Pérez

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (1/5).

23 de Febrero de 2015

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo Barriuso M. **Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jun;51(6):3171-83. doi: 10.1167/iops.09-4861. Epub 2010 Jan 13. PubMed PMID:20071667.

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Arturo Ortín Martínez presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Arturo Ortín Martínez como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.



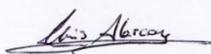
D. Manuel Jiménez López



D. Francisco Manuel Nadal Nicolás



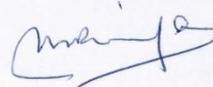
D. Manuel Salinas Navarro



D. Luis Alarcón Martínez



Mr. Yves Sauvé



Dña. María Paz Villegas Pérez



D. Manuel Vidal Sanz



Dña. Marta Agudo Barriuso

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (2/5).

23 de Febrero de 2015

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Aug 28;54(8):5888-900. doi: 10.1167/iovs.13-12643. PubMed PMID: 23908186.

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Arturo Ortín Martínez presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Arturo Ortín Martínez como autor principal de este artículo, junto con Don Diego García Ayuso, contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.



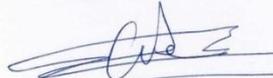
D. Diego García Ayuso



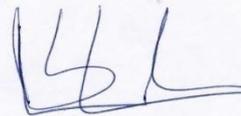
D. Manuel Jiménez López



Dña. Caridad Galindo Romero



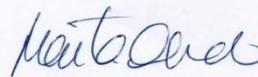
D. Nicolás Cuenca Navarro



Dña. Isabel Pinilla Lozano



D. Manuel Vidal Sanz



Dña. Marta Agudo Barriuso



Dña. María Paz Villegas Pérez

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (3/5).

23 de Febrero de 2015

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.** PLoS One. 2014 Jul 16;9(7):e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392. eCollection 2014. PubMed PMID: 25029531; PubMed Central PMCID: PMC4100816.

Declaran:

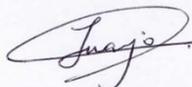
- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Arturo Ortín Martínez presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Arturo Ortín Martínez como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.



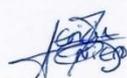
D. Francisco Manuel Nadal Nicolás



D. Manuel Jiménez López



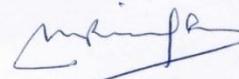
D. Juan José Albuquerque Béjar



Dña. Leticia Nieto López



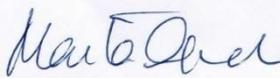
D. Diego García Ayuso



Dña. María Paz Villegas Pérez



D. Manuel Vidal Sanz



Dña. Marta Agudo Barriuso

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (4/5).

23 de Febrero de 2015

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. **A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.** PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e113798. doi: 10.1371/journal.pone.0113798. eCollection 2014. PubMed PMID: 25464513; PubMed Central PMCID: PMC4252057.

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Arturo Ortín Martínez presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Arturo Ortín Martínez como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.



D. Francisco Javier Valiente Soriano



Dña. Leticia Nieto López



D. Diego García Ayuso



D. Francisco Manuel Nadal Nicolás



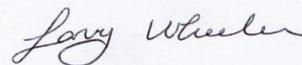
D. Luis Alarcón Martínez



Dña. María Paz Villegas Pérez



D. Manuel Jiménez López



Mr. Larry Wheeler



D. José Manuel Bernal Garro



D. Manuel Vidal Sanz

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (5/5).

23 de Febrero de 2015

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.** Exp Eye Res. 2015 Jan 7;132C:17-33. doi: 10.1016/j.exer.2015.01.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25576772.

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Arturo Ortín Martínez presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Arturo Ortín Martínez como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.



D. Manuel Salinas Navarro



D. Francisco Manuel Nadal Nicolás



D. Manuel Jiménez López



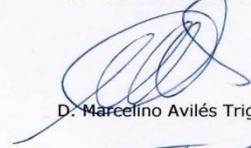
D. Francisco Javier Valiente Soriano



D. Diego García Ayuso



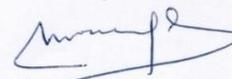
D. José Manuel Bernal Garro



D. Marcelino Avilés Trigueros



Dña. Marta Agudo Barriuso



Dña. María Paz Villegas Pérez



D. Manuel Vidal Sanz

HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

Las siguientes son observaciones originales recogidas de nuestros estudios sobre la distribución topográfica y cuantificación automática de la totalidad de los fotorreceptores tipo cono y el efecto de la degeneración retiniana hereditaria, la fototoxicidad focal y la hipertensión ocular en la población de fotorreceptores.

Contribuciones científicas:

Hemos desarrollado cuatro métodos automáticos diferentes de procesamiento de imágenes que nos ha permitido la cuantificación automática de la población total de conos-L y conos-S tanto en rata como en el ratón, y que nos ha capacitado para desarrollar mapas de isodensidad que representan la distribución topográfica de estos tipos celulares en la retina.

Hemos determinado el número total de conos-L, conos-S y conos duales en retinas de rata y de ratón, en cepas tanto albinas como pigmentadas.

Hemos determinado la distribución topográfica de los conos-L, conos-S y conos duales en ratas albinas y pigmentadas y ratones albinos y pigmentados.

Hemos documentado el paralelismo en la distribución de las poblaciones de conos-L y células ganglionares de retina en rata y ratón, tanto albinos como pigmentados, en las regiones de la retina que presentan una estría visual.

Hemos propuesto un método manual de conteo de las poblaciones de conos por muestreo, para la correcta inferencia de la población total de estos tipos celulares en retinas de ratón tanto albino como pigmentado.

Hemos descrito la relación espacio-temporal de la degeneración de bastones y conos en una cepa transgénica de rata que sufre la degeneración de fotorreceptores hereditaria, la rata P23H-1.

Hemos evidenciado que la pérdida de los bastones en la rata P23H-1 es rápida y afecta a toda la retina exceptuando a la extrema periferia, donde los bastones permanecen incluso 6 meses después del nacimiento.

Hemos demostrado que la degeneración de los fotorreceptores en la rata P23H-1 ocurre siguiendo un patrón espacial en anillos, siendo éstos más abundantes en la retina ecuatorial y de mayor tamaño en la hemirretina dorsal que en la ventral.

Hemos caracterizado el curso temporal de pérdida de los conos en la rata P23H-1 que comienza antes de 1 mes de edad y avanza de manera progresiva al menos hasta los 6 meses de edad.

Hemos desarrollado un nuevo modelo experimental, fiable, cuantificable y reproducible de inducción de degeneración focal de fotorreceptores en la estría visual de la rata albina, donde se concentran las mayores densidades de conos-L y CGR mediante la fototoxicidad producida por un LED de luz azul.

Hemos documentado que la utilización de la tomografía óptica de coherencia (SD-OCT) es eficaz para el estudio de la degeneración focal de los fotorreceptores en retinas de rata albina adulta, aportando datos morfológicos que nos informan sobre la progresión de la lesión *in vivo*.

Hemos evidenciado que la administración intravítrea de BDNF, PEDF o bFGF, así como la administración tópica de brimonidina, antes o después de la inducción de la degeneración por fototoxicidad, ejerce un efecto neuroprotector significativo en los conos.

Hemos demostrado que en el modelo de hipertensión ocular inducido mediante cauterización con laser de la malla trabecular y las venas perilimbales y epiesclerales, se produce una pérdida selectiva de las CGR en la capa de células ganglionares y que no progresa después de un mes.

En este modelo de hipertensión ocular hemos documentado la afectación de las capas externas de la retina, evaluando la pérdida de fotorreceptores y cuantificando esta pérdida a lo largo del tiempo en las dos poblaciones de conos.

Hemos identificado que tras la inducción de hipertensión ocular mediante este modelo, el patrón geográfico de la pérdida de conos es independiente al de las CGR, por lo que la pérdida de fotorreceptores está promovida por mecanismos adicionales de daño retiniano.

Publicaciones y comunicaciones en congresos.

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia los trabajos de investigación en los que he participado se han divulgado en las siguientes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos. Las señaladas con asteriscos (*) reflejan los trabajos en los que he participado como autor principal y las conforman el compendio de publicaciones de esta Tesis Doctoral se marcan con almohadilla (#).

Capítulos de libro.

Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, **Ortín-Martínez A**, Sánchez-Llerena S, Avilés-Trigueros M, M. Villegas-Pérez. (2010). ***Elevation of the intraocular pressure results in devastating damage to the retinal ganglion cell population in adult albino rats and mice.*** En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 21-26.

Ortín-Martínez A**, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. (2010). ***Cones Parallel the Distribution of Retinal Ganglion Cells in Albino and Pigmented Adult Rats. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 80-82.

Artículos.

Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, **Ortín-Martínez A**, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M.

Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice.

Mol Vis. 2009 Dec 5;15:2578-2598.

PubMed PMID: 20011633; PubMed Central PMCID: PMC2790482.

Impact factor: 2.541; **Rank:** Ophthalmology: 11/59; Q1.

*#**Ortín-Martínez A***, Jiménez-López M*, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruso M.

Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jun; 51(6):3171-3183.

doi: 10.1167/iops.09-4861. Epub 2010 Jan 13. PubMed PMID: 20071667.

Impact factor: 3.466; **Rank:** Ophthalmology: 5/56; Q1.

***First joint authors.**

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, **Ortín-Martínez A**, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov; 51(11):5690-5696.

doi: 10.1167/iops.10-5248. Epub 2010 Jun 10. PubMed PMID: 20538983.

Impact factor: 3.466; **Rank:** Ophthalmology: 5/56; Q1.

Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, **Ortín-Martínez A**, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma.

J Neuroinflammation. 2012 May 14; 9:92.

doi: 10.1186/1742-2094-9-92. PubMed PMID: 22583833; PubMed Central PMCID: PMC3410794.

Impact factor: 4.351; **Rank:** Neuroscience: 59/252; Q1.

#García-Ayuso D, **Ortín-Martínez A***, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruso M, Villegas-Pérez MP.

Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Aug 28;54(8):5888-5900.

doi: 10.1167/iops.13-12643. PubMed PMID: 23908186.

Impact factor: 3.661; **Rank:** Ophthalmology: 6/58; Q1.

***First joint authors.**

García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, **Ortín-Martínez A**, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Sectorial loss of retinal ganglion cells in inherited photoreceptor degeneration is due to RGC death.

Br J Ophthalmol. 2014 Mar;98(3):396-401.

doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303958. Epub 2013 Dec 10. PubMed PMID: 24326325; PubMed Central PMCID: PMC3933073.

Impact factor: 2.809; **Rank:** Ophthalmology: 10/58; Q1.

#Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM*, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.

PLoS One. 2014 Jul 16;9(7):e102392.

doi: 10.1371/journal.pone.0102392. eCollection 2014. PubMed PMID: 25029531; PubMed Central PMCID: PMC4100816.

Impact factor: 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1.

***First joint authors.**

Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D*, **Ortín-Martínez A***, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M.

Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: Evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina.

Front Neuroanat. 2014 Nov 20;8:131.

doi: 10.3389/fnana.2014.00131. eCollection 2014. PubMed PMID: 25477787; PubMed Central PMCID: PMC4238377.

Impact factor: 4.176; **Rank:** Neuroscience: 68/252; Q2. Anatomy and Morphology: 3/20; Q1.

***First joint authors.**

#Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ*, García-Ayuso D, Alarcón Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M.

A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.

PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e113798.

doi: 10.1371/journal.pone.0113798. eCollection 2014. PubMed PMID: 25464513; PubMed Central PMCID: PMC4252057.

Impact factor: 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1.

***First joint authors.**

Vugler A, Semo M, **Ortín-Martínez A**, Rojanasakul A, Nommiste B, Valiente Soriano FJ, García-Ayuso D, Coffey P, Vidal-Sanz M, Gias C.

A role for the outer retina in development of the intrinsic pupillary light reflex in mice.

Neuroscience. 2015 Feb 12;286:60-78.

doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.044. Epub 2014 Nov 26. PubMed PMID: 25433236.

Impact factor: 3.327; **Rank:** Neuroscience: 104/252; Q2.

#Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M*, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.

Exp Eye Res. 2015 Mar;132:17-33.

doi: 10.1016/j.exer.2015.01.006. Epub 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25576772.

Impact factor: 3.015; **Rank:** Ophthalmology: 9/58; Q1.

***First joint authors.**

Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, **Ortín-Martínez A**, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice.

PLoS One. 2015 Mar 26;10(3):e0121134.

doi:10.1371/journal.pone.0121134. eCollection 2015. PubMed PMID: 25811653.

Impact factor: 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1.

Vidal-Sanz M, Valiente-Soriano FJ*, **Ortín-Martínez A***, Nadal-Nicolás FM*, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP.

Retinal neurodegeneration in experimental glaucoma.

Prog Brain Res. 2015. *Submitted*.

Impact factor: 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1.

Nadal-Nicolás FM, Madeira MH, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, **Ortín-Martínez A**, Santiago AR, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Transient downregulation of melanopsin expression after retrograde tracing or optic nerve injury in adult rats.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015. *Submitted*.

Impact factor: 3.534; **Rank:** Multidisciplinary Sciences: 8/55; Q1.

Contribuciones a congresos.

Nacionales:

***Autores:** A. ORTÍN-MARTINEZ.

Título: "La investigación en Enfermería".

Tipo de participación: Conferencia.

Congreso: Jornadas de Investigación en Enfermería. XX Aniversario de la Facultad de Enfermería de la Universidad de Murcia.

Lugar celebración: Murcia, España.

Fecha: Octubre, 2011.

***Autores:** ORTÍN-MARTINEZ A, Nadal-Nicolás F, Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, Alburquerque-Béjar JJ, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M.

Título: Estudio cuantitativo y topográfico de la degeneración tardía de los fotorreceptores en un modelo de hipertensión ocular en mamífero adulto.

Tipo de participación: Conferencia.

Congreso: I Reunión de la Sociedad Gallega de Optometría Clínica.

Lugar celebración: Santiago de Compostela, España.

Fecha: Octubre, 2012.

Internacionales:

Autores: Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Alarcón-Martínez L, Cánovas I, Bernal JM, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M.

Título: Effects of Elevated Intraocular Pressure on the Retinal Ganglion Cell Population in Adult Pigmented Mice.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008 49: E-Abstract 5480.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2008.

Autores: Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Cánovas-Martínez I, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Effects of Elevated Intraocular Pressure on the Retinotectal Projection in Adult Pigmented Mice.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009 50: E-Abstract 2779.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2009.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Nieto-López L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Automatic Quantification of the Total Number of S and M/L Cones and Their Detailed Topography in Albino and Pigmented Adult Rats.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51. E-Abstract. 5946.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2010.

*Poster seleccionado para exposición multimedia online durante un mes en la página web de la Association for Research in Vision and Ophthalmology.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás F, Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano F, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Parallel Distribution of retinal ganglion cells and L Cones in Albino and Pigmented Adult Rats.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Vision Research Conference.

Publicación: http://www.visionresearch-conference.elsevier.com/pdf/poster_program.pdf

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2010.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Nieto-López L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Whole number and retinal topography of S, L and dual cones in retinas of albino and pigmented adult rats.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Federation of European Neurosciences Societies Forum.

Publicación: FENS Abstr. Vol 5, 019.30,2010 014.27.

Lugar celebración: Ámsterdam, The Netherlands.

Fecha: Julio, 2010.

Autores: García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Título: P23H rhodopsin mutation results in delayed retinal ganglion cell death.

Tipo de participación: Poster.

Congreso: Annual Vision Research Conference.

Publicación: http://www.visionresearch-conference.elsevier.com/pdf/poster_program.pdf

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2010.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Whole number and retinal topography of S, L and dual cones in albino and pigmented adult rats.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2010; 44: 70-71.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Junio, 2010.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, García-Ayuso D, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Coffey P, Vugler AA, Vidal-Sanz M, Semo M.

Título: Population Of Melanopsin-expressing Retinal Ganglion Cells In Aging Wildtype And Rodless/coneless Mice: A Detailed Quantitative And Topographical Analysis.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. E-Abstract. 3466

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2011.

*Poster seleccionado para exposición multimedia online durante un mes en la página web de la Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Autores: Garcia-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Agudo-Barriuso M, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Título: Cone Degeneration In A Model Of Hereditary Rod Degeneration: The P23H Rat.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. E-Abstract. 4338.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2011.

Autores: Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Semo M, Jiménez-López M, Gias C, Villegas-Pérez MP, Coffey P, Vidal-Sanz M, Vugler AA.

Título: Patterns Of Light-mediated C-fos Activity In The Medial Visual Cortex Of Mice Lacking Both Rods And Cones.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. E-Abstract. 3464.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2011.

*Poster seleccionado para exposición multimedia online durante un mes en la página web de la Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Autores: Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Nieto-López L, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, García-Ayuso D, Galindo-Romero C, Agudo Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Shortly After Ocular Hypertension There Is Loss Of Retinal Ganglion Cells, But Not Of Other Cells Of The Ganglion Cell Layer Of The Retina.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. E-Abstract. 2459.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2011.

Autores: Nadal-Nicolás F, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Nieto-López L, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Galindo-Romero C, Sánchez-Migallón MC, García-Ayuso D, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Whole number and spatial distribution of Brn3c and Brn3b positive retinal ganglion cells in the adult rat retina.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:246.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

Autores: Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, López-Nieto L, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Galindo-Romero C, Valiente F, Sánchez-Migallón MC, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Ocular Hypertension Induces in the Ganglion Cell Layer of Adult Albino Rats Specific Retinal Ganglion Cell Loss.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:251.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

*Poster galardonado con la Mención de Honor a la mejor Comunicación Oral Breve.

Autores: Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Ma'ayan Semo, Jiménez-López M, Gias C, Nommiste B, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Coffey P, Vidal-Sanz M, Vugler AA.

Título: Study of light-mediated C-fos activity in the medial visual cortex and the retrosplenial cortex of mice lacking rods and cones.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:254.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

Autores: Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Sánchez-Migallón MC, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M.

Título: Effect of brain-derived neurotrophic factor on the survival of axotomized retinal ganglion cells in the adult pigmented mice.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:236.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

Autores: Gallego BI, Salazar JJ, De Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

Título: MHC-II Changes in the Glia of Contralateral Mice Refine to Experimental Glaucoma.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:237.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

Autores: García-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Agudo-Barruso M, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Galindo-Romero C, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Título: Degeneration of Rods and Cones In The P23H Rat.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:238.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nadal-Nicolás FM, Sánchez-Migallón MC, Salinas-Navarro M, Agudo-Barruso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Characterization of a focal model of photoreceptor degeneration induced by phototoxicity.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Congreso Internacional SIRCOVA.

Publicación: Ophthalmic Res 2011 46:247.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2011.

Autores: Rojas B, de Hoz R, Salazar J, Ramírez A, Gallego B, Ramírez J, Salinas-Navarro M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Triviño A.

Título: Quantification of GFAP and NF-200+ retinal ganglionic cells in contralateral mice retina to experimental glaucoma.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: European Association for Vision and Eye Research.

Publicación: Acta Ophthalmologica, 89: 0. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.2133.x

Lugar celebración: Viena, Austria.

Fecha: Diciembre, 2011.

Autores: García-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Agudo-Barruso M, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Título: Cambios morfológicos y de distribución espacial de los fotorreceptores en un modelo animal de retinosis pigmentaria.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: OPTOM2012: 22 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica.

Lugar celebración: Madrid, España.

Fecha: Febrero, 2012.

Autores: Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Galindo-Romero C, Nieto-López L, Agudo-Barruso M, Sobrado-Calvo P.

Título: Análisis descriptivo y cuantitativo del daltonismo en una población mediante Test de Farnsworth D-15

Tipo de participación: Electronic Poster.

Congreso: OPTOM2012: 22 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica.

Lugar celebración: Madrid, España.

Fecha: Febrero, 2012.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, Albuquerque-Béjar JJ, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M.

Título: Ocular Hypertension In The Adult Rat Retina Results In Protracted Loss Of S- And L-cones.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. Vol. 53, 2488-2488.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2012.

Autores: Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Nieto-López L, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Galindo-Romero C, Sánchez-Migallón MC, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M,

Título: Whole Number And Spatial Distribution Of The Pou4f Family Of Transcription Factors In The Adult Rat Retina.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. Vol. 53, 6562-6562.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2012.

Autores: Ramírez JM, de Hoz R, Salazar JJ, Ramírez AI, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Villegas-Pérez MP, Triviño A.

Título: IOP Induces Changes In The GFAP-Labelled Retinal Area But Not In Astrocyte Number In Mice Refina Contralateral To Experimental Glaucoma.

