



Tesis Doctoral

**FILTROS ÓPTICOS CONTRA EL EFECTO
FOTOTÓXICO DEL ESPECTRO VISIBLE
EN LA RETINA: Experimentación animal.**

Celia Sánchez-Ramos Roda

Directores

Dr. Julián García Sánchez

Dr. Pablo Gili Manzanaro

Madrid

2010

**A José Antonio, Ignacio y Paula.
A Begoña, Inmaculada y María Fernanda.**

A mis padres les dedique la primera tesis y por supuesto, ésta también es su obra.

AGRADECIMIENTOS

En el mes de julio de 1994, hace más de quince años, defendí una tesis doctoral en la Universidad Complutense de Madrid, que me ha permitido, desde entonces, dedicar parte de mi trabajo a la investigación.

Este evento abrió ante mí, todo un mundo, un nuevo panorama, una nueva visión de la vida en la que la búsqueda de respuestas constituye un acontecimiento.

Recuerdo con exactitud la mezcla de entrañables sensaciones que, en aquella ocasión sentía, cuando redactaba los agradecimientos; mi mayor preocupación era, como es natural, no olvidar a nadie. Pues bien, hoy en el verano de 2009 me encuentro en una situación semejante ante un documento que resume el esfuerzo de más de cinco años de ilusión y trabajo incesante que ha permitido llegar a las conclusiones que voy a defender en esta tesis doctoral. Y me siento feliz, privilegiada y alegre al tener que agradecer la ayuda y el sacrificio de muchas personas que me rodean y a las que quiero profundamente. Todos y cada uno han tenido una importante participación y saben que su esfuerzo ha supuesto para mí un enorme aliciente.

Éste es también su trabajo, un millón de gracias a todos.

Justificación	9
1.- Introducción	11
1.1.- Emisor: Energía Radiante	11
1.1.1.- Radiometría y Fotometría	14
1.1.2.- Modificaciones del espectro de luz incidente	18
1.1.2.1.- A nivel ambiental	18
1.1.2.2.- A nivel ocular	22
1.2.- Receptor: Retina.	25
1.2.1.- Principales estructuras implicadas en la interacción con la radiación	25
1.2.2.- Principales mecanismos de homeostasis celular	38
1.2.3.- Principales factores implicados en el metabolismo intercelular	42
1.3.- Interacción de la radiación electromagnética con el sistema visual	55
1.3.1.- El ojo como instrumento óptico y receptor de energía radiante	55
1.3.2.- Mecanismos implicados en la función visual en la retina.	56
1.3.3.- Eficiencia luminosa fotópica y mesópica.	64
1.3.4.- Mecanismos no visuales inducidos por la luz.	67
1.3.5.- Efectos nocivos de la luz en el sistema visual.	71
1.4.- Mecanismos naturales de protección ocular frente a la luz visible: extrínsecos e intrínsecos	79
1.4.1.- Absorción atmosférica de la radiación electromagnética.	79
1.4.2.- Cristalino.	81
1.4.3.- Pigmento macular.	83
1.4.4.- Ausencia de conos-S en la foveola.	85
1.5.- Mecanismos artificiales de protección ocular frente a la luz	88
1.5.1.- Filtros ópticos	88
1.5.1.1.- Transmitancia/absorbancia/reflectancia.	88
1.5.1.2.- Tipos de filtros.	91
2.- Objetivos	99
2.1.- Objetivo general	99
2.2.- Objetivos específicos	99
2.2.1.- Análisis estructural de la Retina	99
2.2.2.- Análisis de expresión génica	99

3.- Hipótesis	101
3.1.- Hipótesis Conceptual	101
3.2.- Hipótesis Fisiológica	101
4.- Muestra, Material y Método	103
4.1.- Muestra	103
4.2.- Material	105
4.3.- Metodología	111
4.3.1.- Método de análisis estructural de la retina	117
4.3.2.- Método de análisis de expresión génica	120
5.- Resultados y Discusión	121
5.1.- Análisis estructural de la retina	121
5.2.- Análisis de la expresión génica	130
6.- Discusión	137
7.- Conclusiones	141
8.- Bibliografía	143
Anexos	177
Estudios previos en ratas albinas	178
Estudios previos en ratas pigmentadas	182

JUSTIFICACIÓN

La visión es el sentido que permite detectar parte de la energía radiante e interpretarla, pero la misma luz puede producir un efecto tóxico en la retina de individuos vivos, en particular las radiaciones más energéticas del espectro “visible”: la luz violeta y azul. Por otro lado, existen filtros de absorbanza selectiva que manipulan la luz eliminando distintas bandas del espectro electromagnético.

Esta tesis doctoral propone probar la eficiencia de los filtros de absorbanza selectiva como medio para neutralizar el efecto nocivo de la luz sobre la retina, evitando los cambios que provocan el deterioro retiniano.

El proceso de **degeneración macular en ojos vivos**, a pesar de su reconocida importancia ha sido poco estudiado, debido a dificultades técnicas. La cuantificación del grado de distrofia inicial y la medida de la evolución del deterioro tisular de las neuronas retinianas ha resultado particularmente difícil. Es en la última década cuando **la innovación tecnológica** en el diagnóstico de la degeneración retiniana ha posibilitado la realización de estudios cuantitativos longitudinales y transversales en retina de humanos y de animales de experimentación incidiendo de manera concreta en la cuantificación, que permite objetivar los datos y realizar análisis comparativos rigurosos.

Este estudio se ha diseñado en **experimentación animal** con la intención de **acortar los tiempos en la obtención de resultados para su extrapolación conceptual en humanos, estudios previos a los ensayos clínicos**. La justificación de este trabajo **es colaborar en el conocimiento de las causas, de los tratamientos necesarios y de las acciones paliativas** en relación a las retinopatías.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Emisor: Energía Radiante

Es una forma de energía que puede propagarse en el vacío, es decir, sin necesidad de soporte alguno. Esta energía que se desprende de un cuerpo infrecuentemente puede producir trabajo debido a la pequeña fuerza que lleva consigo, pero sí puede producir calor. Para ello basta la presencia de un cuerpo absorbente que transforme la energía radiante en agitación molecular. La Energía radiante está constituida por ondas electromagnéticas con una gama de frecuencias entre 10^8 y 10^{24} s^{-1} .

Se denomina Espectro Energético al conjunto diferenciado de las distintas radiaciones que integran la energía radiante. Cada uno de los componentes se llama radiación monocromática y puede definirse por su frecuencia o su longitud de onda. La única característica física de la radiación es la frecuencia de su vibración, ya que la longitud de onda depende de la velocidad, y por consiguiente del medio en el que se propaga. Sin embargo, es frecuente describir una radiación empleando la longitud de onda en el vacío o en el aire, así por ejemplo, dentro del espectro electromagnético, el intervalo correspondiente al espectro “visible” se define generalmente como el comprendido entre las longitudes de onda que van desde 380nm hasta 780nm.

La Radiación se emite en forma de cuantos, unidades elementales de energía, que son proporcionales a la frecuencia de la radiación (fotones).

La energía de un fotón viene dada por:

$$\Delta E = h\nu = h \frac{C}{\lambda}$$

Donde: h es la constante de Planck ($6.62 \times 10^{-34} \text{ J.s}$),

C es la velocidad de la luz en el vacío ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$)

Es interesante reseñar, tal y como resume Artigas en su libro titulado *Óptica Fisiológica: Psicofísica de la Visión* que, en el estudio de la visión y del color, se aprovecha el aspecto corpuscular de la radiación (cuantos) para explicar las leyes de su emisión y de su recepción (comportamiento fotoquímico retiniano por el que la energía radiante se transforma en energía nerviosa). Sin embargo, para el análisis de la radiación luminosa en sí, se acude preferentemente al estudio de su aspecto ondulatorio.

El Espectro electromagnético (EEM) es la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas que emite (espectro de emisión) o absorbe (espectro de

absorción) una sustancia. El EEM incluye una amplia gama de radiaciones, desde las de menor longitud de onda, como son los rayos gamma y los rayos X, pasando por la radiación ultravioleta, la **luz “visible”** y los rayos infrarrojos, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda, como son las ondas de radio.

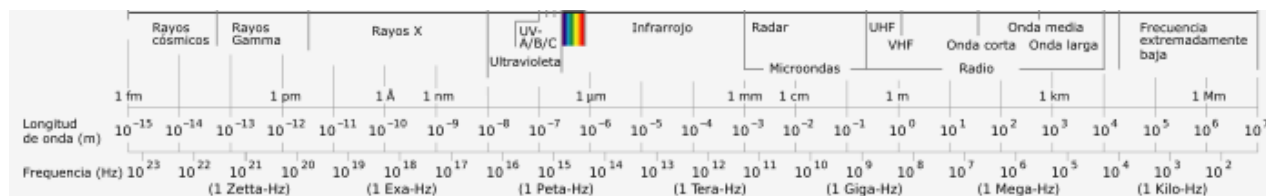


Figura 1. Espectro electromagnético

Se denomina **Espectro de luz “visible”** a la región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir. A la radiación electromagnética en este rango de longitudes de onda se le llama también luz “visible” o simplemente luz. No hay límites exactos en el espectro visible; un ojo patrón humano responde a longitudes de onda desde 380nm a 780nm, aunque el ojo adaptado a la oscuridad puede ver en un intervalo mayor, que va desde 360nm a 830nm.



Figura 2. Bandas del espectro de luz

Con relación a la composición espectral de la luz se puede comprobar que ya en el siglo XIII, Roger Bacon (1214-1294) observó y describió por primera vez el espectro visible. Posteriormente Isaac Newton (1643-1727) estableció un principio hasta hoy aceptado: “la luz es color”. En 1665 Newton descubrió que la luz del sol al

pasar a través de un prisma se dividía en varios colores conformando un espectro. Newton consiguió evidenciar la descomposición de la luz en los colores espectrales, puesta de manifiesto de manera contundente, cuando llueve y los haces de luz atraviesan las gotas de agua. Por su parte, Johann von Goethe (1749-1832) estudió y probó las modificaciones fisiológicas y psicológicas que el ser humano sufre ante la exposición a los diferentes colores. Para Goethe era muy importante comprender la reacción humana a los colores, y su investigación fue la piedra angular de la actual psicología del color.

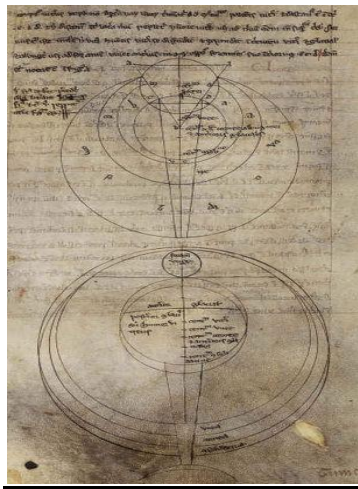


Figura 3. Estudios ópticos de Bacon en su obra Opus Majus (1267).

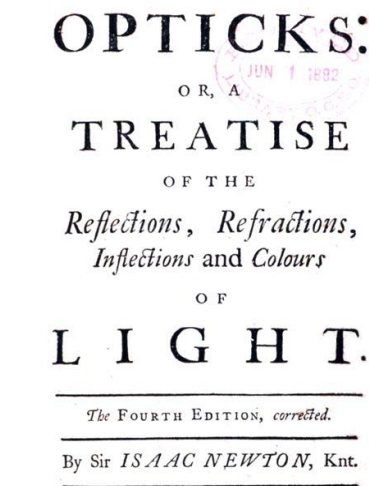


Figura 4. Cuarta edición del tratado sobre Óptica de Isaac Newton (1704).