Tipo de participación: Póster

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. Vol. 53, 2025-2025.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2012.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, Albuquerque-Béjar JJ, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M.

Título: Ocular Hypertension In The Adult Rat Retina Results In Protracted Loss Of S- And L-cones.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: Pan-American Research Day 2012.

Publicación: Pan-American Research Day 2012 Programme. Vol.1, 7-7.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2012.

Autores: Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Nieto-López L, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Galindo-Romero C, Sánchez-Migallón MC, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Whole Number And Spatial Distribution Of The Pou4f Family Of Transcription Factors In The Adult Rat Retina.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: Pan-American Research Day 2012.

Publicación: Pan-American Research Day 2012 Programme. Vol.1, 8-8.

Lugar celebración: Fort Lauderdale, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2012.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Total Number and Spatial Distribution of Mouse Cones.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 8th Fens Forum of Neuroscience.

Publicación: Fens Forum of Neuroscience Programme. Vol.1, 259-259.

<http://ebooks.ekconnect.co/FENS%20Forum%202012%20Programme%20Book/>

Lugar celebración: Barcelona, Cataluña, España.

Fecha: Julio, 2012.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Phototoxicity Induced by a Single LED Emitting Diode (LED) Results in Focal Loss of S- and L/M-Cones. Neuroprotection with Brimonidine.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research.

Publicación: XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research Abstract Book. Vol 1, 267-267.

http://iser.ekonnect.co/ISER_250/poster_38736/program.aspx

Lugar celebración: Berlin, Berlin, Germany.

Fecha: Julio, 2012.

Autores: Vidal-Sanz M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, García-Ayuso D, Agudo-Barruso M, Villegas-Pérez MP.

Título: Methods to evaluate neuroprotection against injury-induced retinal degeneration.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research.

Publicación: XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research Abstract Book. Vol 1, 97-97.

http://iser.ekonnect.co/ISER_250/poster_38562/program.aspx

Lugar celebración: Berlin, Berlin, Germany.

Fecha: Julio, 2012.

Autores: Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barruso M, Villegas-Pérez MP.

Título: Retinal neuronal death caused by ocular hypertension.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: European Association for Vision and Eye Research.

Publicación: Acta Ophthalmologica, 90: 0. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.3233.x.

Lugar celebración: Nice, France.

Fecha: Octubre, 2012.

#Autores: Villegas-Pérez MP, García-Ayuso D, Marco-Gomariz MA, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Agudo-Barruso M, Vidal-Sanz M.

Título: Optic Nerve Degeneration in Inherited or Light-Induced Photoreceptor Degeneration.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: ARVO Optic Nerve Degeneration and Ageing.

Publicación: ARVO Optic Nerve Degeneration and Ageing Abstract Book. Vol. 1, 35-35

Lugar celebración: Obergurgl, Tirol, Austria.

Fecha: Diciembre, 2012.

#Autores: Vidal-Sanz M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barruso M, Villegas-Pérez MP.

Título: Effect of IOP Elevation on Inner and Outer Retina.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: ARVO Optic Nerve Degeneration and Ageing.

Publicación: ARVO Optic Nerve Degeneration and Ageing Abstract Book. Vol. 1, 25-25

Lugar celebración: Obergurgl, Tirol, Austria.

Fecha: Diciembre, 2012.

#Autores: García-Ayuso D, Jiménez-López M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Título: Automatic analysis of the rings of cone degeneration in the P23H rat.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: SIRCOVA 2013.

Publicación: Ophthalmic Res 2013; 50:27–53. 50, pp. 39. Krager, 2013.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Junio, 2013.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Total number and spatial distribution of mouse cones.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: SIRCOVA 2013.

Publicación: Ophthalmic Res 2013; 50:27–53. 50, pp. 40. Krager, 2013.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Junio, 2013.

Autores: Vidal-Sanz M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso, Villegas-Pérez MP.

Título: Modern tools to assess neuroprotection in the retina.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: European Retina Meeting 2013.

Publicación: ERM Program <http://www.retinameeting.eu/content/ERM2013/ERM%202013%20PROGRAM.pdf> 1:24.

Lugar celebración: Alicante, España.

Fecha: Octubre, 2013.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Alburquerque-Béjar JJ, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Título: Number and topology of cone photoreceptors in mice: differences between pigmented and albino strains.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: European Retina Meeting 2013.

Publicación: ERM Program <http://www.retinameeting.eu/content/ERM2013/ERM%202013%20PROGRAM.pdf> 1:58.

Lugar celebración: Alicante, España.

Fecha: Octubre, 2013.

Autores: Vidal-Sanz M, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Nadal-Nicolás F, Jimenez-Lopez M, Alburquerque-Bejar J, Nieto-Lopez L, Villegas-Perez MP, Agudo M.

Título: Differences in cone type proportions and distribution between pigmented and albino strains of adult mice.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO)

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54. E-Abstract 4366.

Lugar celebración: Orlando, Florida. USA

Fecha: Mayo, 2014.

Autores: Valiente-Soriano FJ, ORTÍN-MARTÍNEZ A, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Characterization of a new model of focal cone degeneration induced by a Light-emitting-diode (LED).

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54. E-Abstract. 4368.

Lugar celebración: Orlando, Florida. USA.

Fecha: Mayo, 2014.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Cone europrotection afforded by Brimonidine and BDNF in a new model of focal Light-Emitting-Diode (LED)-induced phototoxicity.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO).

Publicación: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54. E-Abstract. 4369.

Lugar celebración: Orlando, Florida. USA.

Fecha: Mayo, 2014.

Autores: Valiente-Soriano FJ, ORTÍN-MARTÍNEZ A, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Characterization of a new model of focal cone degeneration induced by a Light-emitting-diode (LED).

Tipo de participación: Conference.

Congreso: Pan-American Research Day 2014.

Publicación: Pan-American Research Day 2014 Programme. Vol.1, 5-5.

Lugar celebración: Orlando, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2014.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Cone europrotection afforded by Brimonidine and BDNF in a new model of focal Light-Emitting-Diode (LED)-induced phototoxicity.

Tipo de participación: Conference

Congreso: Pan-American Research Day 2014

Publicación: Pan-American Research Day 2014 Programme. Vol.1, 3-3.

Lugar celebración: Orlando, Florida, USA.

Fecha: Mayo, 2014.

Autores: Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, ORTÍN-MARTÍNEZ A, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M.

Título: ipRGC Population in Pigmented and Albino Mice

Tipo de participación: Conference

Congreso: SIRCOVA-OFTARED-RIG 2014.

Publicación: Ophthalmic Res 2014;52:175-197.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2014.

***Autores:** ORTÍN-MARTÍNEZ A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Título: Cone-Photoreceptor Neuroprotection by Brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF in a Novel in Vivo Model of Focal Light Emitting Diode-Induced Phototoxicity in Adult Albino Rats.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: SIRCOVA-OFTARED-RIG 2014

Publicación: Ophthalmic Res 2014;52:175-197.

Lugar celebración: Valencia, España.

Fecha: Noviembre, 2014.

Autores: Madeira MH, Orfin-Martinez A, Nadal-Nicolas FM, Agudo-Barruso M, Vidal-Sanz M, Ambrósio AF, Santiago AR.

Título: Caffeine attenuates neuroinflammatory response and retinal ganglion cell loss in an ocular hypertension animal model.

Tipo de participación: Conference.

Congreso: XII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease.

Publicación: submitted.

Lugar celebración: Bilbao, España.

Fecha: Julio, 2015.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMD:** *Aging macular degeneration.*
- ARNm:** Ácido ribonucleic mensajero.
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro. *Brain-derived neurotrophic factor.*
- bFGF:** Factor básico del crecimiento fibroblástico. *Basic fibroblast growth factor.*
- CGR:** Células ganglionares de retina.
- CNE:** Capa nuclear externa.
- CNI:** Capa nuclear interna.
- CNTF:** Factor neurotrófico ciliar. *Ciliary neurotrophic factor.*
- CPE:** Capa plexiforme externa.
- CPI:** Capa plexiforme interna.
- CS:** Colículo superior.
- DAPI:** 4',6-diamidina-2-fenilindol.
- DBA:** *Diluted brown non-agouti.*
- DMAE:** Degeneración asociada a la edad.
- DTMR:** Dextrano tetrametil-rodamina.
- EP:** Epitelio pigmentario.
- ERG:** Electroretinograma.
- FG:** Fluorogold.
- GON:** *Glaucomatous optic neuropathy.*
- HE:** Hematoxilina – eosina. *Hematoxylin - eosin.*
- HRP:** Peroxidasa de rábano.
- HTO:** Hipertensión ocular.
- LED:** *Light emitting diode.*
- LIP:** *LED-induced phototoxicity.*
- NGL:** Núcleo geniculado lateral.
- OCT:** Tomografía de coherencia óptica. *Optic coherence tomography.*
- OHSt:** Hidroxistilbamidina metano-sulfonato.
- OHT:** *Ocular hypertension.*
- ORL:** *Outer retinal layers.*

- PEDF:** Factor derivado del epitelio pigmentario. *Pigment epithelium-derived factor.*
- PIO:** Presión intraocular.
- PVG:** *Piebald Voril Glaxo.*
- RGC:** *Retinal ganglion cells.*
- RP:** Retinosis pigmentaria. *Retinitis pigmentosa.*
- SD:** *Sprague-Dawley.*
- SNC:** Sistema nervioso central.

1 RESUMEN.

Objetivo.

Determinar el número total y la topografía de la población de conos en dos cepas de rata y dos de ratón utilizando rutinas automatizadas que nos permita investigar objetivamente los efectos de diferentes modelos experimentales de patologías humanas tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinosis pigmentaria (RP) y la neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) sobre la población de fotorreceptores.

Material y métodos.

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado un total de 303 ratas y 23 ratones. Se han utilizado cinco cepas distintas de roedores: Sprague-Dawley (SD), Piebald Virol Glaxo (PVG) y la rata transgénica P23H-1, y ratones Swiss y C57/BL6. Todos los experimentos y procedimientos se han realizado bajo el estricto cumplimiento de las recomendaciones de la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)" y la "European Union guidelines for the use of animals in research", y todos los procedimientos utilizados han sido previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia.

Se han utilizado diferentes técnicas para el estudio histológico y morfológico como la identificación mediante inmunohistofluorescencia de los tres tipos de fotorreceptores presentes en roedores además de otras poblaciones celulares retinianas, y se han analizado en retinas montadas a plano, en secciones transversales, mediante tinciones clásicas como la HE; se han utilizado tecnologías de imagen avanzadas como la *Spectral Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT)* y se ha realizado análisis de proteínas mediante *Western Blot*.

Como modelo de RP se ha utilizado la rata transgénica P23H-1, esta rata es portadora de una mutación autosómica dominante en el gen de la rodopsina (la sustitución de prolina en vez de histidina en el codón 23 de la rodopsina) que causa distrofia y muerte de los fotorreceptores. Se ha desarrollado un nuevo modelo experimental útil para la comprensión de la patología de la DMAE, la fototoxicidad de los fotorreceptores tipo cono inducida por LED (FTIL). La exposición de luz azul de un LED sobre la retina de rata provoca un daño localizado en el área de máxima densidad de conos-L y con un ratio de conos-bastones similar al de la macula humana. Por último se ha utilizado un modelo experimental recientemente desarrollado en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia de hipertensión ocular (HTO) inducida mediante láser que permite la evaluación de los efectos de la NOG sobre la población de fotorreceptores.

Resultados.

El número medio de conos que expresan la opsina-L es de 231.736 ± 14.517 en la rata SD; 239.939 ± 6.494 en la rata PVG; 117.424 ± 17.721 en el ratón Swiss y 135.155 ± 8.742 en el ratón C57/BL6. El número medio de conos que expresan la opsina-S es de 41.028 ± 5.074 en la rata SD; 27.316 ± 2.235 en la rata PVG; 146.682 ± 24.958 en ratones Swiss y 119.616 ± 8.756 en ratones C57/BL6. El porcentaje de conos duales en la rata SD es del 3,2%, del 2,9% en la PVG, de un 73% en el ratón Swiss y de un 40% en el C57/BL6.

En todas las cepas de ambas especies existe un paralelismo en la distribución de las células ganglionares de retina (CGR) y los conos-L. La topografía de los conos-L en todas las cepas de rata y ratón analizadas es similar, se observan zonas de alta densidad en el eje nasotemporal superior, las densidades medias alrededor del nervio óptico y un descenso de densidad gradual desde las zonas centrales hacia las periféricas. Sin embargo, existen claras diferencias en la distribución de los conos-S entre las especies y cepas analizadas. Mientras que en las dos cepas de rata existe un gradiente creciente de densidad de los conos-S hacia el cuadrante nasotemporal y las zonas de mayor densidad se encuentran en la extrema periferia, en el ratón Swiss los conos-S son abundantes en la retina dorsal aunque la zona de alta densidad se encuentre en la retina ventral, pero el ratón C57/BL6 muestra un número muy bajo de conos-S en la zona dorsal de la retina y una población muy densa en la retina ventral, apareciendo la densidad mayor en la parte nasal.

El la rata P23H-1, la degeneración de los bastones ocurre antes que la de los conos y de forma rápida: primero con el acortamiento de los segmentos externos, a P30 existe una gran pérdida de bastones y a P180 la pérdida es prácticamente en la totalidad de la retina exceptuando la extrema periferia. El número de conos-L en todas las edades analizadas es menor en las ratas P23H-1 que en las SD controles y desciende significativamente con la edad (P180). La degeneración de bastones y conos está espaciotemporalmente relacionada, ocurre en forma de anillos que aparecen alrededor de P90 y se extiende por toda la retina. A P180, los anillos de degeneración son más abundantes en la retina ecuatorial y de mayor tamaño en la retina dorsal.

En un nuevo modelo *in vivo* de fototoxicidad focal de los fotorreceptores inducido por LED, la SD-OCT muestra un daño en una región circular situado en la retina superotemporal cuyo diámetro varía desde $1.842,4 \pm 84,5$ mm (24 h) hasta $1.407,7 \pm 52,8$ mm (7 d). En esta región se observa una disminución progresiva del espesor de la retina desde $183,4 \pm 5$ mm (12 h) hasta $114,6 \pm 6$ mm (7 d). Las secciones transversales muestran una pérdida masiva de bastones y conos en la región dañada por la luz. En las retinas montadas a plano se observa una región circular con disminución del número de conos-L y conos-S. En este área circular (de radio de 1 mm o 1.3 mm respectivamente) en las retinas izquierdas y en la región correspondiente de la retina control derecha, el número total de conos-L o conos-S es de 7.118 ± 842 ó 661 ± 125 en las retinas fotoexpuestas (n=7) y de 14.040 ± 1.860 ó 2.255 ± 193 en las retinas control (n=7), respectivamente. Aunque el CNTF no, la brimonidina, el BDNF, PEDF y el bFGF muestran efectos neuroprotectores significativos sobre los conos-L y conos-S.

La HTO provoca sectores con su vértice en el disco óptico carentes de CGR Brn3a pero que aún contienen gran número de núcleos DAPI positivos. Los niveles de todas las opsinas disminuyen a las 2 semanas y esta disminución progresa hasta el 20% de los niveles basales a los 3 meses. Las secciones transversales revelan áreas focales de degeneración en las capas externas de la retina (CER). Las CGR supervivientes a los 15 días representan aproximadamente el 28% y no cambian con el tiempo, mientras que de las poblaciones de conos-L y conos-S sobreviven un 80% y un 65% a un mes o un 35% y un 20% a 6 meses, respectivamente.

Conclusiones.

Se ha establecido, por primera vez, el número total y la distribución topográfica de los conos-L y conos-S en dos cepas de rata y dos de ratón y se ha demostrado el paralelismo topológico de la distribución de los conos-L y las CGR. Se han proporcionado las bases para estudiar la degeneración de conos y su prevención en condiciones patológicas.

Se ha descrito por primera vez que, en la rata P23H-1, la degeneración de bastones y conos está espaciotemporalmente relacionada y se produce en anillos. La pérdida de conos sigue a la pérdida de bastones, que comienza de forma temprana, incluso antes de P30, la primera edad analizada. Las características de los anillos sugieren que la degeneración secundaria de conos está influenciada por la localización en la retina y / u otros factores intrínsecos o extrínsecos.

Se ha evidenciado que la FTIL provoca una pérdida de conos y bastones y es un modelo fiable, cuantificable y reproducible para estudiar la degeneración de los fotorreceptores. La administración intravítrea de BDNF, PEDF o bFGF, o la administración tópica de brimonidina proporcionan neuroprotección significativa sobre los conos, en este modelo.

Se ha demostrado que la HTO induce una pérdida selectiva de CGR en la capa de la CGR que no progresa después de 1 mes, mientras que los conos-L y conos-S presentan una pérdida progresiva hasta los 6 meses. Por lo tanto, HTO provoca graves daños tanto en las capas más internas como en las CER.

2 SUMMARY.

Purpose.

To determine the total number and topography of the cone population in two rat and two mouse strains using automated routines which allowed us to investigate objectively the effects of different experimental models of human pathologies such as Aging Macular Degeneration (AMD), Retinitis Pigmentosa (RP) and Glaucomatous Optic Neuropathy (GON) on the photoreceptor population.

Material y methods.

A total of 303 rats and 23 mice were used in this thesis, five different strains of rodents were used: albino Sprague-Dawley (SD), pigmented Piebald Virol Glaxo (PVG) and P23H-1 transgenic rats, albino Swiss and pigmented C57/BL6 mice. All experimets and procedures were carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) and the European Union guidelines for the use of animals in research, and all the protocols were approved by the Ethical and Animal Studies Committee of the University of Murcia.

Several techniques such as, the identification of the three different types of photoreceptors and other retinal populations by immunohistofluorescence analyzed in whole flat-mounted retinas and in oriented radial sections, classical staining as H-E, imaging advanced technologies as Spectral Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT), and protein analysis by western blot, have been used.

In this thesis the P23H-1transgenic rat has been used as a model of RP, this animal bears an autoasomal dominat mutation in the rhodopsin gene (proline to histidine substitution at codon 23 of the rodopsin protein) that causes photoreceptor dystrophy and death. A new experimental model useful to understand the AMD pathology, has been developed for this thesis, Light Emmitting Dioede (LED)-induced cone-photoreceptor phototoxicity (LIP), the blue-light LED exposition on the rat retina causes a damage-area located in the retinal zone with maximun L-cones densities and a cone to rod ratio similar to the human macular fovea. And finally, an experimental model of Laser-induced ocular hypertension developed recently in our Laboratory of Experimental Ophthalmology at the University of Murcia has been used to understand the effects of GON on the cone population.

Results.

The mean number of L-opsin⁺cones is $231,736 \pm 14,517$ in SD rat; $239,939 \pm 6,494$ in PVG rat; $117,424 \pm 17,721$ in Swiss mouse and $135,155 \pm 8,742$ in C57/BL6 mouse. The mean number of S-opsin⁺cones $41,028 \pm 5,074$ in SD rat; $27,316 \pm 2,235$ in PVG rat; $146,682 \pm 24,958$ in Swiss mouse and $119,616 \pm 8,756$ in C57/BL6 mouse. The percentage of dual cones is 3.2% in SD rat; 2.9% in PVG rat; 73% in Swiss mouse and 40% in C57/BL6 mouse. In all strains, and both species, there is a parallel distribution of retinal ganglion cells (RGC) and L-cones. The topography of L-cones is similar in all strains of rats and mice analyzed, the highest densities are observed in the superior nasotemporal axis, medium densities around the optic nerve, and this density gradually decreases from the center to the periphery. However, obvious differences are found in S-cones distribution. While in the two rat strains there is a increasing gradient of S-cones density along the inferonasal quadrant and the highest densities are found in the retinal rim, in the Swiss mouse strains S-cones are abundant in the dorsal retina although

their highest densities are ventral but the C57/BL6 mouse shows a low number of S-cones in the dorsal retina and very dense population in the ventral retina, being densest in its nasal aspect.

In P23H-1 rats, rod degeneration occurs rapidly: first the rod outer segment shortens, at P30 there is extensive rod loss, and by P180 rod loss is almost complete except for the most peripheral retina. The numbers of L cones are, at all postnatal ages, lower in P23H-1 rats than in control SD rats, and decrease significantly with age (by P180). Rod and cone degeneration is spatiotemporally related and occurs in rings that appear already at P90 and spread throughout the entire retina. At P180, the rings of rod-cone degeneration are more abundant in the equatorial retina and are larger in the dorsal retina.

In a novel *in vivo* model of focal LED-induced photoreceptor phototoxicity SD-OCT showed damage in a circular region of the superotemporal retina, whose diameter varied from $1,842.4 \pm 84.5$ μ m (at 24 hours) to $1,407.7 \pm 52.8$ μ m (at 7 days). This region had a progressive thickness diminution from 183.4 ± 5 μ m (at 12 h) to 114.6 ± 6 μ m (at 7 d). Oriented cross-sections showed within the light-damaged region of the retina massive loss of rods and cone-photoreceptors. Wholmounts documented a circular region containing lower numbers of L- and S-cones. Within a circular area (1 mm or 1.3 mm radius, respectively) in the left and in its corresponding region of the contralateral-fellow-retina, total L- or S-cones were $7,118 \pm 842$ or 661 ± 125 for the LED exposed retinas (n=7) and $14,040 \pm 1,860$ or $2,255 \pm 193$ for the fellow retinas (n=7), respectively. Brimonidine, BDNF, PEDF and bFGF but not CNTF showed significant neuroprotective effects on L- and S-cones.

Ocular hypertension (OHT) resulted in wedge-like sectors with their apex on the optic disc devoid of Brn3aRGC but with large numbers of DAPI+nuclei. The levels of all opsins diminished by 2 weeks and further decreased to 20% of basal-levels by 3 months. Cross-sections revealed focal areas of outer retinal layers (ORL) degeneration. RGC survival at 15 days represented approximately 28% and did not change with time, whereas the L-cone and S- populations diminished to 80% and 65%, or to 35% and 20% at 1 or 6 months, respectively.

Conclusions.

It has been established, for the first time, the total number and the topographical distribution of S- and L-cones in two rat and two mouse strains and demonstrated the correlation of L-cones and RGC spatial distribution. It has been provided the basis to study cone degeneration and its prevention in pathologic conditions.

It has been described for the first time that in the P23H-1 rat, rod and cone degeneration is spatiotemporally related and occurs in rings. Cone loss follows rod loss and starts very soon, even before P30, the first age analyzed here. The characteristics of the rings suggest that secondary cone degeneration is influenced by retinal position and/or other intrinsic or extrinsic factors.

It has been evidenced that LIP results in rod and cone-photoreceptor loss, and is a reliable, quantifiable model to study cone-photoreceptor degeneration. Intravitreal BDNF, PEDF or bFGF, or topical BMD afford significant cone neuroprotection in this model.

It has been demonstrated that OHT induces in the ganglion cell layer selective RGC loss that does not progress after 1 month, whereas the S- and L-cones exhibit progressive loss up to 6 months. Thus, OHT results in severe damage to both the innermost and the ORL.

3 INTRODUCCIÓN.

3.1 La retina en el sistema nervioso central.

La retina, a la que Don Santiago Ramón y Cajal se refería como "...una extensión periférica del sistema nervioso central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico..." (*Ramón y Cajal, 1892*), se encuentra alojada en el globo ocular y es la estructura del sistema nervioso central (SNC) que se encarga de convertir la luz en una señal eléctrica y además comienza el proceso de la información luminosa. La sensibilidad de la retina es tal que permite ver en condiciones de luminosidad que oscilan desde la luz de las estrellas a la luz solar, discrimina longitudes de onda de modo que podemos ver los colores, y es lo suficientemente precisa como para que podamos detectar un pelo humano o una mota de polvo a varios metros de distancia (*Hubel, 2000*).

3.1.1 El Sistema Visual.

La vía visual y, de manera particular, la corteza visual primaria, es quizás hoy la parte mejor comprendida del cerebro y de la corteza cerebral (*Hubel, 2000*). El progreso más asombroso en este campo viene determinado por la combinación de los trabajos de Don Santiago Ramón y Cajal, algunos de ellos expuestos en su libro *Histología del Sistema Nervioso*, y las aportaciones que desde finales de los 50 permitió avanzar a la anatomía y fisiología en paralelo, básicamente por el desarrollo de un método fisiológico de registro de neuronas aisladas en el SNC.

La estructura más básica dentro del sistema nervioso son las células nerviosas o neuronas. A éstas le acompañan otras células y estructuras con distintas funciones: las células gliales que aportan función estructural, ayudan a su nutrición y eliminan desechos; los vasos sanguíneos y las células que los componen; y, por último, las distintas membranas que están presentes es las estructuras cerebrales. Todas en sintonía armonía en sus interrelaciones configuran la anatomía y permiten la correcta fisiología del SNC.

Sin pretensiones de profundizar, se pueden identificar distintas estructuras en una neurona: el cuerpo celular, el axón y las dendritas. El cuerpo celular o soma, contiene el núcleo, las mitocondrias y las demás organelas celulares, con distintas funciones para el mantenimiento celular; el axón, que es la fibra nerviosa encargada de conducir la señales; y junto al soma, aparecen varias fibras ramificadas denominadas dendritas. La totalidad de las fibras nerviosas (el soma, axón y dendritas) se encuentra revestida por la membrana celular.

Las dendritas y el soma reciben la información procedente de otras neuronas y la envían a través de su propio axón hasta otra neurona, que recibirá esta información gracias a sus dendritas y soma. Aunque en el sistema nervioso periférico esta transmisión de información puede producirse entre una neurona y otro tipo celular, por ejemplo muscular, en el SNC la transmisión sucede siempre entre

neuronas. Las regiones en las que se produce la transmisión de la información entre axón (de la célula presináptica) y dendritas (de la célula postsináptica) se denominan sinapsis.

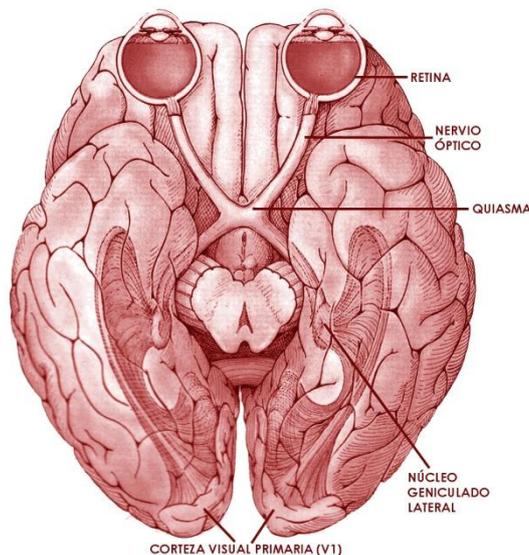


Figura 1: Esquema de la vía visual. (Tomado del libro *Ojo, Cerebro y Visión de Hubel, 2000*).

La interrelación de conjuntos de neuronas que forman estructuras clasificadas en distintos niveles se conectan en un orden secuencial determinando, construyendo así las denominadas vías nerviosas.

Muy brevemente, se podría decir que la vía visual comienza en las retinas de cada ojo, donde las células receptoras de la luz envían la información a través de dos capas de células más y de los axones (nervio óptico) de las células ganglionares de retinas (CGR), hacia el siguiente nivel, a los núcleos geniculados laterales. Estas estructuras a su vez envían sus fibras a la zona visual de la corteza cerebral (corteza visual o estriada). Desde allí, la información se envía a varias áreas visuales secundarias vecinas. El lóbulo occipital, contiene al menos una docena de estas áreas visuales y muchas más se alojan en los lóbulos parietales y temporal (**Figura 1**).

Siguiendo con conceptos anatómo-fisiológicos para mejor comprensión de esta tesis, en adelante nos acercamos de forma más específica al órgano de estudio de esta tesis y a las células donde se centra la misma.

3.1.2 El ojo.

En general, el globo ocular de los mamíferos es una estructura esférica formada por tres capas. De la más externa a la más interna encontramos: la esclerótica, cuya función protectora es compartida con la cornea en el polo anterior; la úvea, que a su vez diferencia tres estructuras, la coroides, el cuerpo ciliar y el iris; y por último, la retina (**Figura 2**).

La córnea es un tejido avascular y transparente constituido por varias capas. Su capa externa de células epiteliales en constante renovación que, en interacción con la película de la lágrima, establecen una superficie óptica lisa. El estroma está formado principalmente por fibras de colágeno y proteoglicanos, su capa interna está formada por una monocapa de células endoteliales.

La coroides o capa media del globo ocular tienen como función principal irrigar la retina externa y supone la red capilar más extensa del globo ocular.

El cuerpo ciliar se encuentra en la zona anterior de la úvea, y está revestido por el epitelio ciliar que en los procesos ciliares es el encargado de la secreción del humor acuoso. Este humor acuoso

pasa de cámara posterior por la pupila a la cámara anterior, donde se produce una dinámica convectiva del mismo, favoreciendo por tanto, la configuración y propiedades ópticas del globo ocular y la nutrición del cristalino y córnea.

El iris es la parte más anterior de la úvea y puede dividirse en dos capas, la anterior y posterior; en esta última, se encuentra el músculo dilatador y el esfínter, claros participantes en los movimientos de miosis y midriasis pupilar.

El cristalino es un tejido muy especializado cuya función es realizar el enfoque fino de las imágenes proyectadas sobre la retina. Esta estructura está constituida por dos poblaciones de células epiteliales especializadas: las superficiales cuboideas, que forman el denominado epitelio del cristalino, y las internas que son alargadas y se conocen como fibras.

Además de estas células, el cristalino se compone de grandes concentraciones de proteínas denominadas cristalininas. Para su funcionalidad, es necesario preservar su transparencia, presentar un índice de refracción superior al medio en el que permanece suspendido y tener superficies de refracción con la curvatura adecuada que, a su vez, debe poder variar para facilitar el enfoque.

La capa más interna del globo ocular es la retina. Englobado por la retina se encuentra el humor vítreo y aunque éste tenga alguna participación en el aporte nutricional a las capas más internas, el principal sustento nutricional de la retina es aportado por los vasos retinianos en sus capas más internas y como señalábamos, por la coroides en sus externas. La retina es el órgano en el cual se centra nuestra investigación y cuyos conceptos principales se detallan más extensamente en el siguiente apartado de esta introducción.

3.1.3 La retina.

La retina de los vertebrados y su organización ha sido objeto de estudio para muchos investigadores a lo largo de los últimos 100 años. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones todavía continúan siendo vigentes (**Figura 3**).

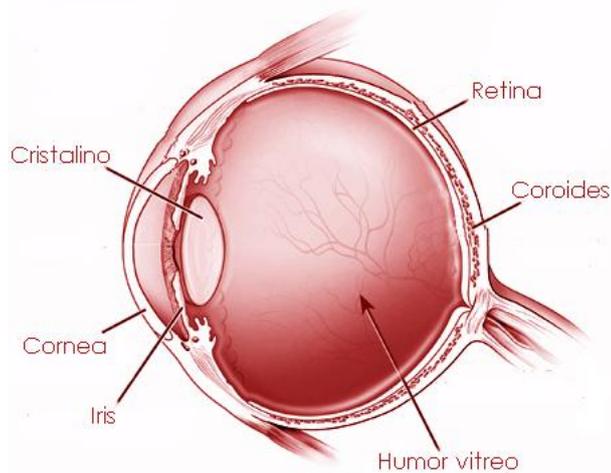
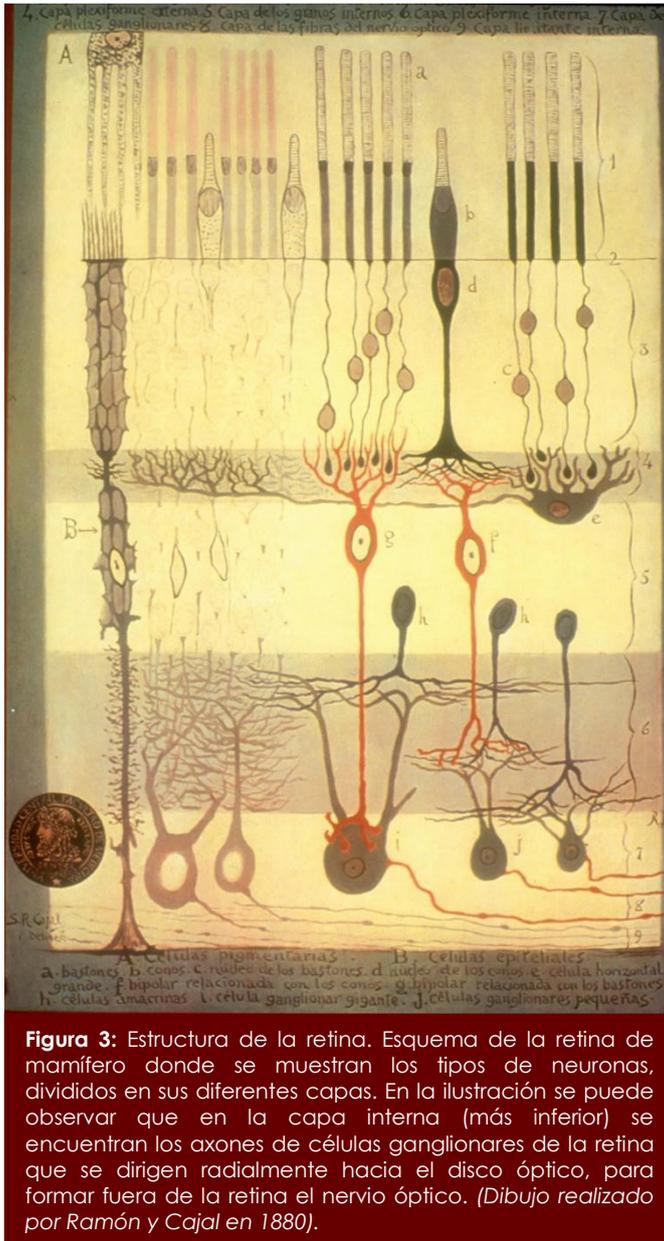


Figura 2: Esquema simple de la anatomía del ojo.



En la porción más externa o escleral de la retina se encuentra el Epitelio Pigmentario (EP) que, embriológicamente, no deriva de la retina neural. Entre el EP y la CNE se localizan los segmentos externos de los fotorreceptores. Entre la retina y el humor vítreo se encuentra la membrana limitante interna, que es una lámina basal de glicoproteínas adheridas a los pies de las células de Müller, éstas son células gliales radiales que ocupan toda la altura de la retina. En la región de los fotorreceptores se localiza la membrana limitante externa constituida por las uniones entre los extremos distales de las células de Müller y los segmentos externos de los fotorreceptores.

En todas las especies de vertebrados existen diferencias topográficas en la retina que aportan especificidad, pero todas comparten una organización estructural básica. La estructura laminar y la gran variedad celular hacen de la retina un centro nervioso altamente complejo, estructurado y organizado (Camino, 1998). La luz tiene que pasar a través de todas las capas de la retina antes de estimular a los elementos fotosensibles (segmentos externos de los conos y los bastones) encargados de la captación de la energía luminosa, y de la transformación de esta energía electromagnética en energía eléctrica, mediante cambios en el potencial de membrana de los fotorreceptores que van a dar lugar a los impulsos nerviosos (Hubel, 2000). Este proceso se conoce con el nombre de fototransducción.

La principal función de la retina consiste en la captación de la energía de las ondas electromagnéticas comprendidas en el espectro de luz visible y su transformación en energía eléctrica, y también realiza el proceso inicial de la información luminosa.

La retina de todos los vertebrados adultos incluidos los mamíferos, es una estructura laminar y consta de tres capas de cuerpos celulares o somas que, desde el interior hacia el exterior de la retina, se denominan: Capa de las CGR, Capa Nuclear Interna (CNI) y Capa Nuclear Externa (CNE). Entre las capas celulares existen dos capas de neuropilo denominadas: capa plexiforme interna (CPI) y capa plexiforme externa (CPE). Por encima de la capa de las CGR y situada más internamente se encuentra capa de fibras de las CGR.

En la porción más externa o escleral de la retina se encuentra el Epitelio Pigmentario (EP) que, embriológicamente, no deriva de la retina neural. Entre el EP y la CNE se localizan los segmentos externos de los fotorreceptores. Entre la retina y el humor

Los contactos sinápticos, a través de los cuales se transmiten cambios de potencial eléctrico y por tanto de información nerviosa, se producen en las capas plexiformes o sinápticas. En la CPE o sináptica externa la información es aportada por los terminales de los fotorreceptores y se producen contactos entre fotorreceptores y células bipolares y horizontales. Además, se producen también contactos entre las células interplexiformes y las células bipolares y horizontales. En la CPI, o sináptica interna, la información es aportada por los terminales axonales de las células bipolares, y se producen contactos entre las células bipolares y las CGR y amacrinas. Las células interplexiformes reciben información de células amacrinas y bipolares y envían su información centrífuga hacia la CPE. Así, en estas dos capas sinápticas la señal visual, transmitida de fotorreceptores a CGR, es modulada por el resto de neuronas retinianas. Una vez procesada, la información visual sale la retina hacia el cerebro en forma de impulsos nerviosos o potenciales de acción que son conducidos por los axones de las CGR que forman del nervio óptico (*Ramón y Cajal, 1972; Polyak, 1941; Dowling, 1987; Masland, 2001, Kolb, 2003;*) hacia las diferentes regiones retinorecipientes subcorticales.

La citoarquitectura normal de la retina es crucial para su correcto funcionamiento. Por tanto, los cambios en la integridad de sus capas pueden servir como índice de la función retiniana tras el desarrollo de una patología o de una degeneración causada por un agente externo que lesione sus componentes celulares (*Michon et al. 1991*).

3.1.3.1 Fotorreceptores.

Existen dos tipos diferentes de fotorreceptores, los bastones y los conos. Los bastones son sensibles a bajas intensidades luminosas e intervienen en la visión nocturna (escotópica) y los conos son sensibles a mayores intensidades de luz e intervienen por tanto en la visión diurna (fotópica) y cromática. Los conos tienen una mayor resolución temporal, pero son mucho menos sensibles que los bastones (*Dowling, 1987*).

Los fotorreceptores son las primeras neuronas de la vía visual y se encargan de la fototransducción, es decir, transformar la energía luminosa en señales eléctricas. Son células con morfología alargada y su estructura está polarizada para poder realizar sus dos funciones principales: por un extremo reciben y procesan la energía luminosa y por el otro, la transmiten. Esta polarización conlleva a que, estructural y funcionalmente, estén divididas en varias porciones celulares que están muy especializadas.

La estructura general de los fotorreceptores es constante en la mayoría de los vertebrados, aunque existen diferencias morfológicas y, presumiblemente, también funcionales entre especies. Podríamos describir como fotorreceptor tipo aquel que incluye todas las estructuras descritas en los fotorreceptores de las distintas especies de vertebrados. Este fotorreceptor constaría de los siguientes elementos, enumerados según los encontramos desde las capas más externas a las más internas de la retina: segmento externo, pedúnculo de conexión, segmento interno, soma, axón o fibra interna y terminal sináptico (**Figura 4**).

Segmento externo.

El segmento externo es diferente en los dos tipos de fotorreceptores y es la estructura que supone la base de su nombre. En el bastón es una estructura cilíndrica y alargada, mientras que en el cono es relativamente corto, cónico y afilado. Los segmentos externos están formados por apilamientos de varios cientos de discos formados por una bicapa lipídica en la que se ubican los fotopigmentos. Los discos están orientados en ángulo recto en relación al eje longitudinal de la célula. Según las especies la cantidad de discos oscila entre 600 y 1000 para los bastones y pueden ser hendidos o lobulados. En los conos hay más discos, entre 1000 y 1200, pero su espesor es menor (Urtubia, 1997). Todos los discos de un cono mantienen su continuidad con la membrana celular por un lado, pero sólo algunos discos de un bastón lo hacen. Los conos y bastones poseen pigmentos fotosensibles específicos y diferentes en su estructura. La existencia de un cromóforo es común e inherente a todos los fotopigmentos, y éste se encuentra siempre unido a una porción proteica pura, la opsina, siendo ésta distinta para cada tipo de fotorreceptor.