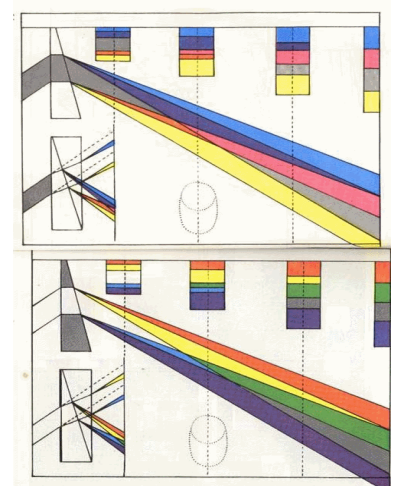


Figura 5. Comparación esquemática entre la dispersión de la luz a través de un prisma, por Newton (1643-1727) y por Goethe (1749-1832).

Como ya se ha dicho, la luz posee una naturaleza corpuscular, estando formada por fotones que absorben y emiten energía, pero se comporta como una onda electromagnética en su propagación. Las ondas electromagnéticas, lejos del foco emisor, pueden considerarse como ondas planas transversales formadas por un campo eléctrico y otro magnético, perpendiculares entre sí, cuya intensidad varía sinusoidalmente con el tiempo y el espacio, y cuya dirección de propagación es perpendicular a ambos campos. Por tanto, la luz puede considerarse como una entidad que tiene comportamiento de onda y que consta de partículas llamadas fotones.

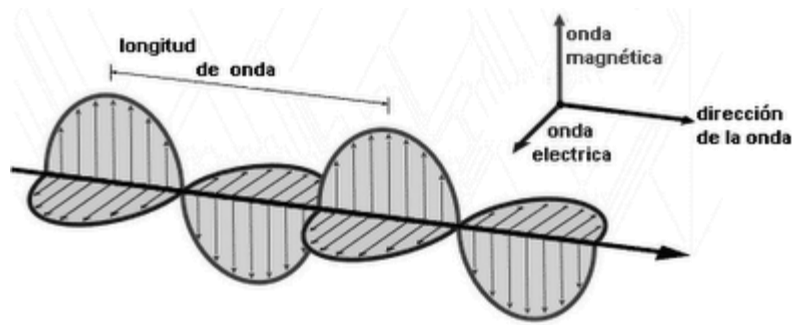


Figura 6. Onda electromagnética.

1.1.1- Radiometría y Fotometría

Llegado a este punto, conviene recordar algunos conceptos elementales de la Métrica Óptica; así la **Radiometría** es la Ciencia que tiene por objeto la medición de la energía radiante en general, siendo la **Fotometría** una parte de la Radiometría que mide la energía radiante en cuando a su característica como activadora de sensaciones visuales. Es decir, la Radiometría se refiere a la medida de la potencia o flujo que produce una fuente de radiación electromagnética y la Fotometría se refiere al efecto que tiene esta radiación en el sistema visual humano para lo que emplea métodos psicofísicos en los que un individuo, en lugar de un instrumento, detecta y compara la sensación visual producida por la luz, en términos de claridad, color, contraste y otras características.

Como ocurre con la medida de cualquier magnitud, se debe definir un patrón. Para tener una referencia, se acordó internacionalmente utilizar un emisor de luz como patrón y de esta forma se llegó a la definición de la unidad de Intensidad Luminosa que se denominó “candela”. La candela está considerada la unidad fundamental del Sistema Internacional de Fotometría. Para la obtención práctica de la candela fue necesario un radiador completo o cuerpo negro que emite a la temperatura de fusión del platino y del cual se calcula su radiancia espectral a partir de la Ley de Planck. Se entiende por cuerpo negro un cuerpo que, a cualquier temperatura, absorbe toda la radiación que incide sobre él, cualquiera que sea la longitud de onda. En la actualidad, existen radiómetros piroeléctricos calibrados eléctricamente que dan lugar a excelentes resultados sin necesidad de patrones concretos. Por este motivo se ha considerado una nueva definición de la candela, en términos radiométricos, que la convierte en una unidad derivada del watio.

Utilizando cualquier técnica, instrumento o artificio capaz de medir con suficiente precisión la energía radiante en el intervalo del “visible” se puede obtener una escala espectralradiométrica absoluta (watios).

Para la definición de algunas magnitudes radiométricas y fotométricas es imprescindible conocer el tipo de fuente que emite la radiación. Se llama fuente a una superficie o volumen que emite energía radiante. Para la comprensión de esta tesis conviene exponer las definiciones de fuente puntual y extensa. El límite del diámetro aparente que debe tener una fuente para ser considerada como puntual es de 1 minuto de arco.

A continuación se enumeran y definen las magnitudes, unidades y equivalentes radiométricos y fotométricos más usuales: el **Flujo Luminoso (F)** es la magnitud fotométrica fundamental, una medida de potencia luminosa comparable a la potencia radiante. Es la fracción de energía radiante emitida por una fuente y evaluada de acuerdo con su capacidad para producir sensación visual en el ojo humano normal. Es una medida no direccional y su unidad es el Lumen. La **Intensidad Luminosa (I)** se refiere al flujo luminoso emitido por unidad de ángulo sólido en una dirección por una fuente de luz puntual. La unidad es la Candela = lumen/estereorradián. **Luminancia (L)** es la intensidad luminosa, radiada en una dirección determinada, por unidad de área aparente de una fuente extensa. La unidad es el Nit = Candelas/m². **Iluminancia (E)** es el flujo luminoso (F) incidente sobre una superficie por unidad de área. La unidad es el Lux = lumen/m².

Retomando el concepto de las fuentes de energía radiante se puede utilizar otro criterio de clasificación, ilustrativo para este documento que clasifica a las fuentes en primarias, si son ellas mismas las que producen la energía emitida y, en fuentes secundarias, si lo que hacen es reenviar parte de la energía radiante que ellas mismas reciben. A continuación, se comentan algunas propiedades generales de los materiales que dependen de la luz, resultando interesantes para introducir la relación de la luz con la materia. El **Brillo** es el aspecto de la superficie de un material cuando se refleja la luz. Los materiales pueden clasificarse según la transmisión de la luz a través de su estructura en transparentes, translúcidos y opacos, determinándose así su grado de **Transparencia**. El **Índice de Refracción** se define como el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio considerado. La posesión de más de un índice de refracción por parte de un material, se conoce como **Doble refracción o Birrefringencia**. Y por último, cuando el movimiento ondulatorio se

reduce a vibraciones en un solo plano, se produce el fenómeno de **Polarización**. El **Color** es el resultado de una combinación de las longitudes de onda no absorbidas por los materiales. La Comisión Internacional de Iluminación (CIE) define las franjas espectrales en el rango óptico. El color no es una característica intrínseca de la materia, sino que constituye una percepción visual estimulada por la luz. Cuanto más corta es la longitud de onda, mayor energía tiene la radiación.

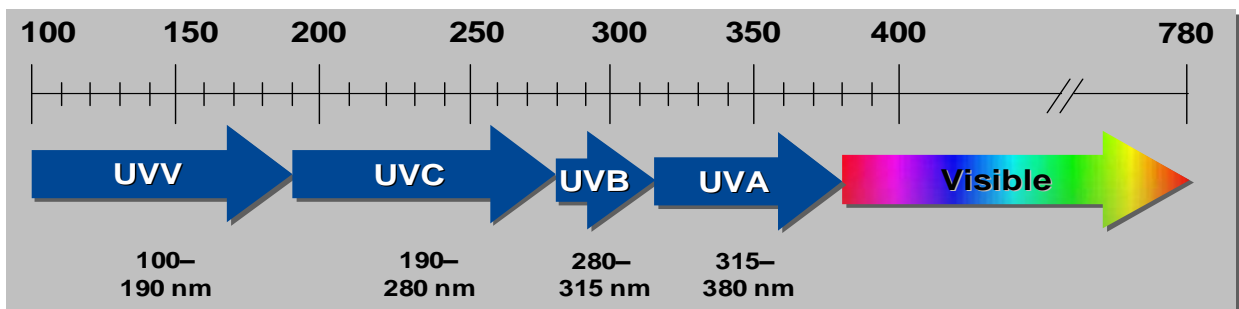


Figura 7. Relación entre longitud de onda y energía radiante

La Temperatura de color de una fuente de luz se define comparando su color dentro del espectro luminoso con el de la luz que emitiría un Cuerpo Negro calentado a una temperatura determinada. Por este motivo, la temperatura de color generalmente se expresa en grados Kelvin, a pesar de no reflejar expresamente una medida de temperatura.



Figura 8. Gradiente de la Temperatura de color.

Su especificación constituye una forma usual de caracterizar tanto el color como el reparto de energía de una fuente de luz.

Por otra parte, para la comprensión de los mecanismos que en párrafos sucesivos se explican, conviene referir los tres niveles de iluminación ambiente establecidos:

- Condiciones ambientales fotópicas cuando la luminancia es superior a 10 cd/m^2
- Condiciones ambientales mesópicas cuando los valores de luminancia se encuentran entre 10^{-2} y 10 cd/m^2 .
- Condiciones ambientales escotópicas, si la luminancia es inferior a 10^{-2} cd/m^2

Por último no se puede olvidar diferenciar las fuentes de luz natural y artificial. La principal fuente natural de luz es el sol y conocer su distribución espectral de energía

con precisión es complicado, ya que las medidas suelen hacerse a nivel del suelo, por lo que el espectro medido viene modificado por la absorción atmosférica. Es conveniente considerar la posición del sol para la determinación del espectro. Fuera de la atmósfera, la radiación solar posee una temperatura de color de 6200°K.

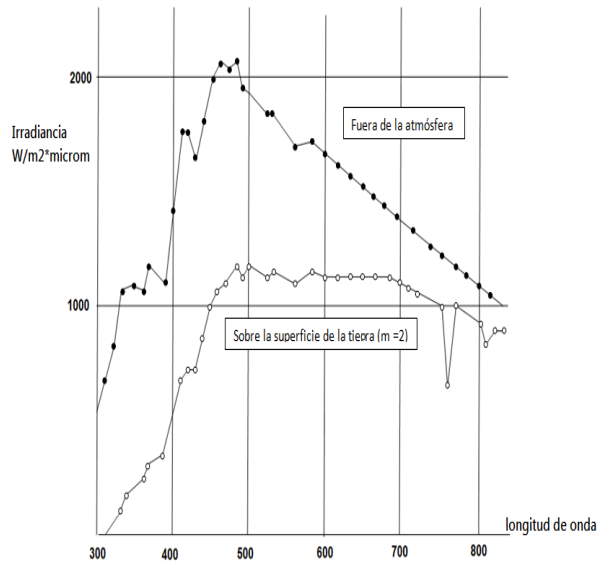


Figura 9. Irradiancia espectral del disco solar fuera de la atmósfera y sobre la superficie de la Tierra, para una masa de aire = 2.
(Wyszecki G y Stiles WS, 1982)

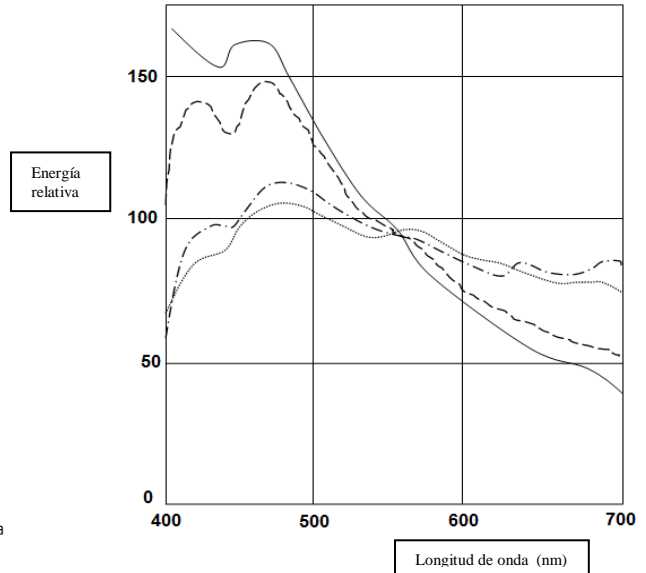


Figura 10. Distribución espectral de la radiación solar para diferentes situaciones:
____ cielo del norte, ----- cielo cubierto,
-.-.-. luz media solar, luz media solar + cielo.