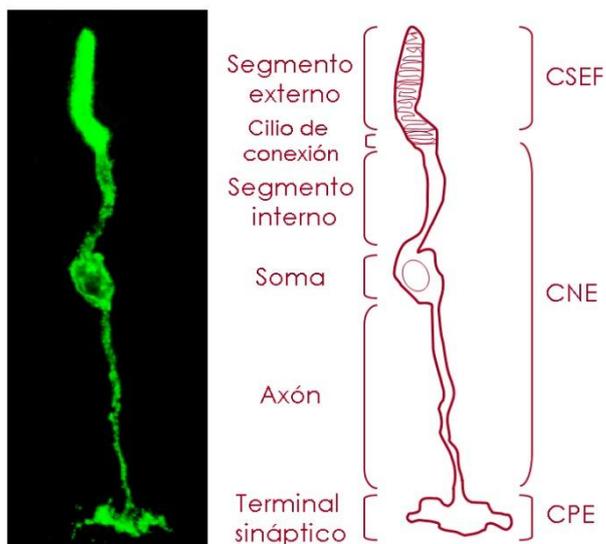


Figura 4: Estructura de un fotorreceptor. Izquierda: microfotografía confocal (x60) de un corte radial de 15 μm obtenido en el criostato de una de nuestras retinas albinas, procesada para revelar la inmunorreactividad contra la OPN1SW, lo que nos permite apreciar un cono S, con las típicas estructuras básicas de un fotorreceptor. Derecha: dibujo esquemático del mismo cono en el que se han señalado a la izquierda los distintos elementos celulares del fotorreceptor y a la derecha la capa de la retina en la que se encuentran (CSFR: capa segmentos externos de los fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa y CPE: capa plexiforme externa)

Imagen adquirida por Orfín-Martínez (2010)

Pedúnculo o cilio de conexión.

Es un estrecho puente citoplasmático que conecta el segmento externo con el interno. Se trata de un cilio modificado con nueve pares de microtúbulos que han perdido su par central. Su cuerpo basal es uno de los centriolos de la célula. Generalmente se encuentra lateralizado y constituye el eje principal del segmento externo (Greiner et al. 1981).

Segmento interno.

El segmento interno es la región comprendida entre la membrana limitante externa y el estrechamiento citoplasmático que contiene el cuerpo basal del pedúnculo de conexión. Contiene la mayor parte de los orgánulos celulares: mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático liso, acúmulos de glucógeno, gotas lipídicas, proteínas de citoesqueleto, etc. A través de él circulan las moléculas que viajan desde el soma al segmento externo y viceversa. Es una porción celular con gran

actividad metabólica, ya que en los segmentos internos se sintetizan los componentes para la renovación de los discos de los segmentos externos, y sus mitocondrias proporcionan la energía requerida para la fototransducción. Se distinguen distintas regiones que, desde la parte interna a la externa, se definen como mioide, que conecta directamente con el soma y el elipsoide, unido al segmento externo por el pedúnculo o cilio de conexión. El mioide es rico en partículas de glucógeno y ribosomas mientras que el elipsoide está repleto de mitocondrias, en particular en los conos (*Levin et al. 2011*).

Membrana limitante externa.

Se define como membrana limitante externa, no una membrana real sino una región donde se producen uniones "zónulas adherens" entre los pies externos de las células de Müller y entre éstas y las paredes externas de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Soma.

En el soma de los fotorreceptores se encuentra el núcleo y el resto de organelas celulares, en el soma de estas células se encuentra gran cantidad de mitocondrias debido a los requerimientos energéticos que estas células generan para posibilitar el proceso de fototransducción. El conjunto de núcleos de los fotorreceptores confeccionan la CNE.

Axón o fibra interna.

Es una fina prolongación de citoplasma que se extiende desde el soma hasta el terminal sináptico. En su interior se encuentran proteínas del citoesqueleto, como neurofilamentos o microtúbulos, y vesículas sinápticas que son más abundantes a medida que nos acercamos al terminal sináptico. Esta fibra es en general de pequeño tamaño y únicamente adquiere cierta longitud en los conos foveales de las retinas de primates, conociéndose como fibras de Henle.

Terminal sináptico.

Son las terminaciones internas de los fotorreceptores que se hallan en la CPE. Se denominan esférula en el caso de los terminales de bastones y pedículos en el caso de los conos. Los bastones sinaptan principalmente con las bipolares de bastón y con los terminales axodentríticos de las células horizontales H1. Por su parte, los conos sinaptan predominantemente con las bipolares de cono y con los procesos dendríticos las células horizontales H1 y H2 (*Dowling, 1987; Hubel, 2000; Kolb; 2003*).

3.1.3.1.1 Opsinas.

La visión comienza cuando los fotones son absorbidos por las moléculas fotorreceptoras, o pigmentos visuales como inicio de la fototransducción. Los pigmentos visuales están formados por una apoproteína donde la parte proteica es una proteína con 7 dominios transmembrana (**Figura 5**), la opsina, y la lipídica, el cromóforo, un derivado de la vitamina A, el 11- cis-retinaldehído u 11- cis-retinal. En la cara citoplásmica, los pigmentos visuales están acoplados a proteínas G, las cuales actúan como mensajeras secundarias, transducen la señal y dan comienzo a la cascada de fototransducción (Yokoyama, 2000,2002). Los fotopigmentos responden a la luz mediante un proceso denominado decoloración o blanqueo (*bleaching*). En este proceso, una molécula de pigmento visual absorbe un fotón, o unidad simple de luz visible y como consecuencia, el cis-retinal se transforma en su isómero trans-retinal. El cambio de forma del cromóforo inicia una serie de cambios conformacionales en la opsina, cambios que dan lugar en última instancia a la excitación del fotorreceptor y finalmente a la separación del cromóforo de la opsina. Es decir, tras la estimulación visual se separan la parte proteica, opsina, y el cromóforo isomerizado, el trans-retinal. Para reconstruir o regenerar la rodopsina a su conformación fotosensible, se precisa de la opsina y del cromóforo isomerizado enzimáticamente por la retinal-isomerasa a la situación 11-Cis. En esta regeneración del pigmento visual intervienen el segmento externo del fotorreceptor y el EP de la retina. Se ha documentado que, en los mamíferos, la

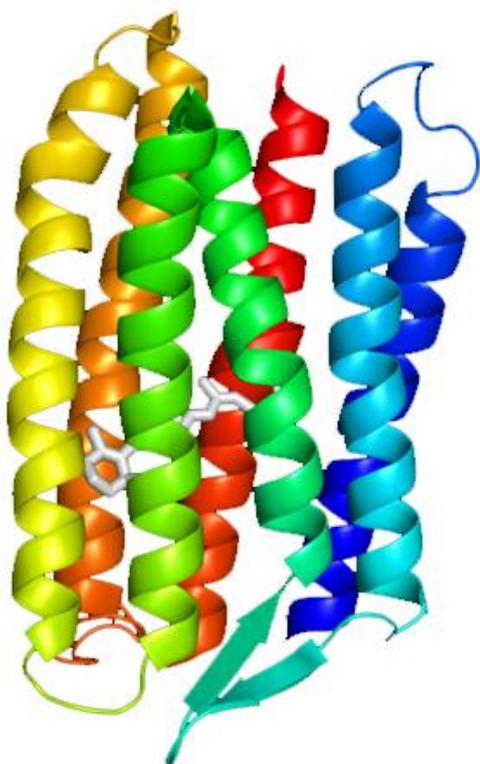


Figura 5: Modelo esquemático de un pigmento visual tipo. Estructura: PDB1GUE Edman et al, 2002, Structure 10(473.82) Tomado de RCSB Protein Databank, Porillo et al BMC Bioinformatics, 2007, 8:316. Se muestran sus 7 dominios transmembrana insertados en la membrana del disco. El extremo N terminal de la proteína aparece en azul, el C terminal en rojo.

mayor parte del ciclo (la isomerización que regenera la configuración 11-Cis) se produce en el EP de la retina. La única reacción en que participa la luz dura aproximadamente unos pico-segundos, todas las demás reacciones restantes son procesos oscuros (en los que no interviene la luz) y se conducen químicamente.

La sensibilidad a la luz de los pigmentos viene determinada por la interacción entre el cromóforo y la opsina, que tras un ajuste espectral, responden a una longitud de onda λ de máxima absorción, denominada λ_{max} . Aunque se han caracterizado los aminoácidos estructurales clave, comunes a varios pigmentos visuales, poco se sabe de cuáles son los importantes en este ajuste espectral que determina la sensibilidad de cada pigmento. Es decir, pequeñas modificaciones en la estructura de las proteínas hacen que el espectro de absorción sea diferente, con máximos de absorción a longitudes de onda diferentes para la rodopsina, y para las opsinas de conos azul, verde y rojo.

El pigmento visual en los bastones se denomina rodopsina (opsina de los bastones), mientras que en los conos se llama opsina del cono, o pigmento visual del cono azul, verde o rojo u opsinas S, M o L de acuerdo con la longitud de onda a la que responden óptimamente (*short, medium or long*

wavelength) (Yokoyama, 2000,2002; Zvyaga et al. 1996; Fahmy et al. 1995). En los primates se han descrito cuatro tipos de pigmentos visuales con sus correspondientes longitudes de onda de máxima absorción que son para la rodopsina, de 500 nm y para los pigmentos visuales de los conos, longitudes de 450 nm, azul (Conos-S), 530 nm, verde (Conos-M) o 565 nm, rojo (Conos-L).

En la mayoría de los mamíferos examinados, sin embargo se han encontrado únicamente dos tipos de pigmento visual en los conos, uno sensible a longitudes de onda corta (azules) y otro sensible una longitud de onda que se encuentra entre el rojo y el verde de los humanos. A este último tipo de pigmento se le denomina L/M o L. La sensibilidad de los tres pigmentos encontrados en rata es para la rodopsina, de 498nm (Bridges, 1959) - 500nm (Bridges, 1959; Dowling, 1967; Green, 1971,1973; Ernst y Kemp, 1975; Dowling, 1967; Bobu et al. 2008) para la opsina S de 358nm (Yokoyama et al. 1998) y para la opsina L, de 510 nm (Neitz y Jacobs 1986) - 509nm (Radlwimmer y Yokoyama, 1998).

La mayoría de los receptores sensoriales ordinarios, químicos, térmicos o mecánicos, se despolarizan en respuesta al estímulo apropiado, del mismo modo que los nervios se despolarizan en respuesta a un estímulo excitador y la despolarización conlleva la liberación de neurotransmisores en los terminales axonales. Sin embargo, los fotorreceptores se hiperpolarizan con la luz. En 1964 fue el neurofisiólogo japonés Tsuneo Tomita (Hubel, 2000), el primero en introducir con éxito un microelectrodo dentro de los conos de un pez, con un resultado tan sorprendente que muchos científicos contemporáneos lo cuestionaron al principio. En la oscuridad el potencial de membrana del cono era inesperadamente bajo para una célula nerviosa. Cuando iluminó el cono, este potencial se incrementó, la membrana se hiperpolarizaba, justo al contrario de lo que se había asumido que ocurría al tratarse de células neurales. En la oscuridad, los fotorreceptores de los vertebrados se encuentran aparentemente más despolarizados que las neuronas normales en reposo, y la despolarización produce una liberación mantenida de neurotransmisor en el terminal axonal, exactamente lo que ocurre en la estimulación de neuronas convencionales. La luz, al hiperpolarizar el potencial de membrana del receptor, detiene la liberación del neurotransmisor. Por muy extraño que parezca, la estimulación apaga el receptor (Hubel, 2000).

3.1.3.2 Epitelio pigmentario de la retina.

El EP está formado por una monocapa de células epiteliales cuboideas o cilíndricas que separa los fotorreceptores de la coroides. En la retina de los primates desarrollados no se observan mitosis en el EP, por lo que éste se considera un grupo estable de células que no se dividen (Kajiwara et al. 1994). La membrana de la cara retiniana de las células del EP forma numerosas microvellosidades largas que se interdigitan con los segmentos externos de los bastones. En los mamíferos los segmentos externos de los conos están recubiertos por especializaciones multilamelares denominadas vainas de los conos (Jay M, 1982). No existe contacto anatómico entre los fotorreceptores y el EP exceptuando el de la matriz interfotorreceptora, matriz compuesta de una combinación de proteínas y proteoglucanos que rellena el espacio subretiniano. Las células epiteliales del EP está unidas entre sí mediante complejos de unión formados por uniones estrechas prominentes que divide a las células en la mitad apical dirigida hacia la retina y la mitad basal que se enfrenta a la coroides. En la mitad basal se

encuentra el núcleo y numerosas mitocondrias, en el citoplasma a nivel apical se localizan un gran número de gránulos de pigmento de color negro, por eso se denomina pigmentario.

La importancia del EP radica en sus funciones (*García-Feijóo y Pablo-Júlvez, 2012*), entre las que cabe mencionar:

Forma junto con la membrana de Bruch la barrera hemato-retiniana en la porción externa de la retina que recibe su vascularización de la coroides. Las células del epitelio tienen uniones estrechas entre ellas y se encuentran entre la retina y los capilares fenestrados de la coroides. El tercio externo de la retina depende para su irrigación de la circulación corioidea mientras que los dos tercios internos dependen de la arteria central de la retina. Para la misma masa de tejido, las necesidades metabólicas de la retina son aproximadamente 7 veces las del cerebro y las más altas de cualquier tejido de nuestro organismo.

Fagocita las porciones más apicales (que contienen los discos más viejos) de los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células del EP tiene 3 tipos de inclusiones citoplasmáticas: Melanosomas, gránulos de lipofuschina y fagosomas. Los gránulos de lipofuschina tienen su origen en fagosomas (producidos por fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores) que no son digeridos totalmente. Fagosomas y gránulos de lipofuschina pueden eliminarse hacia la membrana de Bruch, formando las drusas. Cada célula de EP fagocita aproximadamente entre 2000 y 4000 discos diarios. Se ha calculado que una célula del EP extrafoveal debe ingerir y degradar, diariamente, un volumen de material de segmentos externos de bastones que se corresponde con el 7% del volumen de la propia célula del EP. Se ha estimado que en el mono Rhesus el tiempo de renovación de los segmentos externos de los conos es de 13 días en la región parafoveal y 9 días en retina periférica. Como las células del EP en general no se dividen, la cantidad de material de membrana que deben ingerir y degradar durante su vida supera con mucho la de cualquier otra célula fagocítica.

Los fotorreceptores y los capilares corioideos dependen del EP para su supervivencia. Si el EP se destruye (química o mecánicamente), los fotorreceptores y los capilares corioideos se atrofian. Se calcula que el EP de la retina humana, tiene aproximadamente entre 4,5 - 6 millones de células. La distribución no es homogénea, las células son más altas y estrechas en la mácula y más anchas y planas en la periferia de la retina. En promedio (excepto en la región central), el polo apical (interno) de una célula del EP contacta hasta con 30 fotorreceptores que pueden ser todos bastones, mezcla de conos y bastones o conos.

El EP contiene melanina, con lo que impide la reflexión de la luz en la retina y contribuye así a aumentar la nitidez de la imagen en el caso de luminosidad elevada. El grado de pigmentación es variable en relación con la raza o el fenotipo del individuo. Hay más densidad de pigmento en la región macular que en la región periférica. Los gránulos de melanina están concentrados principalmente en el polo interno (apical) de las células y también en las prolongaciones citoplasmáticas que se entrelazan con los segmentos externos de los conos y bastones. La melanina del epitelio contribuye al secuestro de radicales libres y su detoxificación.

El EP almacena vitamina A, a partir de la cual se forma el componente no proteico (retinal) de los cuatro tipos de pigmentos visuales, y participa en el metabolismo del pigmento visual (11-cis-retinal) que se intercambia entre el EP y los segmentos externos de los conos y bastones, en el proceso de regeneración del pigmento visual (ciclo visual).

El EP proporciona apoyo metabólico y funcional a la retina mediante el transporte activo de iones. Además es fuente de producción de factores tróficos (e.g., el factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario, PDEGF).

La integridad anatómico-funcional del EP es necesaria para generar la onda C del electroretinograma (ERG). El ERG es un potencial de campo constituido por cambios de voltaje que se registran del ojo cada vez que se estimulan con un destello de luz. Para ello, se coloca un electrodo de baja resistencia en la superficie corneal y otro electrodo de referencia (indiferente) en cualquier otro lugar de la cabeza.

Las células del EP, en general, no se dividen. Tras un traumatismo de la retina o desprendimiento regmatógeno, pueden proliferar vigorosamente y liberarse del EP como células libres que descansan sobre las superficies internas del segmento posterior del ojo, donde se transdiferencian a un fenotipo similar al de los fibroblastos y pueden participar en la formación de membranas contráctiles fibrocelulares. La proliferación del EP es también importante en la formación de membranas epirretinianas si hay orificio en la retina.

3.1.3.3 Especialización regional de la retina.

La retina de los vertebrados suele presentar especializaciones regionales que vienen determinadas por la distribución espacial y densidad de las CGR. La mayoría de los ojos están especializados para mirar a un punto, o para mirar a un horizonte visual, o para ambos, y esto se corresponde con la presencia en la retina de una región con una alta concentración (densidad) de CGR, conos y bipolares de cono. Estas regiones toman la forma de un área central, aproximadamente circular, o de una estría visual, alargada horizontalmente. Esta densidad espacial celular de la retina se debe a diferencias en el crecimiento de la retina y en la fecha de nacimiento de las neuronas retinianas. La densidad de CGR a través de la retina es un buen indicador del grado en el que el ojo muestra cualquiera de estas especializaciones.

En la retina de los roedores se ha descrito una estría visual (*Salinas-Navarro et al. 2009a,b*). La estría visual es una región de la retina especializada en proporcionar la mejor visión en determinados puntos del espacio visual. En primates, algunos pájaros y reptiles la zona más especializada y central de la retina es conocida como *área centralis*. La principal característica de esta *área centralis*, es que contiene una alta concentración de CGR, conos-L y células bipolares, y donde los conos-S y bastones son prácticamente ausentes en primates adultos incluidos los humanos, esta área se denomina también mácula o fovea en humanos y primates (*Rodieck, 1998; Lukats et al. 2005*).

3.2 Modelos experimentales.

La retina presenta múltiples ventajas para su estudio experimental. La retina proporciona un excelente modelo de estudio tanto a corto como a largo plazo de la respuesta neuronal a una gran variedad de patologías, incluyendo el daño inducido por fototoxicidad (*Marco-Gomariz et al. 2006; García-Ayuso et al. 2011; Montalban-Soler et al. 2012*), modelos hereditarios de degeneración de fotorreceptores (*Villegas-Perez et al. 1996, 1998; Wang et al. 2000, 2003; García-Ayuso et al. 2010*), o modelos de degeneraciones relacionadas con la neuropatía óptica glaucomatosa (*Morrison et al. 2005, 2011; Vidal-Sanz et al. 2002, 2012; Parrilla-Reverter et al. 2009; Salinas-Navarro et al. 2009*).

Para la realización esta Tesis Doctoral se han utilizado modelos experimentales de distintas patologías previamente establecidos, como el modelo experimental de hipertensión ocular, o la cepa de rata transgénica P23H-1, cuya mutación en el gen de la rodopsina supone un modelo experimental de retinosis pigmentaria comúnmente utilizado. Además, se ha desarrollado un nuevo modelo, un modelo de degeneración focal de Fotorreceptores inducido mediante fototoxicidad, que se ha demostrado fiable, cuantificable y reproducible. En los tres modelos experimentales nos hemos enfocado en el análisis y el estudio cuidadoso de la población de fotorreceptores.

Por todo ello, y puesto que los modelos experimentales son parte fundamental del soporte de esta tesis, a continuación se presentan distintos modelos experimentales de enfermedades con gran prevalencia en la población humana, con el fin de asentar conceptos básicos necesarios para la comprensión global de la tesis.

3.2.1 Modelos experimentales de Retinosis Pigmentaria.

La retinosis pigmentaria (RP) comprende un grupo heterogéneo de degeneraciones hereditarias en la retina que conducen hacia la ceguera irreversible. La patología se caracteriza por una muerte progresiva de los fotorreceptores que afecta primero a los bastones y de forma secundaria a los conos, ya que los genes mutados se expresan normalmente en los bastones (*Pacione et al. 2003; Ayuso y Millan, 2010; Cepko, 2012; Daiger et al. 2013*). Sin embargo, aunque todos los bastones comparten defectos genéticos, la degeneración de éstos comienza en la retina ecuatorial y progresa desde ahí de una forma centripeta (*Milam et al. 1998*).

Existe la necesidad de profundizar en determinados aspectos de la patología que aún se desconocen, aunque algunos mecanismos han sido propuestos, no se sabe con exactitud cómo las mutaciones en la rodopsina causan la muerte de los fotorreceptores. Tanto en pacientes con RP como en modelos experimentales de RP los conos degeneran habitualmente, una vez que existe una pérdida substancial de bastones (*Chrysotomou et al. 2009*), ¿por qué los conos degeneran de forma secundaria a los bastones, cuando los defectos genéticos son específicos de los bastones? (*Ayuso y Millan, 2010; Ferrari et al. 2011*). Ésta sigue siendo una preocupación debatida, aunque varios mecanismos de dependencia cono-bastón de supervivencia han sido postulados: los bastones secretan un factor esencial de supervivencia para los conos (*Léveillard et al. 2004*); la pérdida de los bastones causa daño oxidativo a los conos (*Stone et al. 1999*); los cambios degenerativos de la retina y

coroides impiden una nutrición normal de los fotorreceptores (Marc y Jones, 2003; Marc et al 2003); y los bastones en degeneración producen una toxina que alcanza a los conos mediante las uniones gap, causando su muerte (Ripps, 2002).

En modelos animales de RP, y después de largos periodos de tiempo se han encontrado conos viables en estructura y función (LaVail et al. 1997; John et al. 2000; Hartong et al. 2006; Chrysotomou et al. 2008, 2009a,b; Lin et al. 2009; Punzo et al. 2009). La supervivencia de conos en la RP es de especial importancia ya que puede preservar la visión fotópica (Pinilla et al. 2005; Marc et al. 2007; Lu et al. 2013). Recientemente, varios autores han estudiado la supervivencia de conos en modelos experimentales de RP y han documentado diferentes grados de degeneración y de reorganización de conos. (Chrysotomou et al. 2008, 2009a,b; Lin et al. 2009; Punzo et al. 2009; Hombrebueno et al. 2010; Li et al. 2010; Xia et al. 2011; Ji et al. 2012). Algunos de estos estudios han sido realizados en ratas S334ter-3 (Li et al. 2010; Xia et al. 2011; Ji et al. 2012), donde se han observado anillos de degeneración de conos y se ha investigado sobre su naturaleza y una posible relación con la muerte de bastones.

Varios modelos animales de RP se han utilizado con el propósito de profundizar en el proceso de degeneración de la enfermedad. Nuestro estudio se centra en la rata transgénica P23H de la línea 1, un animal que padece una mutación autosómica dominante en el gen de la rodopsina, una sustitución de un aminoácido (una prolina por una histidina) en el codón 23 de la molécula (Steinberg et al. 1996; Lewin et al. 1998; LaVail et al. 2000; Machida et al. 2000). Esta mutación se encuentra también en humanos y es una de las más comunes asociadas con la RP en Norte América (Dryja et al. 1990; Ferrari et al. 2011).

En esta Tesis, con la hipótesis de la existencia de factores tanto intrínsecos como extrínsecos que pueden influir sobre la degeneración genéticamente determinada de fotorreceptores, realizamos un estudio espaciotemporal de las relaciones entre las degeneraciones de bastones y las de conos en la rata P23H-1, en el entendimiento de que ello supondrá un paso hacia adelante en la comprensión fisiopatológica de una enfermedad que desemboca de cualquier forma en ceguera irreversible.

3.2.2 Modelos experimentales de DMAE.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una exageración del proceso de envejecimiento de la retina que está caracterizado por la aparición de manchas amarillas discretas en la mácula (drusas).

En una etapa más avanzada de la DMAE se pueden observar uno o más de los siguientes hallazgos: atrofia geográfica del EP con vasos coroideos subyacentes visibles; desprendimiento del EP con o sin desprendimiento sensorial; neovascularización coroidea subretiniana y tejido cicatricial fibrogliol, hemorragia y exudados subretinianos.

La DMAE es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo occidental en personas de más de 50 años. En Estados Unidos, el 10% de las personas entre 65 y 75 años han perdido algo de visión central como resultado de la DMAE. La DMAE terminal (ceguera legal) se encuentra

aproximadamente en el 1.7% en mayores de 50 años y alrededor del 18% en mayores de 85 años (Kanski, 2009).

Deberíamos asumir que no existen modelos experimentales en mamíferos adultos que reproduzcan la DMAE con una gran fidelidad a la fisiopatología de la enfermedad, pero existen estrategias que los investigadores han desarrollado para reproducir modelos de degeneración de fotorreceptores, que habitualmente suelen basarse en modelos de degeneración inducida por fotoexposición a la luz.

El daño fotoquímico (Organisciak y Vaughan, 2010; Hunter et al. 2012) puede involucrar la formación de radicales libres y en consecuencia estrés oxidativo seguido de una activación del ftopigmento del fotorreceptor (Noell et al. 1966). Determinadas longitudes de onda corta podrían ligarse a cambios químicos en la lipofuscina (Ham et al. 1978). El daño inducido por luz ha sido usado en modelos de degeneración humana de fotorreceptores (Marco-Gomariz et al. 2006; García-Ayuso et al. 2011; Montalbán-Soler et al. 2012), incluyendo modelos hereditarios en animales de degeneración retiniana y DMAE (Marc et al. 2008). De hecho, la excesiva exposición a la luz es conocida como un factor de riesgo en la DMAE (Taylor et al. 1992; Cruickshanks et al. 2001). Además en la patogénesis de la DMAE, se ha postulado que el daño fotoquímico podría ser mediado por estrés oxidativo (Beatty et al. 2000).

Hasta ahora, prácticamente la totalidad de los modelos experimentales de fototoxicidad por luz se había enfocado en un daño generalizado en toda la población de células fotorreceptoras, producido por exposiciones de luz difusa (Noell et al. 1966; LaVail et al. 1976, 1992, 1998; Ham et al. 1978; van Norren y Schellekens, 1990; Faktorovich et al. 1992; Taylor et al. 1992; Masuda, 1995; Wen et al. 1996; Cao et al. 2001; Agarwal et al. 2002; Vaughan et al. 2002; Casson et al. 2004; Gauthier et al. 2005; Joly et al. 2007; O'Driscoll et al. 2008; Organisciak y Vaughan, 2010; Hunter et al. 2012; Kolomeyer et al. 2014;). Avanzar hacia modelos donde el daño fototóxico de fotorreceptores se produzca de manera focal (Busch et al. 1999) en zonas de alta densidad de conos, podría incrementar la similitud del modelo experimental con la fisiopatología de la DMAE.

3.2.3 Modelos experimentales de Glaucoma.

Un rasgo característico de la neuropatía óptica glaucomatosa ha sido el daño selectivo de las CGR y sus axones, en suficiente número para producir defectos en el campo visual, sin involucrar otras neuronas de las capas externas o internas de la retina.

Desde las últimas dos décadas uno de los objetivos de las investigaciones en este campo ha sido el intento de comprender si el daño causado por la neuropatía óptica glaucomatosa estaba restringido a las CGR y sus axones. Unos pocos estudios histológicos *post-mortem* han contribuido con datos sobre la integridad de la CNE y los fotorreceptores, pero en los últimos cinco años, nuevas técnicas de análisis de imagen *in vivo* han permitido el avance en el conocimiento de la implicación de los fotorreceptores en pacientes glaucomatosos.

La cuantificación de núcleos de fotorreceptores retinianos y de células del EP de la retina en ojos humanos con glaucoma secundario de ángulo cerrado, demostró que las células del EP no difieren significativamente entre ojos glaucomatosos y controles. Sin embargo, los contajes de las células fotorreceptoras y el espesor de la CNE era significativamente menor en los ojos glaucomatosos (Panda y Jonas, 1992).

En ojos de glaucoma primario de ángulo abierto no existe un acuerdo sobre la afectación de los fotorreceptores ya que existen publicados resultados opuestos. Examinando el número y densidad de fotorreceptores, y el espesor de la CNE, no se encontró un descenso significativo en los parámetros analizados (Kendell *et al.* 1995). Sin embargo, un exhaustivo análisis de 128 retinas humanas con diagnóstico de glaucoma crónico (primario de ángulo abierto en la gran mayoría de los casos) determina la pérdida irregular de fotorreceptores (Nork, 2000, Nork *et al.* 2000). En concordancia, en el estudio en el que núcleos eran marcados con DAPI y mediante la utilización de un microscopio multifotón confocal confirman que una gran mayoría de pérdida neuronal ocurre en la capa de CGR, pues a la vez se observa pérdida de células en la capa externa de la retina (Lei *et al.* 2008).

Análisis funcionales como métodos psicofisiológicos, técnicas de potenciales evocados, y diferentes protocolos electrofisiológicos utilizados en pacientes con diferentes tipos de glaucoma, han demostrado que, en esta enfermedad, se produce una afectación funcional de la retina externa, principalmente una afectación de la vía de los conos S (Holopigian *et al.* 1990; Drasdo *et al.* 2001; Velten *et al.* 2001; Bessler *et al.* 2009; Barboni *et al.* 2011).

La utilización de los avances en los procesos de análisis de imagen *in vivo*, así como la mejora de los métodos de imagen en la retina humana, han permitido examinar la capa externa de la retina incluyendo las células fotorreceptoras *in vivo*. En un estudio mediante la tomografía de coherencia óptica (OCT) en glaucoma primario de ángulo abierto en pacientes con defectos avanzados en la agudeza visual (AV) central, se demuestra que los segmentos externos de los fotorreceptores en la fóvea, y la reflectancia en la membrana limitante interna central, estaban deteriorados (Kanis *et al.* 2010). En un estudio en el que se utilizó la "Ultrahigh-Resolution Fourier-Domain Coherence Tomography" (UHR-FD-OCT), "Adaptive Optics" (AO) UHR-FD-OCT, y la "AO-Flood Illuminated Fundus Camera" (AO-FC), para examinar pacientes con neuropatía no-glaucomatosa y pacientes con glaucoma con diferentes combinaciones de cambios característicos glaucomatosos. Y pruebas funcionales como la AV, y distintos tests visuales de color en todos los pacientes, se demostró que neuropatías tanto glaucomatosas, como no-glaucomatosas están asociadas con cambios en la retina externa subsecuentes a la patología en la retina interna, después un largo periodo de tiempo. También se encontró en estos pacientes de glaucoma, una pérdida en la densidad de conos además de los esperados cambios en la retina interna, así como pérdida de la AV (Choi *et al.* 2001; Werner *et al.* 2011).

Aunque a día de hoy aún no se conoce completamente la etiología del proceso glaucomatoso y del mecanismo que resulta en la muerte de las CGR, se han identificado factores de riesgo relacionados con la enfermedad, tales como la edad, el incremento de la presión intraocular (PIO), el espesor corneal y el origen étnico (Quigley *et al.* 2011).

Para un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la degeneración de las CGR inducida por neuropatía óptica glaucomatosa se han desarrollado diversos modelos experimentales. Puesto que la elevada PIO supone el factor de riesgo más importante en pacientes con neuropatía óptica glaucomatosa (*The AGIS investigators, 2000*), se les ha prestado especial atención a modelos animales de hipertensión ocular (HTO). Se ha demostrado que la utilidad de estos modelos han favorecido el avance de nuestra comprensión sobre la patología del nervio óptico inducida por HTO (*Vidal Sanz et al. 2012*).

Se han utilizado diferentes modelos experimentales de HTO en mamíferos como mono, rata y ratón, para determinar los efectos de la HTO sobre las poblaciones neuronales de la retina y además, para contribuir a mejorar el conocimiento sobre los procesos que ocurren en la retina externa tras la elevación de la PIO.

En un modelo de HTO en monos *Cynomolgus* y *Rhesus* de ablación de la malla trabecular mediante láser, la mitad de los animales padecía una anomalía en sus conos rojo/verdes que era remarcablemente similar a la encontrada en humanos (*Nork, 2000, Nork et al. 2000*). El mismo modelo fue utilizado previamente en un trabajo que demostraba anomalías en la visión del color principalmente en la sensibilidad de onda corta (*Kalloniatis et al. 1993*). Además, el análisis cuantitativo de ARNm y la hibridación in situ en este modelo experimental de mono muestra una afectación de la retina externa, en particular de los fotorreceptores tipo cono (*Pelzel et al. 2006*).

Experimentos realizados con un ratón utilizando comúnmente como modelo de glaucoma crónico, el "diluted brown non-agouti (DBA)", concluyen que la degeneración específica de las CGR es un proceso asociado a la elevada PIO (*Saleh et al. 2007; Calkins, 2012*), pero algunos de ellos sugieren la existencia de degeneración de las capas externas de la retina (*Heiduschka et al. 2010 Calkins, 2012*). En un estudio sobre estos ratones se observó un adelgazamiento progresivo de la CNE, el descenso de la amplitud de las ondas a y b del ERG a los 7 meses de edad y además, se documentó que la afectación progresaba con la edad (*Bayer et al. 2001*). Otros estudios anatómicos y moleculares demostraron un adelgazamiento de la capa plexiforme externa y cambios degenerativos estructurales en la sinapsis de los bastones y además se documentó que esta degeneración era progresiva y dependiente de la edad. (*Fuchs et al. 2012; Cuenca et al. 2014; Fernández-Sánchez et al. 2014*).

En rata, se han utilizado diferentes modelos experimentales para determinar las consecuencias de la HTO en la retina externa. En un modelo de inyección de suero salino hipertónico en la cámara anterior (*Anderson y Hendrickson, 1974*) se ha determinado que los fotorreceptores se afectan tras la HTO pero que esa afectación funcional se caracteriza por su reversibilidad siendo esta recuperación de la función de la retina externa más rápida que la de las CGR (*Hez et al. 2006*). Con la cauterización de tres venas episclerales (*Shareef et al. 1995*), no se encontró ninguna alteración en la expresión de opsinas tras una semana de PIO elevada (*Hernández et al. 2009*). Resultados similares fueron presentados en un estudio de ERG en un modelo de fotocoagulación con láser, donde no se encontró afectación de la actividad de la retina externa (*Ben Shlomo et al. 2005*). Sin embargo, un estudio realizado con microscopía electrónica en ratas glaucomatosas por un modelo de cauterización de venas limbares, muchas neuronas en degeneración fueron encontradas en la capa de CGR, en la CPI y en la CNE (*Wang et al. 2002*). La inyección de suero salino hipertónico en las venas episclerales

analizado hasta las 26 semanas con ERG y potenciales visuales evocados sugieren que no sólo sucede una degeneración de las CGR sino que además existe una degeneración de las células de la retina externa, que se confirma mediante histología, la cual muestra una disminución de espesor en las capas externas de la retina en las retinas glaucomatosas (Georgiou et al. 2014). Una elevación crónica de la PIO por tratamiento de laser argón en las venas episclerales (WoldeMussie et al. 2001) revela una reducción de la expresión de ARNm de las opsinas de bastones y conos en las retinas con HTO (Drouyer et al. 2008). Finalmente y más recientemente, en el modelo de HTO producido por la inyección de suero salino hipertónico, el uso de los avances en técnicas de imagen *in vivo* y su nueva incorporación en estudios de modelos de animales experimentales básicamente por la adaptación del OCT Spectralis, ha permitido mostrar evidencias del daño glaucomatoso en las capas externas de la retina, ya que se demuestran cambios regionales significantes y la afectación del espesor retinal en todas las capas (Guo et al. 2010).

Como se ha descrito en este apartado, el concepto de daño de la retina externa en pacientes glaucomatoso está siendo clarificado principalmente por las aportaciones de los avances de las técnicas de imagen en estudios clínicos, pero sigue existiendo una controversia sobre si existe la degeneración de los fotorreceptores en modelos experimentales de HTO. Poder estudiar la población total de conos, realizar sofisticadas pruebas de análisis de imagen *in vivo*, así como proceder a su confirmación mediante estudios histológicos, permitirá avanzar considerablemente en una de las cuestiones que últimamente suponen una discusión en la comunidad científica de la oftalmología y la visión.

3.3 Neuroprotección en modelos de degeneración retiniana.

El concepto de Neuroprotección hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula con efectos que potencialmente previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso.

Se ha demostrado un efecto neuroprotector de distintos agentes neuroprotectores sobre la población de fotorreceptores en modelos de fototoxicidad inducida por luz tanto en rata como en ratón (Organisciak y Vaughan, 2010; Kolomeyer y Zarbin, 2014). De hecho, diferentes estudios documentan los efectos neuroprotectores de los agonista alfa-2 adrenérgicos (Wen et al. 1996), así como de factores tróficos incluyendo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (LaVail et al. 1992; Gao et al. 2002; Kano et al. 2002; Okoye et al. 2003; Hojo et al. 2004; Gauthier et al. 2005; Wilson et al. 2007), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (LaVail et al. 1992, 1998; Agarwal et al. 2002; Wen et al. 2006, 2012; Joly et al. 2007; McGill et al. 2007; Li et al. 2010), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Cao et al. 2001; Imai et al. 2005; Paskowitz et al. 2007) y el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) (Faktorovich et al. 1992; Masuda et al. 1995; Wen et al. 1996; Agarwal et al. 2002; O'Driscoll et al. 2008).

Un extenso número de estudios experimentales ha establecido los efectos neuroprotectores de los agonistas alfa-2 selectivos contra una gran variedad de modelos de lesión (Wheeler et al. 2003; Saylor et al. 2009; Kusari et al. 2010, 2011), incluyendo la pérdida de CGR inducida por isquemia

transitoria (Lafuente et al. 2002; Avilés-Trigueros et al. 2003; Mayor Torroglosa et al. 2005; Vidal-Sanz et al. 2007), daño retiniano inducido por HTO (Lambert et al. 2011) y degeneración de fotorreceptores inducido por luz (Wen et al. 1996).

Es posible que la supervivencia neuronal mediante el tratamiento con alfa-2 agonistas selectivos en modelos de degeneración de fotorreceptores esté relacionada con la sobre-regulación de los factores tróficos (Gao et al. 2002; Lönnngren et al. 2006), con la señal de activación de la kinasa extracelular (Peng et al. 1998) o con la trans-activación de los factores de crecimiento epidermal (Harun-Or-Rashid et al. 2014) a través de la activación de la células de Müller.

Los factores tróficos son sustancias endógenas con funciones cruciales en el desarrollo neuronal así como en la supervivencia de éstas. En general, sus funciones se relacionan con promover la proliferación, regeneración, maduración y/o supervivencia de las neuronas (Kolomeyer y Zarbin, 2014).

Por ejemplo la administración intravítrea de neurotrofinas como el BDNF, neurotrofina-4 y CNTF ha demostrado prevenir la muerte de CGR inducida por lesión del nervio óptico (Mansour-Robaey et al. 1994; Peinado-Ramón et al. 1996; Vidal-Sanz et al. 2000; Parrilla-Reverter et al. 2009).

Estudios previos sobre la administración intravítrea de BDNF (LaVail et al. 1992; Kano et al. 2002; Okoye et al. 2003; Hojo et al. 2004; Gauthier et al. 2005; Wilson et al. 2007), PEDF (Cao et al. 2001; Imai et al. 2005; Paskowitz et al. 2007), bFGF (Faktorovich et al. 1992; Masuda et al. 1995; Wen et al. 1996; Agarwal et al. 2002; O'Driscoll et al. 2008) o CNTF (LaVail et al. 1992, 1998; Agarwal et al. 2002; Wen et al. 2006, 2012; Li et al. 2010), han demostrado la efectiva prevención de la neurodegeneración de los fotorreceptores inducida mediante fototoxicidad (Kolomeyer y Zarbin, 2014).

Parte de los trabajos de esta Tesis Doctoral se centraran en el análisis de los efectos que estos factores neurotróficos tienen en el recate de los fotorreceptores en un nuevo modelo focal de fototoxicidad.

3.4 Identificación y análisis de distintas poblaciones celulares en la retina.

En la identificación de las poblaciones celulares neuronales podemos hacer una subdivisión en dos apartados. El primero se centraría en la distinción anatómo-morfológica realizado mediante procedimientos clásicos de tinciones inespecíficas de tejidos, entre los que cabría destacar la tinción de hematoxilina y eosina (HE). Y por otro lado, distinguiríamos un análisis más específico, centrado en el análisis exclusivo de la población en estudio; esta identificación se realiza principalmente mediante dos procedimientos metodológicos, el trazado neuronal, y la detección de marcadores moleculares: proteínas o ARNm.

Las únicas células en la retina que emiten un único axón que abandona la retina, son las CGR. Por lo tanto, la utilización del procedimiento de trazado neuronal mediante transporte retrógrado permite la identificación selectiva de esta población celular retiniana (Thanos et al. 1987; Vidal-Sanz et al. 1988; Villegas-Pérez et al. 1988; Woldemussie et al. 2001).