Las fuentes artificiales pueden clasificarse genéricamente en dos grandes grupos: fuentes térmicas y fuentes por descarga eléctrica. Las fuentes térmicas son cuerpos calientes que emiten energía radiante con una distribución espectral continua, que depende del cuerpo en cuestión y de la temperatura. Entre las fuentes de descarga eléctrica destacan los **tubos fluorescentes** que consisten en un tubo que contiene gas que se ioniza cuando la diferencia de potencial entre los electrodos alcanza un valor determinado, y las **lámparas espectrales** que consiste en un gas encerrado en una ampolla de vidrio. En la actualidad la industria de la iluminación se basa eminentemente en los LEDs, que son diodos que producen luz “visible” y radiación ultravioleta e infrarroja cuando se encuentran polarizados. El voltaje de polarización de un LED varía desde 1.8 V hasta 2.5 V, y la corriente necesaria para que emita la luz se encuentra entre 8 mA y 20 mA.

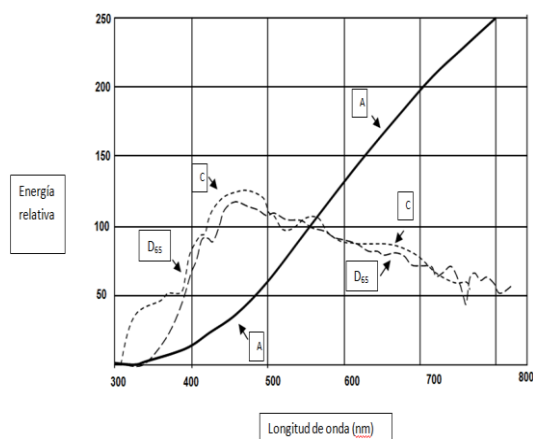


Figura 11. Distribución espectral relativa de energía de los iluminantes A, C y D65.
Modificado de Artigas, (Interamericana, 1995)

Los iluminantes se definen con los valores numéricos correspondientes a la distribución espectral de las fuentes patrón. Según la CIE, las tres fuentes más utilizadas como iluminantes son las denominadas A, C, D65. La fuente A intenta imitar el espectro de una lámpara incandescente, la fuente C y la fuente D65 son dos formas de caracterizar la luz del día.

1.1.2.- Modificaciones del espectro de luz incidente

1.1.2.1- A nivel ambiental

La energía solar es emitida en forma de radiación electromagnética y llega con una intensidad prácticamente constante al exterior de la atmósfera, intensidad que se denomina Constante Solar H, que es la energía que llega en la unidad de tiempo a la unidad de superficie colocada fuera de la atmósfera, perpendicularmente a la dirección de llegada.

La National Aeronautics and Space Administration (NASA) ha tomado para la Constante Solar el valor estándar $H = 1353 \pm 1,5\% \text{ W/m}^2$. Este valor estándar ha sido adoptado por la ASTM (American Society of Testing and Materials), por la ANSI (American National Standard Institute) y por la ISO (International Standard Organization). Las mismas organizaciones han adoptado el espectro de radiación solar extraterrestre que es la distribución espectral de la energía emitida por un cuerpo negro a la temperatura de $5762^\circ \text{ Kelvin}$. La cantidad de energía que llega al exterior de la atmósfera de cada longitud de onda, constituye el espectro de la radiación extra-atmosférica.

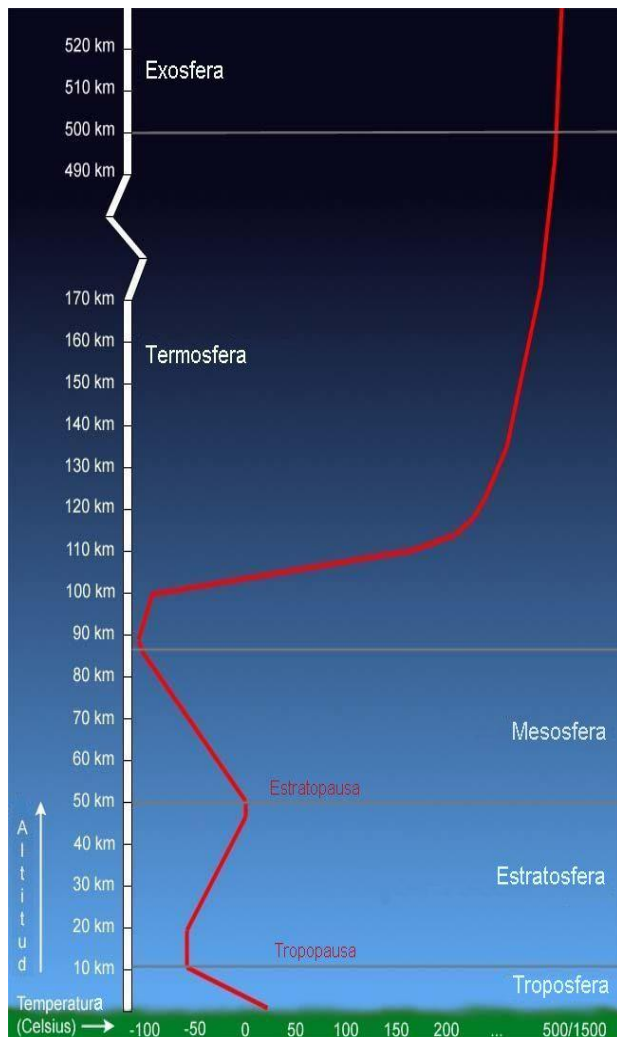
Para la mejor comprensión de los siguientes párrafos y de las modificaciones que la energía radiante sufre hasta llegar a la Tierra, a continuación se van a explicar algunos aspectos relativos a la atmósfera. La atmósfera terrestre está formada por diferentes capas, que deben ser atravesadas por la radiación solar hasta llegar a la superficie del suelo o del mar, y en su camino la radiación es absorbida por los distintos

componentes de la atmósfera, de diferente manera según su longitud de onda, quedando modificada la distribución espectral.

A continuación, se van a relacionar las capas de la atmósfera más relevantes para la adecuada comprensión de este trabajo. En primer lugar, se encuentra la **troposfera**, cuyo límite superior, llamado **tropopausa**, está situado a 9 Km de altura en los polos y los 18 km en el ecuador. En ella se producen importantes movimientos verticales y horizontales de las masas de aire y hay relativa abundancia de agua. La temperatura va disminuyendo conforme se va subiendo, hasta llegar a -70°C en su límite superior. La **estratosfera** ocupa la segunda posición y comienza a partir de la tropopausa, llegando hasta un límite superior llamado **estratopausa**, situado a 50 km de altitud. La temperatura cambia su tendencia y va aumentando hasta llegar a ser de alrededor de 0°C en la estratopausa. En esta capa, no hay prácticamente movimiento en dirección vertical del aire, sin embargo, los vientos horizontales llegan a alcanzar frecuentemente los 200 km/h, lo que facilita que, cualquier sustancia que llega a la estratosfera, se difunda por todo el globo con rapidez. Éste es el caso de los compuestos clorofluorocarbonados (CFC) que, como es sabido, destruyen el ozono. En esta parte de la atmósfera, entre los 30 y los 50 kilómetros, se encuentra la mayor concentración de ozono, capa crucial en la explicación de este trabajo porque absorbe las radiaciones dañinas de longitud de onda corta.

En tercer lugar, se extiende la **mesosfera**, situada entre los 50 y 80 km de altura, que contiene solo cerca del 0,1% de la masa total de aire, y es una capa de la atmósfera especialmente importante por la ionización y las reacciones químicas que ocurren en ella. La disminución de la temperatura combinada con la baja densidad del aire en la mesosfera determinan la formación de turbulencias y ondas atmosféricas que actúan a escalas espaciales y temporales muy elevadas. Más alejadas de la superficie terrestre se encuentran otras capas como la **exosfera** que se extiende hasta los 9.600 km, lo que constituye el límite exterior de la atmósfera.

La radiación ultravioleta se puede dividir en: ultravioleta A (315-380 nm), ultravioleta B (280-315 nm), ultravioleta C (190-280 nm) y ultravioleta V (100-190 nm).



La radiación ultravioleta, inferior a 380 nm es absorbida, aunque no totalmente, por el ozono de la estratosfera. La absorción en las longitudes de onda visibles, de 380 a 780 nm, es mínima y la absorción en el infrarrojo se realiza en la troposfera, capa más baja de la atmósfera en contacto con la superficie terrestre, suelo o mar, y que llega a la altura de 18 km. La absorción tiene lugar fundamentalmente por vapor de agua y dióxido de carbono, si bien otros gases, como el monóxido de carbono, el metano o el óxido nitroso, absorben ciertas longitudes de onda de la banda infrarroja. **En su conjunto la atmósfera sólo debería permitir el paso de radiación infrarroja, del espectro visible y de parte del ultravioleta cercano.**

Figura 12. Capas de la atmósfera: su altitud y temperatura (grados Celsius). Tomado de <http://educadultos>

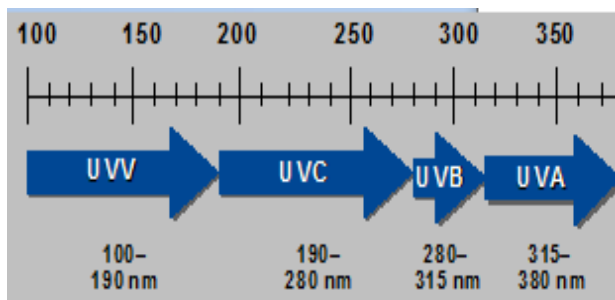


Figura 13. Diferentes bandas del espectro ultravioleta.

Es preciso diferenciar entre las diferentes bandas de la radiación ultravioleta debido a que su función y su repercusión vital son muy diferentes.

El ozono juega un papel importante en el proceso de modificación del espectro de radiación incidente. Varias son las vías por las que se puede producir ozono. En primer lugar, por la propia radiación ultravioleta. El proceso es el siguiente:

El oxígeno molecular que se encuentra en las capas altas de la atmósfera es bombardeado por la radiación solar. Del amplio espectro de radiación incidente una determinada fracción de fotones (UV) cumple los requisitos energéticos necesarios para catalizar la rotura del doble enlace de los átomos de oxígeno de la molécula de oxígeno molecular. Posteriormente, la radiación solar convierte una molécula de ozono en una de oxígeno biatómico y un átomo de oxígeno sin enlazar. Durante la fase oscura, (la noche de una determinada región del planeta) el oxígeno monoatómico, que es altamente reactivo, se combina con el ozono para formar moléculas de oxígeno biatómico. Para mantener constante la capa de ozono en la estratosfera esta reacción fotoquímica debe hacerse en perfecto equilibrio, pero estas reacciones son fácilmente perturbables por moléculas, como los compuestos clorados (como los clorofluorocarbonos) y los compuestos bromurados. El ozono también puede ser producido a partir del oxígeno emitido por los vegetales en su función clorofílica, o del contenido en el vapor de agua, para la que requiere radiación ultravioleta

El ultravioleta es absorbido por el ozono, desdoblándolo en oxígeno atómico y molecular lo que realimenta el proceso de formación de ozono y asegura una continua absorción de ultravioleta. La energía así absorbida provoca un calentamiento de la estratosfera.