La detección de marcadores moleculares se realiza mediante distintos procedimientos estandarizados. La utilización de técnicas de manipulación genética ha servido para identificar poblaciones retinianas, añadiendo un gen chivato bajo la expresión de un promotor de un gen específico para el tipo celular, ya sea para las CGR (*Feng et al. 2000; Bernstein et al. 2006, 2007; Murata et al. 2008; Raymond et al. 2008*) o para fotorreceptores (*Chen et al. 2013; Wahlin et al. 2013*). Este procedimiento es habitual en ratones pero casi inexistente en otros vertebrados mamíferos. La detección de ARNm mediante hibridación in situ usando sondas de genes que se expresan específicamente en la población celular a estudiar, es una técnica efectiva aunque no ampliamente extendida, entre otros factores, por su complicación técnica y su incompatibilidad con el uso de anticuerpos, por ejemplo la hibridación in situ del ARNm de la γ -sinucleína identifica prácticamente la totalidad de CGR de ratón (*Soto et al. 2008, 2010; Sugurcheva et al. 2008 Nguyen et al. 2011*). Esta técnica, junto con el análisis cuantitativo del ARNm, ha servido para determinar la afectación de los fotorreceptores, en particular de los conos, en un modelo de glaucoma en mono (*Pelzel et al. 2006*). Por último la inmunocitoquímica o inmunohistofluorescencia, supone la metodología más extendida de identificación celular, la utilización de la reacción anticuerpo-antígeno, es un procedimiento metodológicamente sencillo, y realmente accesible, por la existencia de gran cantidad de anticuerpos comerciales al alcance de los investigadores, utilizable en tejidos de cualquier especie, y con posibilidad de detectar distintas proteínas en un mismo procedimiento. La elección de la proteína a inmunodetectar es quizás la clave para el éxito de la identificación celular.

En los siguientes sub-apartados se expone, de manera concreta, para cada una de las poblaciones analizadas en los trabajos de esta Tesis Doctoral los precedentes en procedimientos de identificación celular.

3.4.1 Células Ganglionares de Retina.

Como se señalaba anteriormente, en la capa de CGR no sólo se encuentran estas células, por este motivo, se hace necesaria su identificación y diferenciación de las células amacrinas desplazadas que se encuentran en igual proporción en la capa de CGR de roedores (*Cowey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Dräger y Olsen, 1981; Perry et al. 1983; Jeon et al. 1998*).

A finales de los 70, Fukuda y cols. (1977) y Schober y Gruschka (1977) mediante tinciones celulares inespecíficas y utilizando criterios de tamaño y de morfología al microscopio óptico, identificaron las CGR. Mediante este método no es factible la diferenciación de forma inequívoca de las CGR pequeñas de las células amacrinas desplazadas (*Dräger y Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry et al. 1983; Jeon et al. 1998*) tanto en secciones histológicas como en retinas montadas a plano, ya que se solapan en su tamaño (*Villegas-Pérez et al. 1988, 1993*), por lo que este método se utiliza poco en la actualidad.

Un método que permite la identificación inequívoca de las CGR, puesto que éstas son las únicas células de la retina que emiten un único axón retinofugal, es la identificación mediante la utilización de

trazadores neuronales retrógrados aplicados en los terminales axonales o en los axones de estas células.

Los trazadores neuronales se transportan retrógradamente por los axones retinofugales de las CGR, acumulándose en el soma celular y sus dendritas (Vidal-Sanz et al. 1988, 1993, 2001; Peinado-Ramón et al. 1996; Sellés-Navarro et al. 1996; Wang et al. 2000; Lafuente López-Herrera et al. 2002). La aplicación de los trazadores se puede realizar en el muñón del nervio óptico o en las principales regiones dianas de proyección de los axones de las CGR en el cerebro (colículo superior (CS) o NGL).

Se han utilizado distintos tipos de trazadores con diferentes propiedades, como la peroxidasa de rábano (HRP) (Perry, 1981), las carbocianinas: Dil (carbocianina dye) (Vidal-Sanz et al. 1988) y el 4Di-10ASP (Thanos et al. 1993; Lafuente et al. 2002a), el azul rápido (Vidal-Sanz et al. 1988; Villegas-Pérez et al. 1988a), rodaminas (Thanos et al. 1987) principalmente el dextrano tetrametil-rodamina (DTMR) (Woldemussie et al. 2001), y el Fluorogold (FG). El FG es el neurotrazador más utilizado actualmente en la mayoría de los laboratorios (Peinado-Ramón et al. 1996; Sellés-Navarro et al. 1996; Wang et al. 2000; Vidal-Sanz, 2001; Danias et al. 2002; Lafuente et al. 2002a). En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente el contaje y distribución de las CGR trazadas retrógradamente con FG aplicado en los CS o en el muñón ocular del nervio óptico seccionado intraorbitalmente, tanto en rata como en ratón. El trazador neuronal puede transportarse activamente por medio de vesículas como en el caso del FG (Schmued et al. 1986, 1989; Wessendorf, 1991) o de la hidroxistilbamidina metano-sulfonato (OHSt) (Köbber et al. 2000; Cheunswang y Morris, 2005) marcándose únicamente el soma y las dendritas primarias, o por difusión pasiva a través de la membrana como ocurre con dextrano de rodamina y con las carbocianinas, acumulándose en el soma celular, en las dendritas y en el axón.

Otra metodología ampliamente extendida para la identificación celular, en el caso de las CGR, es la identificación de éstas mediante la detección de **marcadores moleculares específicos**, ya sea identificando ARNm o proteínas.

Para ser considerados buenos marcadores deberían ser expresados específicamente por las CGR y no por otros tipos neuronales de la retina; además, su expresión debería englobar una gran proporción de la población de las CGR acercándose a la totalidad y es necesario que no cambie su patrón de expresión después de la lesión retiniana. Se han inmunodetectado varias proteínas (Dräger et al. 1984; McKerracher et al. 1989; Canola et al. 2007) como el Thy 1, antígeno específico de las CGR (Barnstable y Drager, 1984; Perry et al. 1984) localizado en la membrana plasmática, con los inconvenientes de no reconocer todos los subtipos de CGR (Dabin y Barnstable, 1995; Schlamp et al. 2001; Huang et al. 2006) y cambiar su patrón de expresión después de lesionar la retina (Dabin y Barnstable, 1995; Schlamp et al. 2001; Chidlow et al. 2005) sin que ocurra la muerte o desaparición de las CGR, lo que a priori merma o incluso invalida su uso en situaciones patológicas y experimentales. El Bex1/2 reconoce los somas de las CGR y sus proyecciones (Bernstein et al. 2006), la expresión del Bex1/2 en el axón entorpece el análisis de imagen por lo que se compromete la correcta cuantificación automática de las células.

La detección de ARNm mediante hibridación in situ con sondas de genes que se expresan específicamente en CGR, es una técnica efectiva pero poco utilizada por ser metodológicamente más complicada y cara, además de suponer la incompatibilidad con la utilización de la

inmunoidentificación con anticuerpos. Por ejemplo la hibridación in situ del ARNm de la γ -sinucleína, identifica prácticamente la totalidad de la población de CGR de ratón (Soto et al. 2008, 2010; Sugurcheva et al. 2008).

La manipulación genética ha supuesto una metodología correcta para la identificación de las CGR mediante el acoplamiento de un gen chivato bajo la expresión de un promotor de un gen específico de las CGR (Feng et al. 2000; Bernstein et al. 2006, 2007; Murata et al. 2008; Raymond et al. 2008) en ratones.

El desarrollo de un anticuerpo contra *RNA-binding protein with multiple splicing* (RBPMS) ha supuesto un nuevo marcador molecular específico para la identificación de CGR (Kwong et al. 2009, 2011, 2013) en varias especies de mamíferos, ya que es capaz de identificar exclusivamente el soma de las CGR en retinas de ratón, rata, cobaya, conejo, y mono (Rodríguez et al. 2014).

La familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU (Pit-Oct-Unc) al que pertenecen el Brn3a, Brn3b y el Brn3c, se localizan exclusivamente en el núcleo de las CGR, participando fundamentalmente en la regulación genética (Eng et al. 2004). A nivel funcional, su papel radica en la diferenciación, supervivencia y elongación axonal durante el desarrollo de las CGR en ratones (Wang et al. 2002). El Brn3b ha sido utilizado para la identificación de las CGR en ratones (Buckingham et al. 2008); pero, en ratas sólo se expresa en el 20% en la población total de CGR (Leahy et al. 2004; Bernstein et al. 2006). El Brn3a comienza a expresarse en el desarrollo de la retina de ratón y se mantiene en el adulto. El Brn3a se expresa específicamente en las CGR que proyectan al CS contralateral y al NGL (aunque éstas últimas son una minoría) en ratones adultos (Quina et al. 2005). Experimentos realizados en nuestro laboratorio han determinado que el ARNm y el nivel de expresión del Brn3a disminuyen con el tiempo, tanto después de cortar como de aplastar el nervio óptico (Agudo et al. 2008, 2009). La inmunodetección del Brn3a ha demostrado ser un marcador fidedigno para la identificación y cuantificación de las CGR en condiciones normales y después de la lesión por axotomía en rata y ratón albinos (Nadal-Nicolás et al. 2009, 2012, 2014, 2015; Galindo-Romero et al. 2011) o tras la HTO (Salinas-Navarro et al. 2009, 2010).

3.4.2 Fotorreceptores.

En el caso de la identificación de fotorreceptores, la metodología se restringe a la utilización de tinciones clásicas como la HE o el azul de toluidina, y el posterior análisis de la CNE, por lo que la identificación se hace de la población total de fotorreceptores y no de las subpoblaciones de bastones y cada tipo de conos. Para conseguir la identificación de las diferentes subpoblaciones de células fotorreceptoras se hace necesaria la utilización de **marcadores moleculares**, ya sea identificando ARNm o proteínas. Los marcadores moleculares por excelencia para la identificación de las subpoblaciones de fotorreceptores son las opsinas, presentes en los segmentos externos de los fotorreceptores y específicas para cada uno de los subtipos de células fotorreceptoras.

3.4.2.1 Bastones.

La retina de rata adulta tiene alrededor de $1,75 \times 10^7$ bastones (*Lashley, 1932; Cone, 1963*). Debido a la enorme cantidad de este tipo de fotorreceptores en ratón y rata no se puede realizar un análisis anatomo-histológico para determinar su número exacto y determinar su distribución espacial. Una estrategia que ha sido utilizada para poder determinar densidades y distribución espacial de los bastones ha sido el análisis de la absorvancia de la rodopsina a través de toda la retina mediante fotometría (*Williams y Webbers, 1995*).

La identificación de la rodopsina, proteína presente de manera específica en los segmentos externos de los bastones, es posiblemente la mejor estrategia de identificación de éstos, y aunque la cuantificación automática aun no es posible por restricciones técnicas, pero es muy útil para su estudio anatómico y la determinación de su integridad en modelos de degeneración retiniana.

3.4.2.2 Conos.

En 1992, Ágoston Szél y Pál Röhlich demostraron la presencia de dos tipos de conos en la retina de rata adulta utilizando anticuerpos contra pigmentos visuales por primera vez. Estos anticuerpos se denominaron OS-2 para los conos verdes y COS-1 para los azules. Tres años antes habían demostrado lo mismo en la retina de conejo, identificando también los bastones con el anticuerpo AO (*Szel et al.1986; Szel et al.1988; Szel y Röhlich, 1992*). En el caso del ratón los tipos de conos se ha estudiado más en profundidad, el número y la distribución de los conos en el ratón no es homogénea, varía dependiendo de la cepa (*Lyubarsky et al.1999; Applebury et al.2000; Jelcick et al.2011; Fei 2003; Szel et al.1994*). Además de la utilización de técnicas de inmunohistoquímica, el uso de otras técnicas han aportado avances para la identificación de los distintos tipos de fotorreceptores, como los tintes clásicos de azul de toluidina (*LaVail, 1976*), la electroretinografía (*Green, 1971*), la utilización de lectinas (*Blanks y Johnson, 1984*) y más recientemente el análisis de las secuencias de los genes de opsinas (*Yokoyama 2000 y 2002*).

3.4.3 Métodos cuantitativos.

Los métodos de cuantificación de fotorreceptores han sido desarrollados tradicionalmente contando de forma manual habitualmente, en imágenes individuales adquiridas de diferentes áreas de la retina, el número de estas células. El número de imágenes analizadas varía de 3 a 20, según los autores. Con estos datos cuantitativos se estima, extrapolando, una densidad media global. Sin embargo, esta metodología está sujeta a subjetividad tanto a la hora de fotografiar como de contar, además un muestreo de imágenes pequeño puede dar lugar a errores grandes en la estimación final, ya que la densidad real de los fotorreceptores puede variar en distintas áreas de la retina.

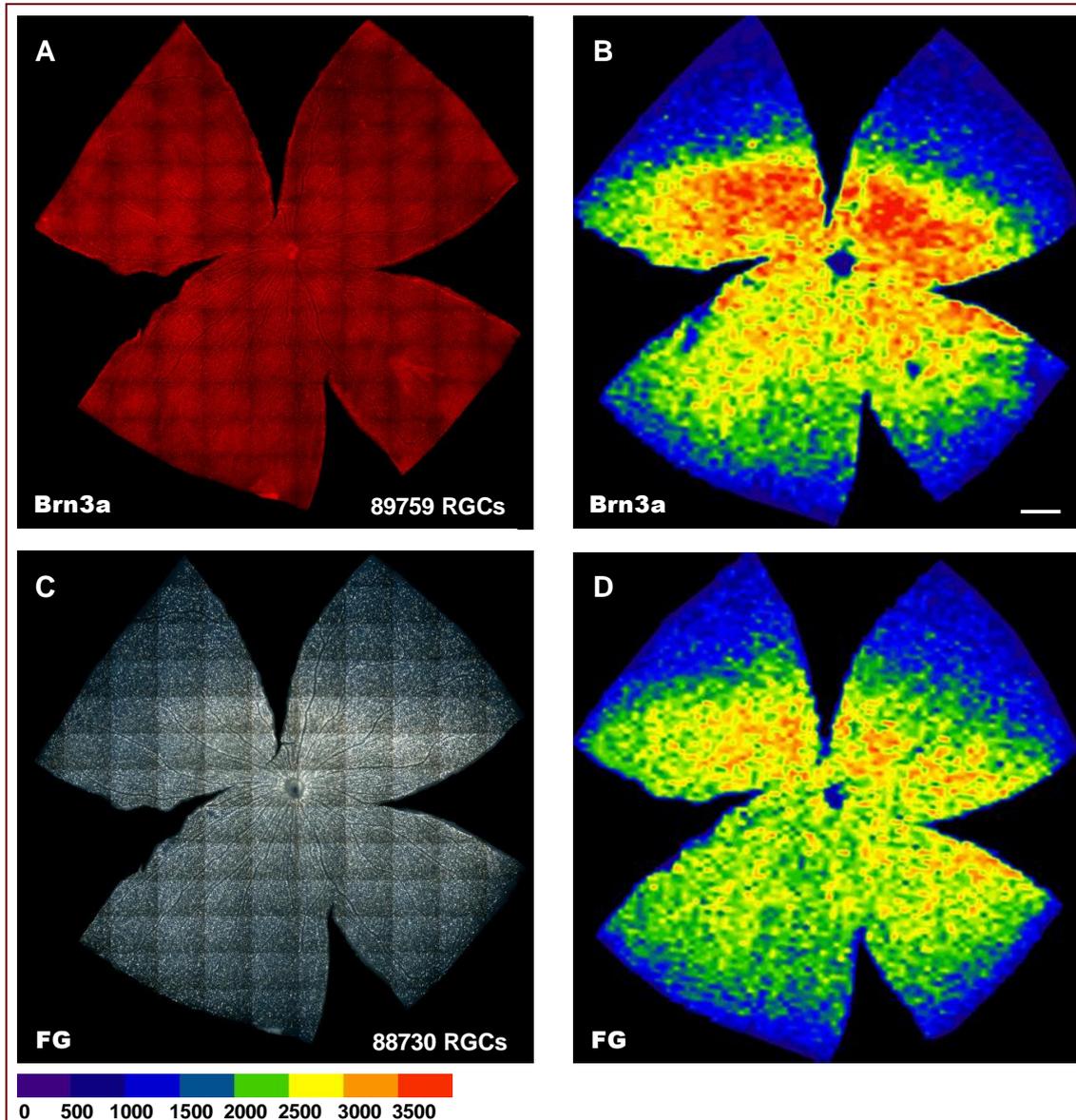


Figura 6: Cuantificación y distribución de las CGR en la retina de rata adulta. **A:** Retina completa montada a plano en la que se han detectado las CGR por su expresión de Brn3a. Abajo a la derecha se muestra en número de CGR-Brn3a+ contadas automáticamente **C:** La misma retina que en A en la que se observan las CGR trazadas con fluorogold (FG). Abajo a la derecha se muestra en número de CGR-FG+ contadas automáticamente **B y D** Mapas de isodensidades que representan la distribución espacial de las CGR-Brn3a+ y de las CGR-FG+ respectivamente. Tomado de Nadal-Nicolás et al. 2009.

En los últimos años se han desarrollado procedimientos de análisis de imagen de forma computerizada que han permitido avances en el conocimiento del número total y distribución espacial de las CGR marcadas retrógradamente de forma selectiva con trazadores neuronales (**Figura 6 C**) o inmunoidentificadas por la expresión de Brn3a, que es una proteína que se expresa específicamente en esta población neuronal (**Figura 6 A**). Estos estudios han sido realizados tanto en rata como en ratón (*Nadal-Nicolas et al. 2009; Salinas-Navarro et al.2009; Galindo-Romero et al. 2011*) y han facilitado información sobre el número, densidad, distribución espacial y tamaño relativo de las CGR (**Figura 6 B y D**). Estos procedimientos suponen la automatización de manera objetiva, fiable y reproducible de la cuantificación de la población de CGR en modelos experimentales, lo que supone a su vez una herramienta de análisis cuantitativo de excepcional valor.

Conocer el número y distribución topográfica de los conos S y conos L en ratas y ratones adultos normales permite sentar las bases para cuantificar el curso temporal dedegeneración de estas células en modelos experimentales de enfermedades como la degeneración macular asociada a la edad o la retinosis pigmentaria e incluso en modelos de glaucoma, donde a día de hoy existe controversia sobre la afectación de la retina externa. Por último resaltar que la capacidad de evaluación del efecto que, en su supervivencia, tienen sustancias potencialmente neuroprotectoras y su posible cuantificación de manera objetiva, aporta una herramienta de excepcional valor en los ensayos de neuroprotección.

4 COMPENDIO DE PUBLICACIONES.

Todos los artículos pueden encontrarse en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ortin-martinez>

1. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jun;51(6):3171-83. doi: 10.1167/iovs.09-4861.Epub 2010 Jan 13.

Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats.

Ortín-Martínez A¹, Jiménez-López M¹, Nadal-Nicolás FM², Salinas-Navarro M¹, Alarcón-Martínez L¹, Sauvé Y³, Villegas-Pérez MP¹, Vidal-Sanz M¹, Agudo-Barriuso M².

Author information:

(1) Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Espinardo, Murcia, (2) Spain. Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, Murcia, Spain, (3) Ophthalmology, University of Alberta, Edmonton, Canada.

PURPOSE: To quantify the whole population of S- and L-cones in the albino (Sprague-Dawley, SD) and pigmented (Piebald Virol Glaxo, PVG) rats and to study their topographical distribution within the retina.

METHODS: Retinal radial sections and whole-mounted retinas were double immunodetected with antibodies against UV-sensitive and L-opsins to detect the S- and L-cones, respectively. Two automated routines were developed to quantify the whole population of S- and L-cones. Detailed isodensity maps of each cone type were generated. In both strains, the presence of dual cones was detected, these were semiautomatically quantified and their distribution determined. The matching distribution of retinal ganglion cells (RGC) and L-cones was attained by double immunodetection of Brn3a and L-opsin, respectively.

RESULTS: The mean number \pm SEM of L- or S-cones in SD and PVG retinas was $231,736 \pm 14,517$ and $239,939 \pm 6,494$ or $41,028 \pm 5,074$, and $27,316 \pm 2,235$, respectively. There was an increasing gradient of S-cone density along the inferonasal quadrant, although the highest densities were found in the retinal rims. The distribution of L-cones seemed to be complementary to the S-cones. The highest densities were observed in the superior nasotemporal axis, paralleling the distribution of Brn3a-positive RGC.

CONCLUSIONS: These data establish, for the first time, the total number and the topographical distribution of S- and L-cones in two rat strains and demonstrate the correlation of L-cones and RGC spatial distribution.

PMID: 20071667 [PubMed - indexed for MEDLINE]



2. PLoS One. 2014 Jul 16;9(7):e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392.eCollection 2014.

Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.

Ortín-Martínez A¹, Nadal-Nicolás FM², Jiménez-López M¹, Albuquerque-Béjar JJ², Nieto-López L¹, García-Ayuso D², Villegas-Pérez MP¹, Vidal-Sanz M¹, Agudo-Barriuso M².

Author information:

(1) Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, Spain; Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Espinardo, Murcia, Spain. (2) Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, Spain.

We purpose here to analyze and compare the population and topography of cone photoreceptors in two mouse strains using automated routines, and to design a method of retinal sampling for their accurate manual quantification. In whole-mounted retinas from pigmented C57/BL6 and albino Swiss mice, the longwave-sensitive (L) and the shortwave-sensitive (S) opsins were immunodetected to analyze the population of each cone type. In another group of retinas both opsins were detected with the same fluorophore to quantify all cones. In a third set of retinas, L-opsin and Brn3a were immunodetected to determine whether L-opsin+cones and retinal ganglion cells (RGC) have a parallel distribution. Cones and RGC were automatically quantified and their topography illustrated with isodensity maps. Our results show that pigmented mice have a significantly higher number of total

cones (all-cones) and of L-opsin+cones than albinos which, in turn, have a higher population of S-opsin+cones. In pigmented animals 40% of cones are dual (cones that express both opsins), 34% genuine-L (cones that only express the L-opsin), and 26% genuine-S (cones that only express the S-opsin). In albinos, 23% of cones are genuine-S and the proportion of dual cones increases to 76% at the expense of genuine-L cones. In both strains, L-opsin+cones are denser in the central than peripheral retina, and all-cones density increases dorso-ventrally. In pigmented animals S-opsin+cones are scarce in the dorsal retina and very numerous in the ventral retina, being densest in its nasal aspect. In albinos, S-opsin+cones are abundant in the dorsal retina, although their highest densities are also ventral. Based on the densities of each cone population, we propose a sampling method to manually quantify and infer their total population. In conclusion, these data provide the basis to study cone degeneration and its prevention in pathologic conditions.

PMCID: PMC4100816 PMID: 25029531 [PubMed - in process]



3. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Aug 28;54(8):5888-900. doi:10.1167/iovs.13-12643.

Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival.

García-Ayuso D¹, Orfín-Martínez A¹, Jiménez-López M¹, Galindo-Romero C¹, Cuenca N², Pinilla I³, Vidal-Sanz M¹, Agudo-Barriuso M⁴, Villegas-Pérez MP¹.

Author information:

(1) Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, Spain. (2) Departamento de de Biotecnología, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain. (3) Servicio de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain. (4) Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, Spain.

PURPOSE: To investigate the spatiotemporal relationship between rod and cone degeneration in the P23H-1 rat.

METHODS: Control Sprague-Dawley (SD) and P23H-1 rats of ages ranging from P30 to P365 were used. Retinas were processed for whole mounts or cross sections and rods and cones were immunodetected. We used newly developed image analysis techniques to quantify the total population of L/M cones (the most abundant cones in the rat) and analyzed the rings of rod-cone degeneration.

RESULTS: In P23H-1 rats, rod degeneration occurs rapidly: first the rod outersegment shortens, at P30 there is extensive rod loss, and by P180 rod loss is almost complete except for the most peripheral retina. The numbers of L/M cones are, at all postnatal ages, lower in P23H-1 rats than in control SD rats, and decrease significantly with age (by P180). Rod and cone degeneration is spatiotemporally related and occurs in rings that appear already at P90 and spread throughout the entire retina. At P180, the rings of rod-cone degeneration are more abundant in the equatorial retina and are larger in the dorsal retina.

CONCLUSIONS: This work describes for the first time that in the P23H-1 rat, rod and cone degeneration is spatiotemporally related and occurs in rings. Cone loss follows rod loss and starts very soon, even before P30, the first age analyzed here. The characteristics of the rings suggest that secondary cone degeneration is influenced by retinal position and/or other intrinsic or extrinsic factors.

PMID: 23908186 [PubMed - indexed for MEDLINE]



4. PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e113798. doi: 10.1371/journal.pone.0113798.eCollection 2014.

A Novel In Vivo Model of Focal Light Emitting Diode-Induced Cone-Photoreceptor Phototoxicity: Neuroprotection Afforded by Brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.

Orfín-Martínez A¹, Valiente-Soriano FJ¹, García-Ayuso D¹, Alarcón-Martínez L¹, Jiménez-López M¹, Bernal-Garro JM¹, Nieto-López L¹, Nadal-Nicolás FM¹, Villegas-Pérez MP¹, Wheeler LA², Vidal-Sanz M¹

Author information:

(1)Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, and Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arixaca), Murcia, Spain. (2)Zeteo Drug Discovery LLC, Irvine, California, United States of America.

We have investigated the effects of light-emitting diode (LED)-induced phototoxicity (LIP) on cone photoreceptors and their protection with brimonidine (BMD), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), pigment epithelium-derived factor (PEDF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) or basic fibroblast growth factor (bFGF). In anesthetized, dark adapted, adult albino rats a blue (400 nm) LED was placed perpendicular to the cornea (10 sec, 200 lux) and the effects were investigated using Spectral Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT) and/or analysing the retina in oriented cross-sections or wholemounts immune-labelled for L- and S-opsin and counterstained with the nuclear stain DAPI. The effects of topical BMD (1%) or, intravitreally injected BDNF (5 µg), PEDF (2 µg), CNTF (0.4 µg) or bFGF (1 µg) after LIP were examined on wholemounts at 7 days. SD-OCT showed damage in a circular region of the superotemporal retina, whose diameter varied from 1,842.4±84.5 µm (at 24 hours) to 1,407.7±52.8 µm (at 7 days). This region had a progressive thickness diminution from 183.4±5 µm (at 12 h) to 114.6±6 µm (at 7 d). Oriented cross-sections showed within the light-damaged region of the retina massive loss of rods and cone-photoreceptors. Wholemounts documented a circular region containing lower numbers of L- and S-cones. Within a circular area (1 mm or 1.3 mm radius, respectively) in the left and in its corresponding region of the contralateral-fellow-retina, total L- or S-cones were 7,118±842 or 661±125 for the LED exposed retinas (n=7) and 14,040±1,860 or 2,255±193 for the fellow retinas (n=7), respectively. BMD, BDNF, PEDF and bFGF but not CNTF showed significant neuroprotective effects on L- or S-cones. We conclude that LIP results in rod and cone-photoreceptor loss, and is a reliable, quantifiable model to study cone-photoreceptor degeneration. Intravitreal BDNF, PEDF or bFGF, or topical BMD afford significant cone neuroprotection in this model.

PMCID: PMC4252057 PMID: 25464513 [PubMed - in process]



5. Exp Eye Res. 2015 Mar;132:17-33. doi: 10.1016/j.exer.2015.01.006. Epub 2015 Jan 7.

Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.

Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barruoso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M.

Author information:

(1)Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, and Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arixaca), 30100 Murcia, Spain.

To investigate the long-term effects of laser-photocoagulation (LP)-induced ocular hypertension (OHT) in the innermost and outermost (outer-nuclear and outer segment)-retinal layers (ORL). OHT was induced in the left eye of adult rats. To investigate the ganglion cell layer (GCL) wholemounts were examined at 1, 3 or 6 months using Brn3a-immunodetection to identify retinal ganglion cells (RGC) and DAPI-staining to detect all nuclei in this layer. To study the effects of LP on the ORL up to 6 months, retinas were: i) extracted fresh to quantify the levels of rod-, S- and L-opsin; ii) cut in cross-sections for morphometric analysis, or; iii) prepared as wholemounts to quantify and study retinal distributions of entire populations of RGC (retrogradely labeled with fluorogold, FG), S- and L-cones (immunolabeled). OHT resulted in wedge-like sectors with their apex on the optic disc devoid of Brn3a⁺RGC but with large numbers of DAPI⁺nuclei. The levels of all opsins diminished by 2 weeks and further decreased to 20% of basal-levels by 3 months. Cross-sections revealed focal areas of ORL degeneration. RGC survival at 15 days represented approximately 28% and did not change with time, whereas the S- and L-cone populations diminished to 65% and 80%, or to 20 and 35% at 1 or 6 months, respectively. In conclusion, LP induces in the GCL selective RGC loss that does not progress after 1 month, and S- and L-cone loss that progresses for up to 6 months. Thus, OHT results in severe damage to both the innermost and the ORL.

Copyright © 2015. Published by Elsevier Ltd.

PMID: 25576772 [PubMed - as supplied by publisher]

5 CONCLUSIONES GENERALES

El número total de conos que expresan la opsina-L es similar en la rata Sprague-Dawley albina y la pigmentada, Piebald Virol Glaxo. Sin embargo, en el ratón pigmentado C57/BL6 la población de conos que expresan opsina-L es significativamente mayor que en el ratón albino Swiss.

La distribución topográfica de los conos que expresan opsina-L es similar en ambas especies y cepas. Las mayores densidades se observan en el eje nasotemporal superior, alrededor del nervio óptico se encuentran las densidades medias, y estas densidades disminuyen gradualmente hacia la periferia.

En ambas especies, el número total de conos que expresan opsina-S es significativamente menor en la cepa pigmentada que en la cepa albina.

En estas cuatro cepas de roedores, existe un gradiente creciente de conos que expresan la opsina-S a lo largo del cuadrante inferonasal. En rata, tanto albina como pigmentada, las mayores densidades se encuentran en la extrema periferia. En el ratón albino, la retina dorsal está densamente poblada por conos que expresan opsina-S mientras que en el ratón pigmentado está prácticamente despoblada.

En ratón, la población de conos que expresan opsina-S es, en densidad, cuatro veces mayor que en rata.

En ambas cepas de rata, los conos duales representan alrededor del 3% de la población total de conos y se encuentran predominantemente en la extrema periferia de la retina. En el ratón C57/BL6, los conos duales suponen el 40% de los conos y se encuentran principalmente en la retina ventral. En el ratón albino Swiss, los conos duales asciende al 73% de la población total de conos y se sitúan por toda la retina. En esta cepa de ratón albino casi un 95% de los conos expresan la opsina-S.

En las cuatro cepas analizadas, la distribución topográfica de las CGR y los conos-L muestran una marcada correspondencia, siendo ambos tipos celulares más densos en la estría visual.

En la rata distrófica P23H-1 existe una pérdida de conos que expresan opsina-L que es ya significativa a P30 y que continúa progresando a la largo de la vida del animal.

En la rata P23H-1 la degeneración de los bastones progresa rápidamente y es prácticamente completa a P180 exceptuando la extrema periferia retiniana.

La degeneración de bastones y conos en la rata P23H-1 ocurre en áreas con forma circular que aumentan en número y tamaño entre P90 y P180, y a este tiempo posnatal tardío estas áreas de degeneración son más abundantes en la retina ecuatorial y de mayor tamaño en la retina dorsal.

En la rata P23H-1, la degeneración de bastones y conos está relacionada espaciotemporalmente puesto que los espacios circulares de degeneración aparecen cuando la mayor parte de los bastones han degenerado y la muerte de éstos es más rápida y severa en la retina dorsal que en la ventral.

La fototoxicidad inducida por LED es un modelo reproducible, fiable y cuantificable de degeneración focal de fotorreceptores en la estría visual, útil para el estudio de la pérdida de conos provocada por el daño por luz.

La progresión de daño focal inducido por la fototoxicidad mediante el LED puede ser evaluado in vivo con la SD-OCT.

La administración intravítrea de BDNF, PEDF o bFGF, o la administración tópica de brimonidina antes o después de la fotoexposición del LED proporciona neuroprotección significativa sobre los conos.

La hipertensión ocular provoca una pérdida selectiva de CGR en la capa de la CGR que no progresa después de 1 mes.

Tras la hipertensión ocular, la retina desarrolla de forma progresiva una patología de la retina externa caracterizada por la disminución de la expresión de todas las opsinas y una disminución del número de segmentos externos de conos-L y conos-S por toda la retina de manera difusa y con la presencia de áreas vacías de segmentos externos de ambos tipos de conos en forma de parches. Esto último también podría corresponder a las áreas focales de degeneración de la capa externa de la retina observadas en las secciones transversales.

El patrón geográfico de pérdida de conos tras la hipertensión ocular aparece independiente de la pérdida de CGR y aboga por un mecanismo adicional de daño a la retina.

6 GENERAL CONCLUSIONS

The total number of L-opsin⁺cones is similar in albino Sprague-Dawley and pigmented Piebald Vireo Glaxo rats. In pigmented C57/Bl6 mice, however, the L-opsin⁺cones population is significantly bigger than in albino Swiss mice.

The topography of L-opsin⁺cones is similar in both species and strains. Their highest densities are observed across the superior nasotemporal retinal axis, medium densities are found around the optic nerve, and then their density gradually decreases towards the retinal periphery.

In both species, the total number of S-opsin⁺cones is significantly smaller in the pigmented than in the albino strains.

In these four rodent strains, there is an increasing gradient of S-opsin⁺cones along the inferonasal quadrant. In rats, their highest densities are found in the retinal rim. In albino mice, the dorsal retina is highly populated in S-opsin⁺cones while in pigmented mice this retinal area is almost devoid of them.

In mice, the density of S-opsin⁺cones is four times bigger than in rats.

In in both rat strains, dual cones are around 3% of the total cone population and they are found predominantly in the retinal rim. In C57/Bl6 mice, dual cones are 40% of the cones and are mainly found in the ventral retina. In albino swiss mice dual cones amount to 73% of the cone population and are found across the retina. Thus, in this albino mouse strain almost a 95% of cones express the S-opsin.

In the four rodent strains analyzed here, the topographic distribution of RGC and L-cones shows a pronounced correspondence, being both cell types densest in the visual streak.

In the P23H-1 dystrophic rat strain, there is a loss of L-opsin⁺cones already significant at P30 and that continues through the life of the animal.

In the P23H-1rat, rod degeneration progresses rapidly and is almost complete at P180, except for the retinal rim.

Rod-cone degeneration in the P23H-1 rat occurs in ring-shaped areas that increase in number and size between P90 and P180, and at this latter postnatal time they are more abundant in the equatorial retina and larger in the dorsal retina.

In the P23H-1 rat, rod and cone degeneration is spatiotemporally related because the rings appear when most rods have degenerated and because rod loss is more rapid and severe in the dorsal than in the ventral retina.

LED-induced phototoxicity is a reproducible, reliable and quantifiable model of focal cone degeneration induced in the rat visual streak to study light-induced cone loss.

The progression of the damage of focal cone degeneration induced by LED-phototoxicity might be assessed *in vivo* with SD-OCT.

Intravitreal administration of BDNF, PEDF or bFGF but not CNTF, or topical administration of brimonidine, before or right after led induced photoexposure, results in significant cone neuroprotection.

Ocular hypertension induces in the ganglion cells layer selective RGC loss that does not progress after 1 month.

Following ocular hypertension, the retina develops progressively an outer retinal pathology characterized by a decreased expression of all opsins and a diminished numbers of L- and S-cone outer segments throughout the retina in a diffuse fashion together with the presence of patchy areas lacking both types of cone outer segments. The latter could well correspond to the focal areas of outer retinal layer degeneration observed in cross sections.

The geographical pattern of cone loss after ocular hypertension appears independent of the RGC loss and advocates for an additional mechanism of damage to the retina.

7 BIBLIOGRAFÍA.

- A**garwal N, Martin E, Krishnamoorthy RR, Landers R, Wen R, Krueger S, Kapin MA, Collier RJ (2002) Levobetaxolol-induced Up-regulation of retinal bFGF and CNTF ARNms and preservation of retinal function against a photicinduced retinopathy. *Exp Eye Res.* 74: 445-453.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lonngren U, Sobrado P, Conesa A, Cánovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M (2008) Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis.* 14: 1050-1063.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lonngren U, Salinas-Navarro M, Cánovas I, Nadal-Nicolas FM, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M (2009) Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 424-431.
- Anderson DR, Hendrickson A (1974) Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol.* 13: 771-783.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT (2000) The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron.* 27: 513-523.
- Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* 184: 767-777.
- Ayuso C, Millan JM (2010) Retinitis pigmentosa and allied conditionstoday: a paradigm of translational research. *Genome Med.* 2: 34.
- B**arboni MT, Pangeni G, Ventura DF, Horn F, Kremers J (2011) Heterochromatic flicker electroretinograms reflecting luminance and cone opponent activity in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 6757-6765.
- Barnstable CJ, Dräger UC (1984) Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neurosci.* 11: 847-855.
- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T (2001) Retinal morphology and ERG responsein the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest OphthalmolVis Sci.* 42: 1258-1265.
- Ben-Shlomo G, Bakalash S, Lambrou GN, Latour E, Dawson WW, Schwartz M, Ofri R (2005) Pattern electroretinography in a rat model of ocular hypertension: functional evidence for early detection of inner retinal damage. *Exp Eye Res.* 81: 340-349.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL (2006) Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol. Vis.* 12: 147-55.
- Bernstein SL, Guo Y, SlaterBJ, Puche A, Kelman SE (2007) Neuron stress and loss following rodent anterior ischemic optic neuropathy in double reporter transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2304-2310.
- Bessler P, Klee S, Kellner U, Haueisen J, (2010) Silent substitution stimulation of Sconepathway and L- and M-cone pathway in glaucoma. *Invest OphthalmolVis Sci.* 51: 319-326.
- Blanks JC, Johnson LV (1984) Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25: 546-557.
- Bobu C, Lahmam M, Vuillez P, Ouarour A, Hicks D (2008) Photoreceptor organisation and phenotypic characterization in retinas of two diurnal rodent species: potential use as experimental animal models for human vision research. *Vision Res.* 48: 424-432.
- Bridges CD (1959) Visual pigments of some common laboratory mammals. *Nature.* 184: 1727-1728

- Busch EM, Gorgels TG, Van Norren D (1999) Filling-in after focal loss of photoreceptors in rat retina. *Exp Eye Res.* 68: 485-492.
- Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ (2008) Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* 28: 2735-2744.
- Calkins DJ (2012) Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 31: 702-719.
- Caminos ME (1998) Localización de las Neurotrofinas y sus receptores en el sistema visual: efecto de la regeneración del nervio óptico de la tenca. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Canola K, Angénieux B, Tekaya M, Quiambao A, Naash MI, Munier FL, Schorderet DF, Arsenijevic Y (2007) Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 446-454.
- Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF (2001) In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 1646-1652.
- Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2004) The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 685-693.
- Cepko CL (2012) Emerging gene therapies for retinal degenerations. *J Neurosci.* 32:6415-6420.
- Chen M, Hombrebueno JR, Luo C, Penalva R, Zhao J, Colhoun L, Pandi SP, Forrester JV, Xu H (2013) Age- and light-dependent development of localised retinal atrophy in CCL2(-/-)CX3CR1(GFP/GFP) mice. *PLoS One.* 8: e61381.
- Cheunsuang O, Morris R (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia.* 52: 228-233.
- Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2005) Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis.* 11: 387-396.
- Choi SS, Zawadzki RJ, Lim MC, Brandt JD, Keltner JL, Doble N, Werner JS (2011) Evidence of outer retinal changes in glaucoma patients as revealed by ultrahigh-resolution in vivo retinal imaging. *Br J Ophthalmol.* 95: 131-141.
- Chrysostomou V, Stone J, Stowe S, Barnett NL, Valter K (2008) The status of cones in the rhodopsin mutant P23H-3 retina: light regulated damage and repair in parallel with rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 1116-1125.
- Chrysostomou V, Stone J, Valter K (2009) Life history of cones in the rhodopsin mutant P23H-3 rat: evidence of long-term survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 2407-2416.
- Chrysostomou V, Valter K, Stone J (2009) Cone-rod dependence in the rat retina: variation with the rate of rod damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3017-3023.
- Cone, RA (1963) Quantum relations of the rat electroretinogram. *Journal of General Physiology.* 46: 1267-1286.
- Cowey A, Perry VH (1979) The projection of the temporal retina in rats, studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res.* 35: 457-464.
- Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Nondahl DM (2001) Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study. *Arch Ophthalmol.* 119: 246-250.
- Cuenca N, Fernández-Sánchez 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. *Prog Retin Eye Res.* 43: 17-75.