En conclusión, casi el 99% de la radiación ultravioleta del Sol que alcanza la estratosfera se convierte en calor mediante una reacción química que continuamente recicla moléculas de ozono (O_3). Cuando la radiación ultravioleta impacta en una molécula de ozono, la energía escinde a la molécula en átomos de oxígeno altamente reactivos; casi de inmediato, estos átomos se recombinan formando ozono una vez más y liberando energía en forma de calor. La formación y destrucción del ozono por procesos naturales es un equilibrio dinámico que mantiene constante su concentración en la estratosfera.

Por otro lado, el aumento de la concentración en la atmósfera de los gases que provocan el efecto invernadero, modifica el equilibrio energético en el sistema radiación-atmósfera-superficie terrestre, aumentando la energía absorbida y elevando la temperatura de la superficie de la Tierra, con las consiguientes modificaciones en el espectro de luz incidente.

Con relación a la modificación de la luz artificial en su curso hasta el ojo, no existe esta barrera natural que supone la atmósfera en el caso de la luz solar.

1.1.2.2.- A nivel ocular

El espectro de luz se modifica al pasar a través del interior del ojo antes de provocar sensación visual por varias causas. La reflexión, la absorción y la dispersión de la luz son los fenómenos que modifican la proporción y la composición espectral de la luz que estimula los fotorreceptores de la retina.

En primer lugar, el cambio de índice de refracción entre el aire y los distintos dioptrios oculares da lugar al fenómeno de reflexión lumínica. La luz que atraviesa los distintos medios oculares, choca con las partículas, de diferente tamaño, que están en su interior, produciendo la dispersión en los medios oculares, y, por último, es importante el fenómeno de absorción de la radiación en su doble vertiente: por un lado, en los dioptrios oculares para preservar la retina; y por otro lado, la absorción de la energía luminosa por los fotopigmentos, necesaria para producir los cambios bioquímicos que inician el proceso visual.

La primera estructura ocular relevante respecto a la modificación del espectro de luz incidente es la córnea, un tejido altamente diferenciado que permite la refracción y la transmisión de la luz. Su estroma consiste en una serie de fibras colágenas paralelas a la superficie rodeadas de una sustancia con un índice de refracción diferente por lo que dispersan la luz. El radio de las fibras es inferior a la longitud de onda y mantiene un orden y una distancia entre ellas, el comportamiento óptico de la córnea es similar al de un material homogéneo y la dispersión que ocurre sufre una interferencia, permitiendo el paso de aproximadamente el 95% de la luz que recibe en una longitud de onda de 500 nm. El lugar de mayor absorción de luz por la córnea se sitúa en el epitelio, principalmente para las longitudes de onda cortas. Con estas características, la capacidad de transmisión de luz por la córnea se encuentra entre los 310 nm (radiación ultravioleta) y los 2.500 nm (radiación infrarroja). Para cumplir con esta función de transmisión de luz es esencial que la disposición de fibras y su diámetro sean constantes.

En el interior del ojo se producen reflexiones de la luz allí donde el índice de refracción cambie bruscamente, que aumentan, además, con el ángulo de incidencia. La mayor diferencia del índice de refracción se produce en el paso aire-córnea, por lo tanto esta superficie es la que produce mayores pérdidas por reflexión. También se producen reflexiones, aunque de mucha menor importancia, en la superficie posterior de la córnea, y el cristalino. Como es sabido, la fracción de luz reflejada de un haz que

incide normalmente en una superficie reflectora está relacionada con la intensidad de la luz incidente y la relación de los índices de refracción de los distintos dioptrios. En la córnea se refleja aproximadamente un 2% de la luz incidente normal. Este porcentaje aumenta con el ángulo de incidencia, y se llega casi a una reflexión total cuando la incidencia es rasante.

El segundo fenómeno de interés en este sentido es la **dispersión de Rayleigh**, considerada como la dispersión de la luz o de cualquier otra radiación electromagnética por partículas mucho menores que la longitud de onda de los fotones dispersados. Ocurre cuando la luz viaja por sólidos y líquidos transparentes, pero se ve con mayor frecuencia en los gases. Si el tamaño de las partículas es mayor que la longitud de onda, la luz no se separa y todas las longitudes de onda son dispersadas, como cuando, al atravesar una nube, ésta se ve blanca. Para que la luz sea dispersada, el tamaño de las partículas debe ser similar o menor que la longitud de onda. La intensidad de la luz dispersada es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda, relación conocida como **Ley de Rayleigh**. La dispersión produce pérdidas de luz en el paso de la energía radiante a través del ojo. Se debe a las partículas submicroscópicas que se encuentran en las estructuras celulares de los medios oculares.

Por último, la transmisión o **absorción** de las radiaciones por los diferentes medios oculares determina cuales son las longitudes de onda que alcanzan la retina. Los medios oculares absorben parte de la radiación que los atraviesa transformándola en calor. La transmitancia en los medios oculares tiene como características más importantes que es selectiva y que varía con la edad, en especial debido al amarilleamiento del cristalino. El ojo es bombardeado continuamente por todas las formas de radiación electromagnética, sin embargo solo aquellas longitud de onda que son absorbidas por los fotopigmentos de la retina con la consiguiente generación del impulso nervioso se llaman luz “visible”.

A continuación se exponen las modificaciones concretas de la Energía Radiante al atravesar los distintos dioptrios oculares. Así, la córnea absorbe las radiaciones de longitud de onda inferior a 290 nm y las radiaciones hasta 315 nm. Transmite casi toda la radiación “visible” y es un filtro muy importante para el infrarrojo, ya que absorbe casi toda la radiación a partir de 2 μm . Respecto al **Humor Acuoso** contribuye a absorber la radiación ultravioleta (UV) que ha dejado pasar la córnea. Se caracteriza por una

absorción despreciable de la luz “visible” y una absorción significativa en el infrarrojo por debajo de 2.000 nm.

El cristalino proporciona la mayor protección frente a las radiaciones UV de longitud de onda más alta, UV A y UV B, absorbe entre 300 y 400 nm, y es el filtro que evita que el UV A llegue a la retina. Se puede pensar en el cristalino como un filtro que absorbe la radiación UV y, por tanto, protege la retina. Sin embargo, esta absorción de la radiación UV, durante muchos años, lesiona el cristalino y puede conducir a la formación de cataratas. El cristalino contiene un pigmento amarillo gracias al cual la longitud de onda corta sufre una fuerte absorción. Este pigmento se hace muy importante en la vejez. En el cristalino adulto la transmisión empieza a partir de los 380 nm y este límite se desplaza hacia los 400 nm con el aumento de la edad. El cristalino es el principal responsable de las pérdidas de luz por absorción en el “visible”. Su absorción es más importante en el azul que en el amarillo y varía con la edad. En la región del infrarrojo, el cristalino transmite casi toda la radiación.

El **Humor Vítreo** es transparente a toda la radiación y presenta únicamente una pequeña barrera de absorción en la radiación infrarroja. Sabiendo que la córnea absorbe el UV B y C y el IR B y C, el cristalino el UV A, la radiación que llega a la retina estará constituida básicamente por luz “visible” e infrarrojo A, aunque también puede llegar UV A en una pequeña cantidad (no llega radiación menor de 400 nm aproximadamente), como puede deducirse del espectro de transmisión del ojo. De esta radiación, la retina y la coroides absorben básicamente la luz “visible” y en mucha menor cuantía el infrarrojo.

La retina y coroides absorben aproximadamente el 75% de la luz incidente, siendo la absorción máxima alrededor de 575 nm. Luego la curva de absorción cae rápidamente hacia los 1000 nm. Para 1000 nm casi la mitad de la energía incidente alcanza la retina, aunque los ftopigmentos no sean sensibles a estas radiaciones.

Además el pigmento amarillo (no fotosensible) de la mácula lútea actúa como un filtro para luz azul, con una absorción máxima en la región de los 460 nm. Esta absorción de luz de baja longitud de onda ayuda a la visión debido a que reduce la dispersión de luz y la aberración cromática y evita que las longitudes de onda cortas alcancen el área central de la retina y de la fovea donde existe una mayor agudeza visual. El espectro de absorción de la mácula varía según el sujeto, pero en promedio puede considerarse que comprende (casi en un 50%) las radiaciones cuyas longitudes

Como es sabido, las capas de la retina son: capa pigmentaria, capa de bastones y conos, membrana limitante externa, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de las fibras del nervio óptico, y membrana limitante interna.

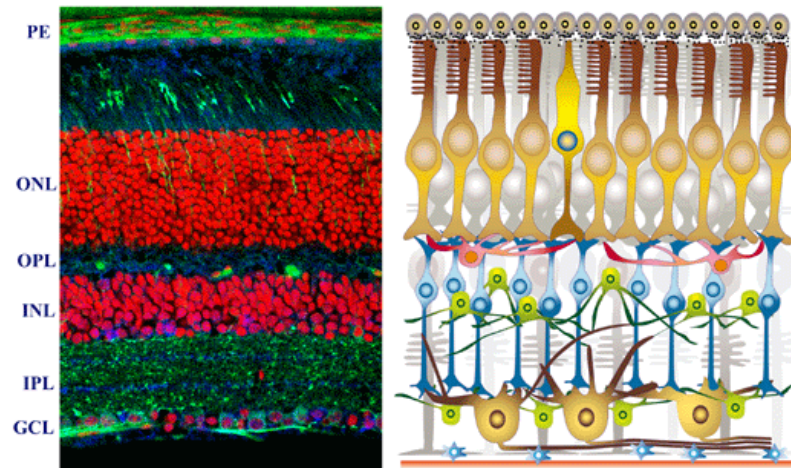


Figura 15. Secciones retinianas por microscopía y en esquema.

La retina humana es invertida. La luz, una vez que atraviesa el sistema óptico de dioptrios oculares y el humor vítreo, penetra en la retina. En primer lugar se encuentra con las células ganglionares, posteriormente atraviesa las capas plexiformes y nucleares interna y externa y por último accede a la capa de fotorreceptores (bastones y conos).

El epitelio pigmentario constituye la última estructura retiniana que tapiza toda su superficie con funciones de máxima importancia, como posteriormente se detallarán, entre las que destacan su capacidad para almacenar vitamina A, depósito de melanina y su función fagocítica de parte del segmento externo de los fotorreceptores.

Existe una zona en el centro de la retina denominada fovea, que ocupa un área total de poco más de 1 mm^2 y que está especialmente capacitada para la visión aguda y detallada.

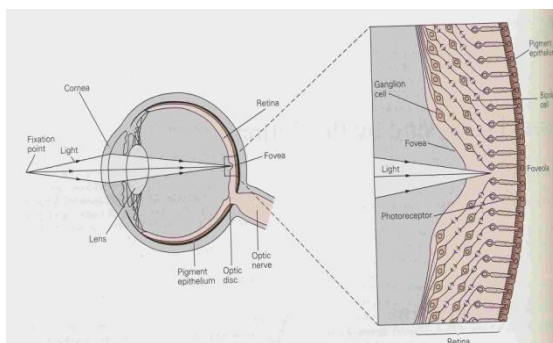


Figura 16. Esquema de la retina central.

La parte central de la fovea, de solo 0,3 mm de diámetro, recibe el nombre de foveola central (Polyak, 1941); ésta zona se compone casi por completo de conos, los cuales poseen la detección del detalle de la imagen visual, llegando la luz sin obstáculos.

La foveola es una región muy especializada de la retina que mide menos de 200 micras (difiere en su estructura tanto de la retina periférica como de la retina central).

La figura de Cajal ya indica el desplazamiento lateral de toda la cadena neuronal en la foveola. Esta disposición es la que permite, desde el punto de vista funcional, conseguir valores de resolución 10 veces superiores en la foveola con respecto a la retina central, a 5° de excentricidad.

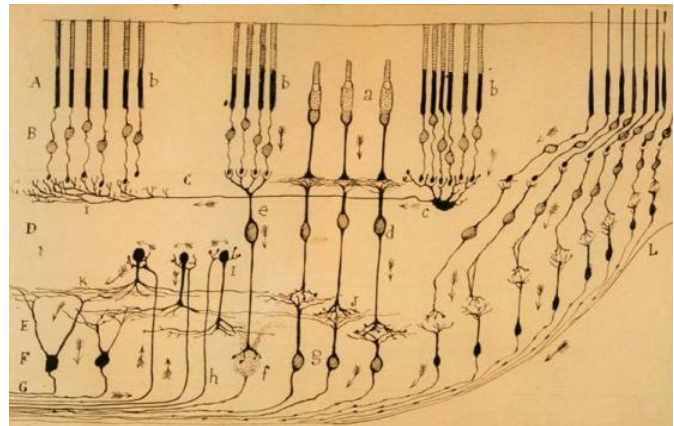


Figura 17. Desplazamiento de la cadena neuronal en la foveola.

A nivel de la retina central los conos presentan unos axones oblicuos que se encuentran desplazados lateralmente respecto a sus pedículos sinápticos a nivel de la plexiforme externa.

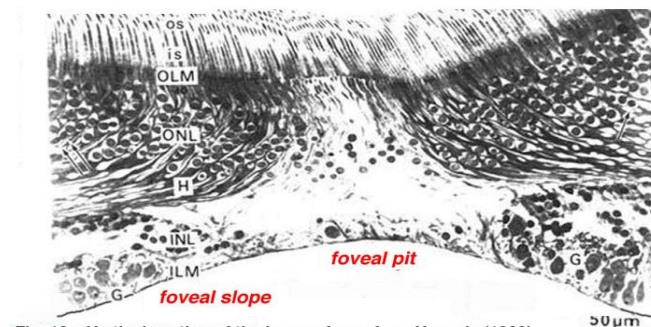


Figura 18. Sección vertical de la fóvea humana. Tomada de Yamada (1969).

Los axones oblicuos, junto con los procesos de las células de Müller que los acompañan, dan lugar a una especie de formación en empalizada que se denomina capa de fibras de Henle. Esta capa no existe a nivel de la retina periférica.

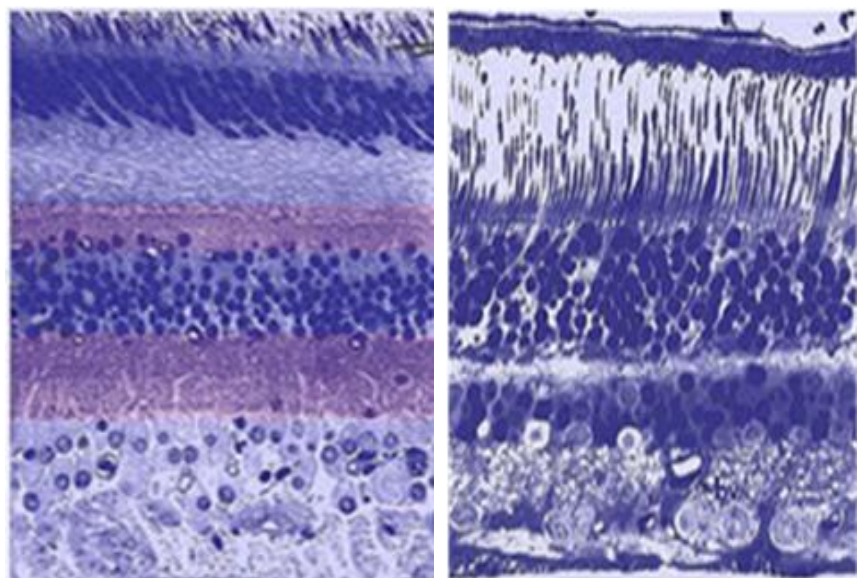


Figura 19. Diferencias estructurales entre estructura central (A) y periférica (B)

La capa nuclear externa, donde se encuentran los cuerpos celulares de los conos y bastones, presenta un espesor semejante a largo de toda la retina. Sin embargo en la retina periférica el número de cuerpos de bastones es muy superior al de los conos, y lo opuesto ocurre a nivel de la retina central.

Un ojo humano contiene aproximadamente 120.000.000 de bastones dispuestos masivamente en la periferia. Con relación a los conos el número total es próximo a 6.200.000, que se pueden dividir en tres tipos según su coeficiente de sensibilidad espectral máximo: conos sensibles a longitudes de onda larga (conos L), conos sensibles a longitudes de onda media (conos M) y conos sensibles a longitudes de onda corta (conos S).

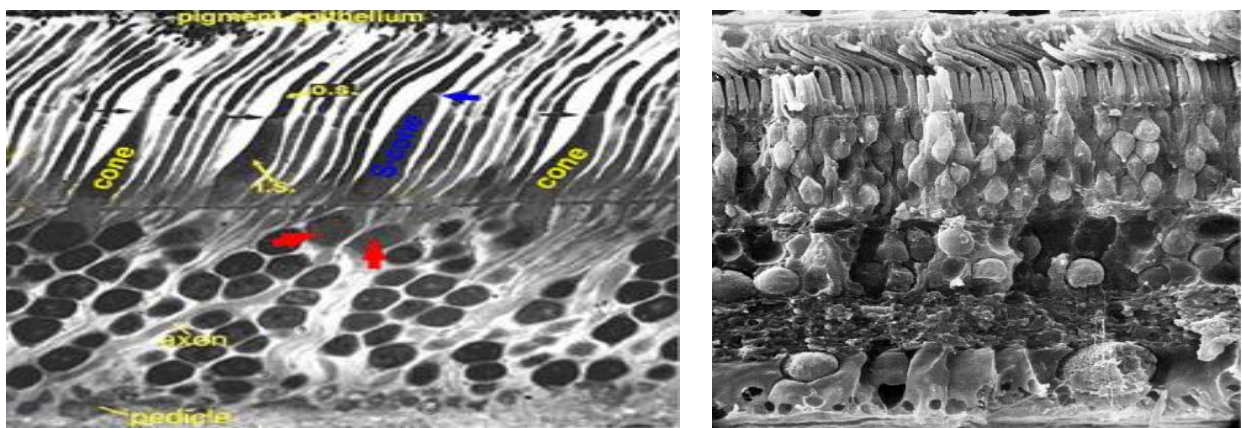


Figura 20. Diferente disposición de las capas retinianas según la sección.

Tal y como se explicará detalladamente en el apartado correspondiente, la proporción de conos L, M y S no es homogénea. En la retina central existen 5.500.000 de conos L y conos M mientras que los 700.000 conos S están situados en la retina paracentral y en la retina periférica. La distribución de fotorreceptores en un corte horizontal de la retina permite, en gran medida, entender la funcionalidad visual. La gráfica siguiente muestra una densidad constante de conos, próxima a 14.000 fotorreceptores/mm², a lo largo de toda la retina, salvo en la fovea donde de forma concreta el número aumenta hasta 180.000 fotorreceptores/mm².

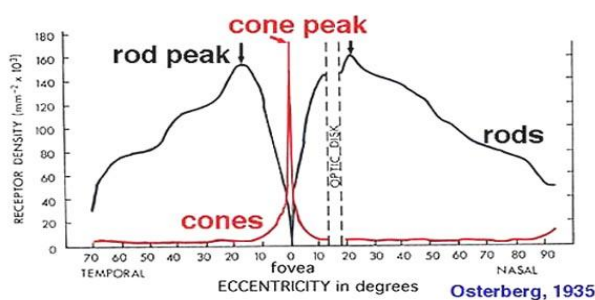


Figura 21. Distribución de fotorreceptores en el meridiano horizontal de la retina. Tomado de Osterberg (1935).

La capa nuclear interna es más gruesa a nivel de las zonas centrales de la retina debido, por una parte, a la mayor densidad de conos, y por tanto de células bipolares específicas para conos y, por otra parte, a la existencia de células horizontales y amacrinas más pequeñas, funcionales, en general, en la primera y segunda sinapsis respectivamente. El fascículo óptico, como es bien sabido, está constituido por los axones más de 1.000.000 de células ganglionares. En ellas converge la información proveniente de los receptores, a través de las bipolares de cono y de bastón.

Los bastones están presentes en proporción 20 veces mayor a lo largo de toda la retina con un pico de máxima densidad a 18°-20° de la fóvea y decreciendo hasta su anulación en la zona fóvea. Naturalmente en la papila óptica no existen fotorreceptores, ni conos ni bastones.

En la siguiente tabla, a modo de resumen, se muestran algunos datos de interés relativos a características de la retina en este sentido:

Máxima densidad de conos en la zona central de la Fóvea (50 x 50 μm)	178.000-238.000/mm ²
Número total de conos en la Fóvea	Aprox. 200.000 conos
Número de conos en la retina	6.400.000 millones.
Número de bastones en la retina	110.000.000 a 125.000.000 millones.
Distribución de los bastones	La densidad máxima de bastones se encuentra a los 18° desde el centro de la fóvea, donde hay 160.000 bastones/mm ² No existen bastones en la fóvea. Número medio 80-100.000 bastones/mm ²
Proporción de conos/células ganglionares en la Fóvea	1 cono por cada 2 células ganglionares
Proporción de conos/células del epitelio pigmentario	30 conos/células epitelio pigmentario en la Fóvea
Proporción de bastones/células del epitelio pigmentario	En la periferia 22-28 bastones/célula epitelio pigmentario
Tabla 1. Datos cuantitativos relativos a la retina.	

Los bastones miden entre 2 y 5 micras de diámetro, mientras que los conos miden entre 5 y 8 micras; teniendo como principales segmentos: Segmento Interno que contiene el citoplasma con sus orgánulos y el núcleo, Cuerpo Sináptico que conecta los fotorreceptores con las células neuronales posteriores: es decir, las células horizontales y bipolares, que constituyen el siguiente eslabón de la cadena visual, dando lugar a las triadas de la primera sinapsis.

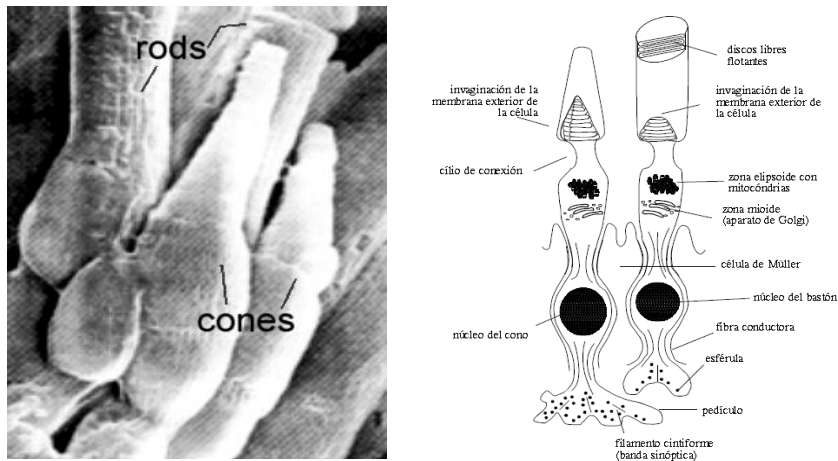


Figura 22. Fotografía de detalle por microscopía electrónica de conos y bastones.