- D**abin I, Barnstable CJ (1995) Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia*. 14: 23-32.
- Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ (2013) RetNet: The Retinal Information Network. Available at: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>. Accessed June 19, 2013.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T (2002) Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 587-594
- Dowling JE (1967) Visual adaptation: its mechanism. *Science*. 157: 584-585.
- Dowling JE (1987) The retina. An approachable part of the brain. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge (Massachusetts) and London (England).
- Dräger UC, Olsen JF (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 20: 285-293.
- Dräger UC, Hofbauer A (1984) Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature* 309: 624-626.
- Drasdo N, Aldehbi YH, Chiti Z, Mortlock KE, Morgan JE, North RV (2001) The cone PHNR and pattern ERG in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42: 1266-1272.
- Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM (2008) Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One* 3: e3931.
- Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*. 25: 364-366.
- E**ng SR, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE (2004) Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia. *Development*. 131: 3859-3870.
- Ernst W, Kemp CM (1975) Scotopic and photopic dark adaptation of the b wave isolated rat retina. *Nature*. 258: 170-171.
- F**ahmy K, Siebert F, Sakmar TP (1995) Photoactivated state of rhodopsin and how it can form. *Biophys Chem*. 56: 171-181.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci*. 12: 3554-3567.
- Fei Y (2003) Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis*. 9: 31-42.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*. 28: 41-51.
- Fernández-Sánchez L, de Sevilla Müller LP, Brecha NC, Cuenca N (2014) Loss of outer retinal neurons and circuitry alterations in the DBA/2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 55: 6059-6072.
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F (2011) Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics*. 12: 238-249.
- Fukuda Y (1977) A three group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Res*. 119: 327-344.
- Fuchs M, Scholz M, Sendelbeck A, Atorf J, Schlegel C, Enz R, Brandstätter JH (2012) Rod photoreceptor ribbon synapses in DBA/2J mice show progressive age-related structural changes. *PLoS One* 7: e44645.

- G**alindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruso M (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res.* 92: 377-387.
- Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D (2002) Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol.* 120: 797-803.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010) Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91: 800-810.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barruso M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2011) Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis.* 17: 1716-1733.
- García-Feijóo J, Pablo-Júlvez LE (2012) *Manual de Oftalmología.* Elsevier España. ISBN: 84-8086-721-3.
- Gauthier R, Joly S, Pernet V, Lachapelle P, Di Polo A (2005) Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 3383-3392.
- Georgiou AL, Guo L, Francesca Cordeiro M, Salt TE (2014) Electroretinogram and visual-evoked potential assessment of retinal and central visual function in a rat ocular hypertension model of glaucoma. *Curr Eye Res.* 39: 472-486.
- Green DG (1971) Light adaptation in the rat retina: evidence for two receptor mechanisms. *Science.* 174: 598-600.
- Green DG (1973) Scotopic and photopic components of the rat electroretinogram. *J Physiol.* 228: 781-797.
- Greiner JV, Weidman TA, Bodley HD, Greiner CA (1981) Ciliogenesis in photoreceptor cells of the retina. *Exp Eye Res.* 33: 433-446.
- Guo L, Normando EM, Nizari S, Lara D, Cordeiro MF (2010). Tracking longitudinal retinal changes in experimental ocular hypertension using the cSLO and spectral domain-OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 6504-6513.
- H**am WT Jr, Ruffolo JJ Jr, Mueller HA, Clarke AM, Moon ME (1978) Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17: 1029-1035.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 368: 1795-1809.
- He Z, Bui BV, Vingrys AJ (2006) The rate of functional recovery from acute IOP elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47: 4872-4880.
- Heiduschka P, Julien S, Schuettauf F, Schnichels S (2010) Loss of retinal function in aged DBA/2J mice a new insights into retinal neurodegeneration. *Exp Eye Res.* 91: 779-783.
- Hernandez M, Rodriguez FD, Sharma SC, Vecino E (2009) Immunohistochemical changes in rat retinas at various time periods of elevated intraocular pressure. *Mol Vis.* 15: 2696-2709.
- Hoyo M, Abe T, Sugano E, Yoshioka Y, Saigo Y, Tomita H, Wakusawa R, Tamai M (2004) Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 3721-3726.
- Holopigian K, Seiple W, Mayron C, Koty R, Lorenzo M (1990) Electrophysiological and psychophysical flicker sensitivity in patients with primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31: 1863-1868.

- Hombrebueno JR, Tsai MM, Kim HL, De Juan J, Grzywacz NM, Lee EJ (2010) Morphological changes of short-wavelength cones in the developing S334ter-3 transgenic rat. *Brain Res.* 1321: 60-66.
- Huang W, Fileta J, Guo Y, Grosskreutz CL (2006) Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 31: 265-271.
- Hubel DH (2000) *Ojo, cerebro y visión*. Servicio de publicaciones. Universidad de Murcia. ISBN: 84-8371-143-5.
- Hunter JJ, Morgan JI, Merigan WH, Sliney DH, Sparrow JR, Williams DR (2012) The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog Retin Eye Res.* 31: 28-42.
- Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. *J Cell Physiol.* 202: 570-578.
- Jay M (1982) On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol.* 66: 405-416.
- Jelcick AS, Yuan Y, Leehy BD, Cox LC, Silveira AC, Qiu F, Schenk S, Sachs AJ, Morrison MA, Nystuen AM, DeAngelis MM, Haider NB (2011) Genetic variations strongly influence phenotypic outcome in the mouse retina. *PLoS One.* 6: e21858.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 18: 8936-8946.
- Ji Y, Zhu CL, Grzywacz NM, Lee EJ (2012) Rearrangement of the conemosaic in the retina of the rat model of retinitis pigmentosa. *J Comp Neurol.* 520: 874-888.
- John SK, Smith JE, Aguirre GD, Milam AH (2000) Loss of cone molecular markers in rhodopsin-mutant human retinas with retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 6: 204-215.
- Joly S, Pernet V, Chemtob S, Di Polo A, Lachapelle P (2007) Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2311-2320.
- Kalloniatis M, Harwerth RS, Smith EL 3rd, DeSantis L (1993) Colour vision anomalies following experimental glaucoma in monkeys. *Ophthalmic Physiol Opt.* 13: 56-67.
- Kanis MJ, Lemij HG, Berendschot TT, van de Kraats J, van Norren D (2010). Foveal cone photoreceptor involvement in primary open-angle glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 248: 999-1006.
- Kanski JJ (2009) *Oftalmología Clínica*. Sexta Ed. Barcelona, Elsevier España, SL. ISBN 978-84-8086-441-1.
- Kano T, Abe T, Tomita H, Sakata T, Ishiguro S, Tamai M (2002) Protective effect against ischemia and light damage of iris pigment epithelial cells transfected with the BDNF gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 3744-3753.
- Kwong JM, Caprioli J, Piri N (2010) RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1052-1058.
- Kwong JM, Quan A, Kyung H, Piri N, Caprioli J (2011) Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpms immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 9694-9702.
- Kwong JM, Vo N, Quan A, Nam M, Kyung H, Yu F, Piri N, Caprioli J (2013) The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 112: 21-28.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* 62: 327-351.
- Kolb, H (2003) How the retina works. *Am Sci.* 91: 28-35.
- Kolomeyer AM, Zarbin MA (2014) Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases. *Surv Ophthalmol.* 59: 134-165.

- Kusari J, Padillo E, Zhou SX, Bai Y, Wang J, Song Z, Zhu M, Le YZ, Gil DW (2011) Effect of brimonidine on retinal and choroidal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity and laser-treated rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 5424-5431.
- Kusari J, Zhou SX, Padillo E, Clarke KG, Gil DW (2010) Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1044-1051.
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 264: 1604-1608.
- Kendell KR, Quigley HA, Kerrigan LA, Pease ME, Quigley, EN (1995) Primary open-angle glaucoma is not associated with photoreceptor loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 200-205.
- Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2002) Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* 178: 243-258.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002) Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res.* 74: 181-189.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sellés-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002) Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neurosci.* 109: 157-168.
- Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ (2011) Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener.* 6: 4.
- Lashley KS (1932) The mechanism of vision. V. *Journal of Comparative Psychology.* 13: 173-185.
- LaVail MM (1976) Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest Ophthalmol.* 15: 64-70.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 11249-11253.
- LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, Steinberg RH (1997) Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. *Exp Eye Res.* 65: 45-50.
- 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 592-602.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW (2000) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 11488-11493.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zhu Y, Giddy JM, Connor JR, Wax MB (2004) Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn3b. *Exp Eye Res.* 79: 131-140.
- Lei Y, Garrahan N, Hermann B, Becker DL, Hernandez MR, Boulton ME, Morgan JE (2008) Quantification of retinal transneuronal degeneration in human glaucoma: a novel multiphoton-DAPI approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 1940-1945.
- Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clérin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dollé P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA (2004) Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet.* 36: 755-759.
- Levin LA, Nilsson SFE, Ver Hoeve J, Wu SM, Kaufman PL, Alm A (2011) *Adler's Physiology of the Eye.* Saunders Elsevier. ISBN: 978-0-323-05714-1

- Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM (1998) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med.* 4: 967-971.
- Li Y, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, Lavail MM, Laties AM, Wen R (2010) CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One.* 5: e9495.
- Lin B, Masland RH, Strettoi E (2009) Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res.* 88: 589-599.
- Lönngrén U, Näpänkangas U, Lafuente M, Mayor S, Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök F (2006) The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pretreatment. *Brain Res Bull.* 71: 208-218.
- Lu B, Morgans CW, Girman S, Lund R, Wang S (2013) Retinal morphological and functional changes in an animal model of retinitis pigmentosa. *Vis Neurosci.* 19: 1-13.
- Lukats A, Szabo A, Rohlich P, Vigh B, Szel A (2005) Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol Histopathol.* 20: 551-574.
- Lyubarsky AL, Falsini B, Pennesi ME, Valentini P, Pugh EN Jr (1999) UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. *J Neurosci.* 19: 442-455.
- M**achida S, Kondo M, Jamison JA, Khan NW, Kononen LT, Sugawara T, Bush RA, Sieving PA (2000) P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 3200-3209.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 1632-1636.
- Marc RE, Jones BW (2003) Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations. *Mol Neurobiol.* 28: 139-147.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E (2003) Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 22: 607-655.
- Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, Wensel T, Lucas RJ (2007) Neural reprogramming in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 3364-3371.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT (2008) Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis.* 14: 782-806.
- Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP (2006) Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol.* 498: 163-179.
- Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 4: 877-886
- Masuda K, Watanabe I, Unoki K, Ohba N, Muramatsu T (1995) Functional Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by survival-promoting factors in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 2142-2146.
- Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodríguez ME, López-Herrera MP, Avilés-Trigueros M, García-Avilés A, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2005) Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 3825-3835.
- McGill TJ, Prusky GT, Douglas RM, Yasumura D, Matthes MT, Nune G, Donohue-Rolfe K, Yang H, Niculescu D, Hauswirth WW, Girman SV, Lund RD, Duncan JL, LaVail MM (2007) Intraocular CNTF reduces vision in normal rats in a dose-dependent manner. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 5756-5766.

- Mc Kerracher L, Vallee RB, Aguayo AJ (1989) Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina. *Vis Neurosci.* 2: 349-356.
- Michon JJ, Li ZL, Shioura N, Anderson RJ, Tso MO (1991) A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32: 280-284.
- Milam AH, Li ZY, Fariss RN (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 17: 175-205.
- Montalbán-Soler L, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Galindo-Romero C, Bezerra de Sá F, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2012) Retinal compensatory changes after light damage in albino mice. *Mol Vis.* 18: 675-693.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L (2005) Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res.* 24: 217-240.
- Morrison JC, Cepurna YG, Guo WO, Johnson EC (2011) Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 93: 156-164.
- Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M (2008) Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss in vivo by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 5546-5552.
- N**adal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3860-3868.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2012) Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One.* 7: e49830.
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2014) Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat.* 8: 99.
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2015) Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: From the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res.* 131: 12-19.
- Neitz J, Jacobs GH (1986) Reexamination of spectral mechanisms in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 100: 21-29.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N (2011) Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 1176-1181.
- Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol.* 5: 450-473.
- Nork TM, (2000) Acquired color vision loss and a possible mechanism of ganglion cell death in glaucoma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 98: 331-363.
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, Nickells RW, Davis MD, Weber AJ, Vaegan Sarks SH, Lemley HL, Millecchia LL (2000) Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol.* 118: 235-245.
- O**'Driscoll C, O'Connor J, O'Brien CJ, Cotter TG (2008) Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *J Neurochem.* 105: 524-536.

- 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. *J Neurosci.* 23: 4164-4172.
- Organisciak DT, Vaughan DK (2010) Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res.* 29: 113-134.
- P**acione LR, Szego MJ, Ikeda S, Nishina PM, McInnes RR (2003) Progress toward understanding the genetic and biochemical mechanisms of inherited photoreceptor degenerations. *Annu Rev Neurosci.* 26: 657-700.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009) Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res.* 89: 32-41.
- Paskowitz DM, Donohue-Rolfe KM, Yang H, Yasumura D, Matthes MT, Hosseini K, Graybeal CM, Nune G, Zarbin MA, Lavail MM, Duncan JL (2007) Neurotrophic factors minimize the retinal toxicity of verteporfin photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 430-437.
- Panda S, Jonas JB, (1992) Decreased photoreceptor count in human eyes with secondary angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33: 2532-2536.
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: 489-500.
- Pelzel HR, Schlamp CL, Poulsen GL, Ver Hoeve JA, Nork TM, Nickells RW (2006) Decrease of cone opsin ARNm in experimental ocular hypertension. *Mol Vis.* 26: 1272-1282.
- Peng M, Li Y, Luo Z, Liu C, Laties AM, Wen R (1998) Alpha2-adrenergic agonists selectively activate extracellular signal-regulated kinases in Müller cells in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 1721-1726.
- Perry VH (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 204:363-375.
- Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci.* 6: 931-934.
- Perry VH, Henderson Z, y Linden R (1983) Postnatal changes in retinal ganglion cells and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol.* 219:356-368.
- Pinilla I, Lund RD, Sauvé Y (2005) Enhanced cone dysfunction in ratshomozygous for the P23H rhodopsin mutation. *Neurosci Lett.* 382: 16-21.
- Polyak S, Willmer EN (1946). Retinal structure and colour vision. *Doc Ophthalmol.* 3: 24-56.
- Punzo C, Kornacker K, Cepko CL (2009) Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci.* 12: 44-52.
- Q**uigley HA (2011) Glaucoma. *Lancet.* 377: 1367-1377.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci.* 25: 11595-11604.
- R**adlwimmer FB, Yokoyama S (1998) Genetic analyses of the green visual pigments of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*). *Gene.* 218: 103-109.
- Ramón y Cajal S (1892) La rétine des vertèbres. La cellule, T. IX, Fasc. 1: 121-225.
- Ramón y Cajal S (1972) The Structure of the retina. Charles C. Thomas, Springfield Illinois.

- Raymond ID, Pool AL, Vila A, Brecha NC (2008) A Thy1-CFP DBA/2J mouse line with cyan fluorescent protein expression in retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 26: 453-465.
- Ripps H (2002) Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res.* 74: 327-336.
- Rodieck RW (1998) *The First Steps in Seeing.* Sunderland, Mass, Sinauer Associates, Inc. ISBN: 0-87893-757-9.
- Rodriguez AR, de Sevilla Müller LP, Brecha NC (2014) The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 522: 1411-1443.
- Saleh M, Nagaraju M, Porciatti V (2007) Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 4564-4572.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009a) Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* 49: 637-647.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b) A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49:115-126.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M (2009c) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis.* 15: 2578-2598.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* 90: 168-183.
- Saylor M, McLoon LK, Harrison AR, Lee MS (2009) Experimental and clinical evidence for brimonidine as an optic nerve and retinal neuroprotective agent: an evidence-based review. *Arch Ophthalmol.* 127: 402-406.
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW (2001) Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 7: 192-201.
- Schmued LC y Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377:147-154.
- Schmued LC, Kyriakidis K, Fallon JH, Ribak CE (1989) Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. *J Neurocytol.* 3: 333-343.
- Schober W, Gruschka H (1977) Retinal ganglion cells of the albino rat: A qualitative and quantitative study. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie.* 91: 397-414.
- Sellés-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gómez JM, Vidal-Sanz M (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: 2002-2014.
- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC (1995) Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 61: 379-382.
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N (2008) Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci.* 28: 548-561.

- Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2010) Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 434-441.
- Steinberg RH, Flannery JG, Naash M, Yasumura D, Lau-Villacorta, Chen J, LaVail MM (1996) Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes. (ARVO Abstract) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37: S698.
- Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peér J (1999) Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 18: 689-735.
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A (2008) Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 14: 1540-1548.
- Szel A, Takacs L, Monostori E, Diamantstein T, Vigh-Teichmann I, Rohlich P (1986) Monoclonal antibody-recognizing cone visual pigment. *Exp Eye Res.* 43: 871-883.
- Szel A, Diamantstein T, Rohlich P (1988) Identification of the blue-sensitive cones in the mammalian retina by anti-visual pigment antibody. *J Comp Neurol.* 273: 593-602.
- Szel A, Rohlich P (1992) Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res.* 55: 47-52.
- Szél A, Csorba G, Caffé AR, Szél G, Röhlich P, van Veen T (1994) Different patterns of retinal cone topography in two genera of rodents, *Mus* and *Apodemus*. *Cell Tissue Res.* 276: 143-150.
- T**aylor HR, West S, Muñoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM (1992) The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol.* 110: 99-104.
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987) The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* 17: 317-321.
- Thanos S, Mey J, Wild M (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 13: 455-466.
- The AGIS investigators (2000) The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS investigators. *Am J Ophthalmol* 130: 429-440.
- U**rtubia VC (1997) *Neurobiología de la visión*. Edicions UPC Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. ISBN: 84-8301-163-8.
- V**an Norren D, Schellekens P (1990) Blue light hazard in rat. *Vision Res.* 30: 1517-1520.
- Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT (2002) Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol.* 75: 547-553.
- Velten IM, Korth M, Horn FK (2001) The a-wave of the dark adapted electroretinogram in glaucomas: are photoreceptors affected? *Br J Ophthalmol* 85: 397-402.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MB, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye-dil. *Exp Neurol.* 102: 92-101.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols.* 3: 29-33.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Selles-Navarro I, Rodríguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Pérez MP (2000) Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res.* 2: 215-227.

- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP (2001) Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* 42: S262- S267.
- Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD (2002) Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res.* 137: 443-452.
- Vidal-Sanz M, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Villegas-Pérez MP (2007) Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye.* 21: S42-S45.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2012) Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* 31: 1-27.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8: 265-280.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky GM, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* 24: 23-26.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD (1996) Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport.* 7: 1995-1999.
- Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD (1998) Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol.* 392:58-77.
- W**ahlin KJ, Enke RA, Fuller JA, Kalesnykas G, Zack DJ, Merbs SL (2013) Epigenetics and cell death: DNA hypermethylation in programmed retinal cell death. *PLoS One.* 8: e79140.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD (2000) Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 537-545.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado-Montalbán N, Lund RD (2003) Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res.* 27: 183-196.
- Wang X, Tay SS, Ng YK (2002) An electron microscopic study of neuronal degeneration and glial cell reaction in the retina of glaucomatous rats. *Histol Histopathol.* 17: 1043-1052.
- Wen R, Cheng T, Li Y, Cao W, Steinberg RH (1996) Alpha 2-adrenergic agonists induce basic fibroblast growth factor expression in photoreceptors in vivo and ameliorate light damage. *J Neurosci.* 16: 5986- 5992.
- Wen R, Song Y, Kjellstrom S, Tanikawa A, Liu Y, Li Y, Zhao L, Bush RA, Laties AM, Sieving PA (2006) Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci.* 26: 13523-13530.
- Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA (2012) CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res.* 31: 136-151.
- Wen R, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, Lavail MM, Laties AM, Li Y (2012) Regeneration of cone outer segments induced by CNTF. *Adv Exp Med Biol.* 723: 93-99.
- Werner JS, Keltner JL, Zawadzki RJ, Choi SS (2011) Outer retinal abnormalities associated with inner retinal pathology in nonglaucomatous and glaucomatous optic neuropathies. *Eye* 25: 279-289.
- Wessendorf MW (1991) Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res.* 553: 135-48.
- Wheeler L, WoldeMussie E, Lai R (2003) Role of alpha-2 agonists in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 48: S47-S51.

- Williams TP, Webbers JP (1995) Photometer for measuring intensity and rhodopsin distributions in intact eyes. *Appl Opt.* 34:5720-5724.
- Wilson RB, Kunchithapautham K, Rohrer B (2007) Paradoxical role of BDNF: BDNF± retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2877-2886.
- WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001) Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 2849-2855.
- Xia X, Li Y, Huang D, Wang Z, Luo L, Song Y, Zhao L, Wen R (2011) Oncostatin M protects rod and cone photoreceptors and promotes regeneration of cone outer segment in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One.* 6: e18282.
- Yokoyama S, Radlwimmer FB, Kawamura S (1998) Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Lett.* 423: 155-158.
- Yokoyama S (2000) Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog RetinEye Res.* 19: 385-419
- Yokoyama S (2002) Molecular evolution of color vision in vertebrates. *Gene.* 300: 69-78
- Zvyaga TA, FahmyK, Siebert F, Sakmar TP (1996) Characterization of the mutant visual pigment responsible for congenital night blindness: a biochemical and Fourier-transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry.* 35: 7536-7545.