Respecto al Segmento Externo se debe saber que está constituido por más de 1000 discos separados en el caso de los bastones y con plegamiento de membrana en el caso de los conos, que contienen, cada uno de ellos, en torno a 1000 moléculas de pigmento fotosensible. En el caso de los bastones se denomina rodopsina, mientras que los pigmentos de los conos son eritrolabe, clorolabe y cianolabe.

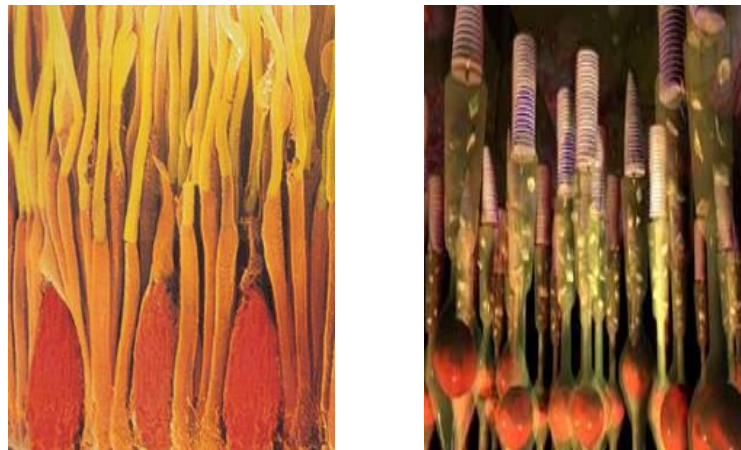


Figura 23. Anatomía de los fotorreceptores: Cono y bastón.

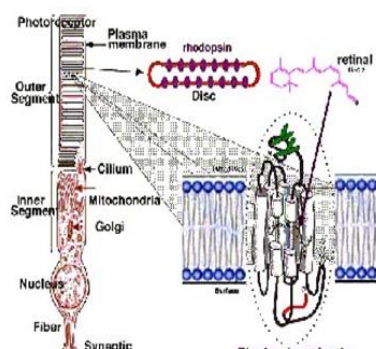
En la tabla siguiente se resumen las características comparativas de ambos elementos celulares retinianos.

CARACTERÍSTICAS	CONOS	BASTONES
Estructura.	Direccionalmente selectivos	Menor selectividad de dirección
Concentración de fotopigmentos.	Menor que en bastones.	Elevada concentración.
Conexiones.	Cada cono en la región central conecta con 2 bipolares enanas que a su vez conectan con 2 ganglionares enanas.	Convergencia de muchos bastones a una sola bipolar en brocha.
Respuesta a la luz.	Hiperpolarización	Hiperpolarización
Amplificación	Baja	Elevada
Umbral	Baja sensibilidad (umbral elevado). Detección de un solo fotón. Umbral de iluminación: superior a 100 fotones.	Alta sensibilidad (umbral bajo). Detección de un solo fotón. Umbral de iluminación: superior a 10 fotones.
Saturación.	Sólo para luz muy intensa.	Saturados con luz diurna.
Mínimos de sensibilidad espectral en nanómetros	Visión fotópica (cromática). Tres tipos de pigmento.	Visión escotópica (acromática). Un único pigmento.
Resolución espacial	Elevada.	Muy baja debido a la convergencia.
Resolución temporal	Alta	Baja
Respuesta temporal	Rápida	Lenta
Tiempo de regeneración	Unos 5 minutos.	Entre 40 y 60 minutos.

Tabla 2. Características comparativas entre fotorreceptores.

Pigmentos fotosensibles de Conos y Bastones

Los pigmentos visuales se distinguen por sus propiedades espectrales. Los pigmentos de la retina humana sensibles a la luz incluyen al pigmento de los bastones utilizado en la visión con baja luminancia (condiciones escotópicas y mesópicas), la rodopsina y tres pigmentos de los conos responsables de la discriminación de los colores y de la visión de la luz del día (condiciones fotópicas). El fotopigmento de los bastones de la retina es más abundante y estable que los pigmentos de los conos.



La mayoría de los pigmentos visuales, incluyendo la rodopsina, consisten en una apoproteína, la opsina, a la cual se halla unida la molécula cromófora 11-cis-retinal.

En la rodopsina, el cromóforo está unido en forma de ácido conjugado de la unión de una base de Schiff con un residuo de lisina de la apoproteína.

Figura 24. Pigmento visual de bastón en el segmento externo del fotorreceptor.

Los fotorreceptores de todos los vertebrados responden a la luz en función de los pigmentos visuales que se encuentran incrustados a nivel de la bicapa lipídica de los repliegues de membrana, en el caso de los conos, y en los discos membranosos, en el caso de los bastones.

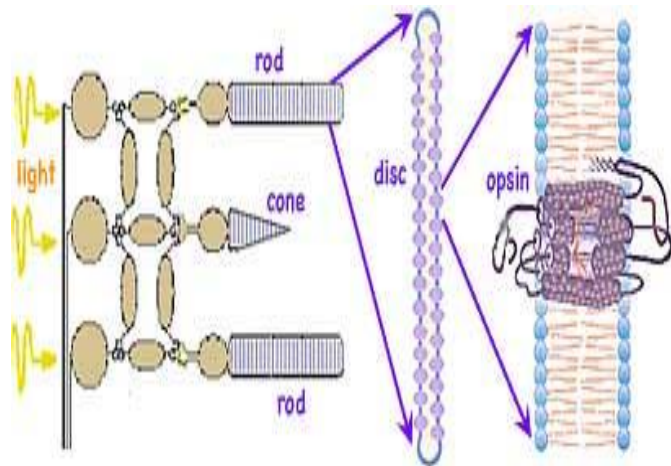


Figura 25. Disposición relativa del pigmento macular en los discos de los fotorreceptores.

Como es sabido, los bastones, que contienen rodopsina, son los responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad, presentando un pico de mayor sensibilidad hacia la longitud de onda de 500 nm (luz verde azulada). Los conos, por su parte, contienen tres tipos diferentes de opsinas. Una con mayor sensibilidad para las longitudes de onda largas (luz roja), otra sensible a las longitudes de onda media (luz verde) y otra con mayor sensibilidad a las longitudes de onda cortas (luz azul). Los conos son la base de la percepción en color.

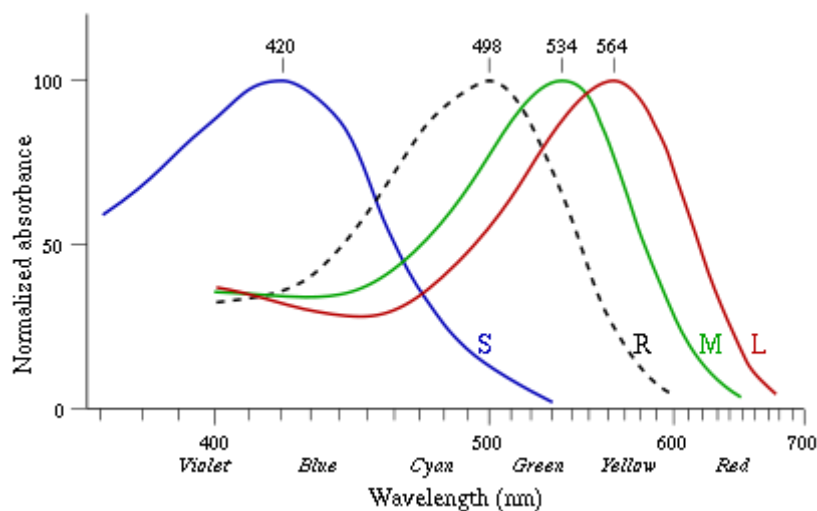


Figura 26. Curvas de absorción espectral de los pigmentos de fotorreceptores.

Células bipolares

Ramón y Cajal (1893), ya describió dos tipos básicos de células bipolares, unas que recibían ingresos exclusivamente de conos y otras que lo hacían exclusivamente de bastones.

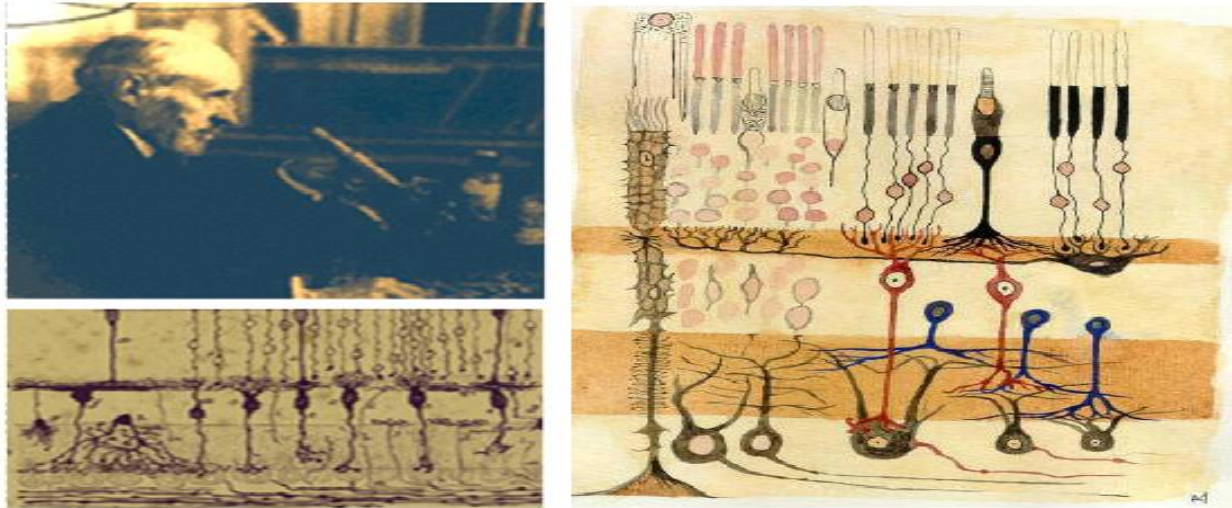


Figura 27. Esquemas de la retina realizados por Ramón y Cajal con diferenciación de los tipos de bipolares.

Esto refuerza la teoría de la duplicidad retiniana, pues establece dos vías centrípetas para la conducción del estímulo visual: conos-bipolar de conos y bastones-bipolar de bastones, si bien entre las primeras cabe distinguir en un primer término entre polisinápticas o difusas y enanas o monosinápticas.

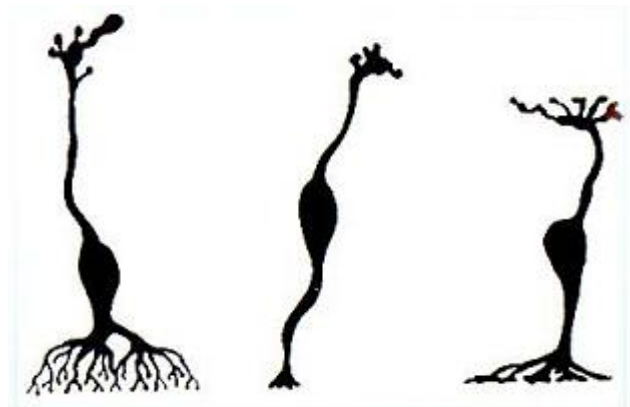


Figura 28. Tipos de neuronas bipolares: de bastón, y de cono. Tomado Hogan-Alvarado (1985).

Un solo pedículo de cono establece sinapsis con dos tipos de bipolares individuales en la retina de los primates: la bipolar invaginante (enana), cuyas dendritas constituyen el elemento central de la triada y la bipolar plana (enana), que establece contactos del tipo unión basal en la membrana no invaginada del pedículo.

Las células bipolares no generan potenciales de acción del tipo “todo o nada”. Responden a los estímulos presinápticos con potenciales graduados transitorios de dos tipos: Hiperpolarizantes y despolarizantes. Dado que los axones de estas células son

muy cortos, los potenciales generados en sus dendritas son también conducidos por electrotono hacia sus terminaciones axónicas.

Células horizontales

Morfológicamente se distinguen dos tipos de células horizontales en la retina de los vertebrados: células horizontales de axón corto y células horizontales sin axón, que se diferencian en su estructura y conexiones con los fotorreceptores. Los vertebrados tetrápodos en general, exceptuando los primates, tienen un solo tipo de célula de axón corto, que según las especies presenta diferencias en el número de sus dendritas y en la estructura y longitud de su axón. En la retina de gato se distinguieron dos tipos funcionales (Gallego, 1971; Kolb, 1974; Nelson, 1975; Boycott, 1978).

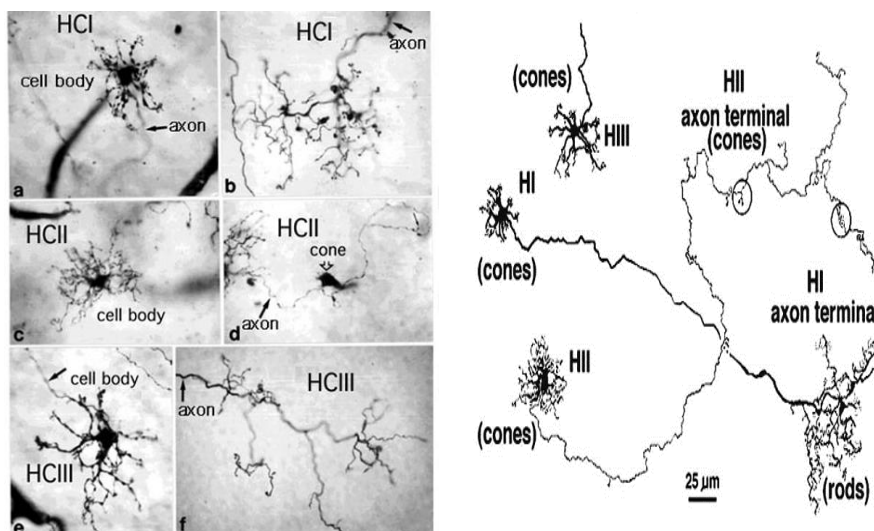


Figura 29a y 29b. Tipos de células horizontales según Golgi y por microscopía óptica.

Estudios combinando microscopía óptica y electrónica con el método de Golgi han demostrado que en retina humana existen tres tipos de células horizontales (Kolb et al., 1994).

Las células horizontales de tipo I no poseen axón y contactan preferencialmente con conos “rojos” y “verdes” aunque también con conos “azules”. Las células horizontales de tipo II, o células horizontales con axón, contactan preferentemente con conos “azules” pero también con otros tipos de conos a nivel de sus terminaciones dendríticas y únicamente con conos “azules” a nivel de su axón terminal. Las células horizontales de tipo III son semejantes a las células de tipo I, aunque de mayor tamaño a cualquier excentricidad y evitan cualquier contacto con conos “azules” (Ahnelt y Kolb, 1994). Un diagrama de las conexiones sinápticas de los distintos tipos de células horizontales se presenta en la figura correspondiente.

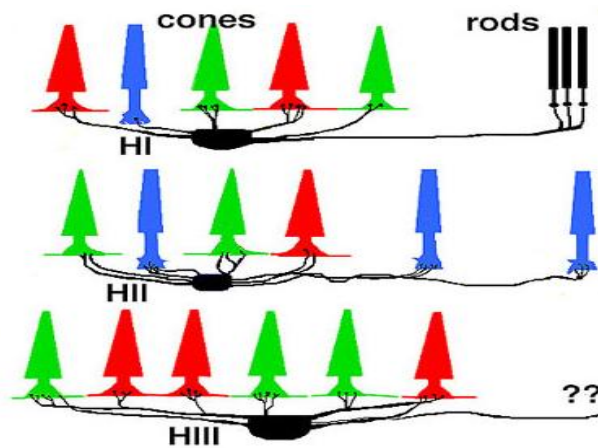
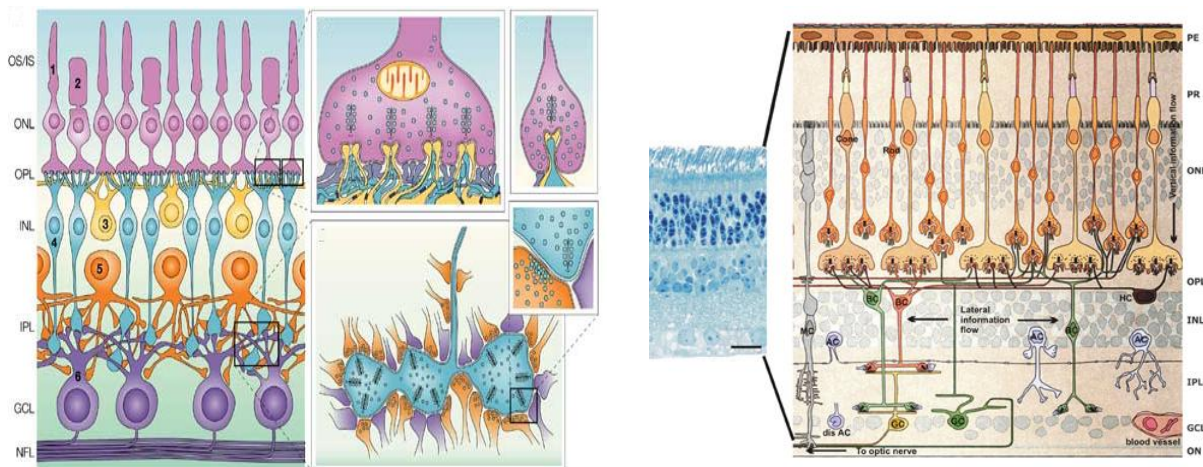


Figura 30. Tipos de conexiones de células horizontales. Tomado de Ahnelt y Kolb (1994).

Las células horizontales responden con una hiperpolarización. Mediante las conexiones transversales, estas células modulan la respuesta del sistema fotorreceptor-bipolar. En gran parte, las conexiones entre células horizontales se efectúan mediante sinapsis eléctricas y estas células, pueden mediar en la información lateral transferida a larga distancia. La acción inhibitoria de la célula horizontal es la que modula las interacciones antagónicas entre zonas retinianas concéntricas; fotorreceptores centrales y periféricos. En la zona limítrofe entre iluminación y oscuridad, las diferencias de polarización de las membranas de los fotorreceptores son máximas. La célula horizontal aumenta el contraste entre las dos zonas, facilitando la distinción de contornos. Este mecanismo es la base de la discriminación del contraste, y se repetirá sucesivamente en los niveles superiores para amplificar el contraste claridad-oscuridad.



Figuras 31a y 31b. Entramados horizontales, bipolares, ganglionares.

Como es sabido, en la retina, los sistemas de circuitos nerviosos se agrupan en dos capas plexiformes, de tipo trama. En la externa se encuentran las prolongaciones de las células receptoras, bipolares y horizontales, mientras que la capa interna corresponde a las células bipolares, amacrinas y ganglionares. De esta forma las células bipolares establecen un puente entre ambas capas plexiformes.

Otras neuronas de importancia en las conexiones retinianas son las **células amacrinas**, que envían señales en dos direcciones: directamente desde las células bipolares a las ganglionares, o bien horizontalmente dentro de la capa plexiforme interna.



Figura 32. Fotografía de una neurona amacrina de la retina.

Células Ganglionares.

Transmiten las señales de salida desde la retina o el fascículo óptico hasta el cerebro. En animales de experimentación se han reconocido varios tipos; concretamente las Tipo W, con grandes campos receptores y sensibles para detectar los movimientos y las Tipo X e Y con campos receptores pequeños y se ocupan de la visión en color.

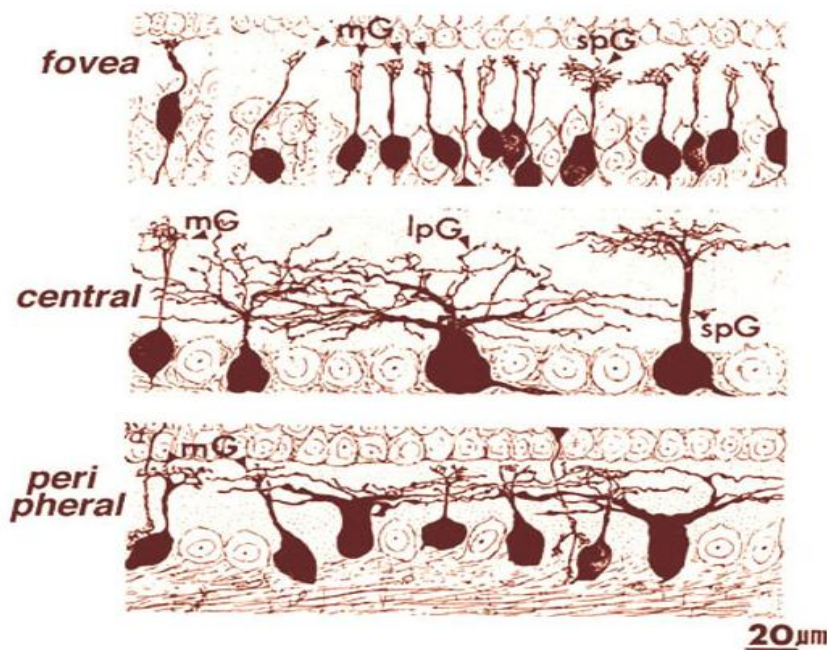


Figura 33. Células ganglionares en tinción de Golgi. Tomado de Polyak (1941)

La respuesta de las células ganglionares a la iluminación difusa es muy débil siendo la respuesta mucho mayor cuando se encuentran ante altas intensidades de luz, informan sobre los contrastes lumínicos. En los humanos hay aproximadamente 1.600.000 células ganglionares por lo que convergen en cada célula una media de 60 bastones y 2 conos. A medida que nos acercamos al centro de la retina el número de bastones y conos que convergen en cada fibra disminuye y son más delgados.

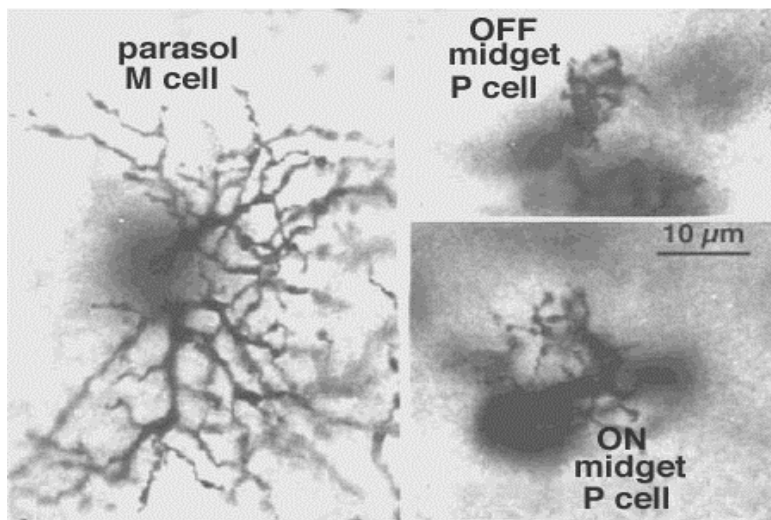


Figura 34. Células ganglionares del centro retiniano mediante tinción de Golgi.

Epitelio pigmentario

Es una estructura de gran importancia en la retina rico en melanina que es el pigmento que se ubica en el interior de las células para impedir la reflexión de la luz por todo el globo ocular, lo que supone un aspecto vital para la visión nítida. Esta capa también contiene grandes cantidades de vitamina A, sufriendo un intercambio bilateral a través de la membranas celulares de los segmentos externos de los bastones y conos.

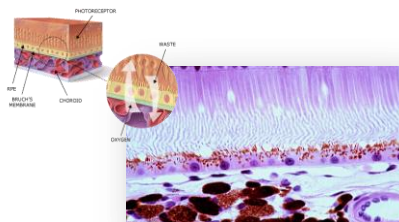


Figura 35. Epitelio pigmentario de la retina.

En este estudio, se ha realizado, como se explica en el apartado correspondiente, un análisis cuantitativo de los diferentes estratos nucleares de la retina, se ha comparado la densidad celular de las capas nuclear externa e

interna de retinas de animales de experimentación y se ha determinado el tipo de fotorreceptor visual más afectado por los distintos tipos de iluminación.

1.2.2.- Principales mecanismos de homeostasis celular.

La homeostasis se define como el conjunto de fenómenos de autorregulación que conducen al mantenimiento en la composición y propiedades del medio interno de un organismo. Esto se logra gracias a un balance entre la división celular y la eliminación de células. Ambos procesos son estrictamente regulados para permitir el desarrollo de nuevas condiciones y propiciar la protección contra agentes dañinos y contra diversas patologías.

El ser humano presenta diferentes mecanismos que regulan la muerte celular, los cuales son esenciales para el adecuado desarrollo y mantenimiento de la homeostasis. Las células crecen controladamente gracias a la expresión e inactivación de diferentes genes que regulan las señales de división y muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados.

La muerte celular fisiológica ha sido conocida por varios nombres. Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis. En 1879, utilizando observaciones microscópicas se introducen los términos Karyorhesis y Karyolysis, que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo. Diez años más tarde, Arnheim, propone los términos piknosis y marginación de la cromatina. Flemming, estudiando los folículos de los ovarios de los mamíferos, observó y describió la desaparición de células, denominando a este proceso cromatolisis, término que fue reutilizado por Gräper, en 1914, como antónimo de los procesos de mitosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr y Wyllie implantan el término «apoptosis», ampliamente utilizado en nuestros días.

En la última década, hemos sido testigos de un crecimiento exponencial de los trabajos de investigación realizados sobre los procesos que rodean a la muerte celular y parece que se ha llegado al consenso de englobarlos en dos grandes grupos: necrosis y apoptosis. Actualmente se está considerando también el mecanismo de regulación por autofagia.

Se ha establecido que las características de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren otros tipos de muerte como la necrosis. En la

necrosis la muerte es un proceso «pasivo» que no requiere de síntesis proteica y se caracteriza por procesos violentos como daño mitocondrial y una rotura de la membrana, un proceso osmótico desmesurado y finalmente lisis celular y liberación de su contenido al medio exterior atrayendo células inflamatorias

Sin embargo, la apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica y el contenido intracelular nunca es liberado al medio circundante, por lo tanto no desencadena reacciones inflamatorias.

	Necrosis	Apoptosis
Condiciones	Patológica	Fisiológica Alteraciones patológicas
Tamaño celular	Edema	Retracción
Membrana citoplasmática	Lisis	Rotura Expresión de glucoproteínas
Mitocondria	Hinchazón	Rotura / Funcional
Degradación del ADN	Aleatoria	Ordenada
Requerimiento energético	No	Si
Reacción inflamatoria	Si	No

Tabla 3. Diferencias entre los procesos de necrosis y apoptosis

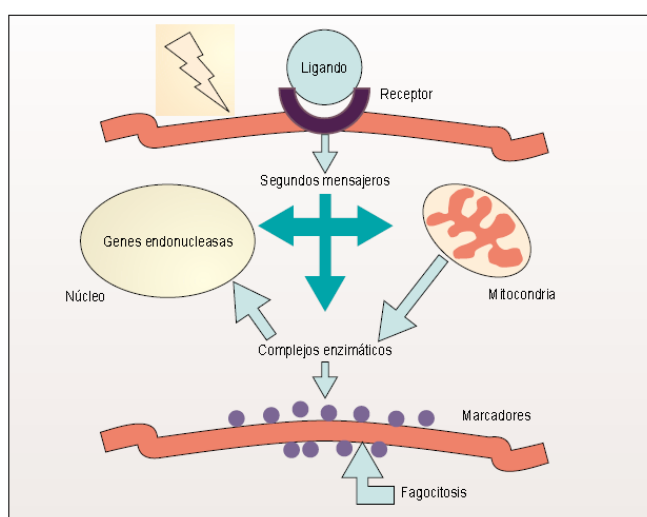


Figura 36. Rutas celulares activadas durante los procesos apoptóticos.

La apoptosis se ha definido como un mecanismo fisiológico de muerte programada, inherente al desarrollo celular, caracterizado por eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares distintivos que requieren una regulación coordinada de genes específicos.

1.2.2.1.- Proceso de la apoptosis con su cascada de compuestos

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por una gran variedad de estímulos, por diversas señales que pueden ser fisiológicas o estimulaciones ambientales exógenas entre las que se encuentra la luz. Existen dos principales rutas de señalización mediante las cuales una célula se vuelve apoptótica. La vía extrínseca, la cual es iniciada por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la superficie celular llamados receptores de la muerte. Ésta interacción lleva a la activación de la caspasa 8 quien comienza una cascada de activación de otras moléculas que provocan la muerte celular. La otra ruta corresponde a la vía intrínseca, es iniciada a nivel mitocondrial y lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis.

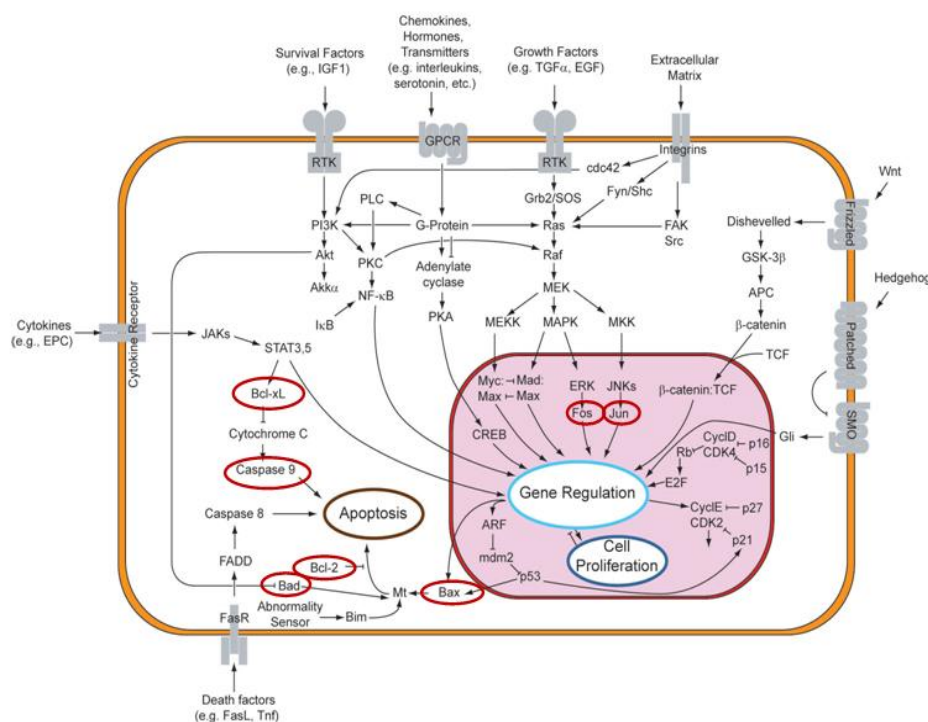


Figura 37a. Cascada de reacciones intracelulares implicadas en la homeostasis.

Cuando la célula recibe una señal de muerte el proceso se inicia en la mitocondria donde se produce una alteración de la permeabilidad de sus membranas debido a la formación de un complejo multiprotéico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial), que conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de caspasas. Otros episodios son alteraciones en la cadena transportadora de electrones, pérdida

del potencial electroquímico de membrana y cambios del ciclo metabólico de oxidación/reducción. A continuación, se producen una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. La proteólisis es irreversible y altamente específica. Ocurre además la fragmentación intranuclear del ADN y la pérdida sistemática de diferentes sustratos vitales, ambas por efecto de proteasas específicas como las caspasas. El proceso ordenado de muerte celular por apoptosis es caracterizado por diversas fases morfológicas:

- Se inicia la muerte celular por pérdida de contacto con sus células vecinas y por desprendimiento del tejido.
- Se presenta una condensación del núcleo y de la cromatina.
- Se produce una condensación del citoplasma con marcada reducción del volumen celular.
- Se libera citocromo C desde las mitocondrias al citoplasma, perdiéndose potencial de membrana.
- Se produce fragmentación internucleosomal del ADN por parte de endonucleasas dependiente de Mg^{2+} .
- Se producen burbujas de la membrana celular y vesicularización del contenido celular (cuerpos apoptóticos).
- Se lanza una señal a células vecinas y se activa la atracción de fagocitos.

Los procesos de apoptosis juegan un papel fundamental en el desarrollo normal de los tejidos. Recientemente se ha relacionado la inhibición de la apoptosis con mecanismos que pueden dar lugar a procesos neoplásicos. Son muchos los elementos a nivel molecular que pueden ser alterados para inducir a las células normales a anular los procesos de apoptosis, perpetuándolas como tumores. Varios de los proto-oncogenes y genes supresores de tumores también están involucrados en el control de los mecanismos que gobiernan la apoptosis celular. En tal sentido no es sorprendente que la pérdida en la función normal de los productos de estos genes determine la progresión neoplásica por pérdida de los mecanismos normales de muerte celular.

En los párrafos anteriores se introduce el conocimiento de la regulación por homeostasis, ya que esta tesis tiene entre sus objetivos, conocer si la luz induce muerte celular por apoptosis o si en la pérdida de número de células inducida por la luz intervienen otros mecanismos.

1.2.3.- Principales factores y mecanismos implicados en el metabolismo intracelular

1.2.3.1.- Principales factores implicados

Para esta tesis doctoral y con el fin de profundizar en el conocimiento de los posibles efectos tóxicos de la luz, se ha diseñado un estudio experimental de análisis a nivel de expresión génica de algunos mecanismos implicados en la acción tóxica de la luz. En este epígrafe se describen, de manera sencilla, algunos aspectos que se han estudiado en el análisis de la expresión génica para que sirva de introducción en este sentido.

En primer lugar se propuso el estudio de:

- **Genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos;** es bien conocido que algunos de estos genes sufren procesos de regulación al alta (up-regulation) o a la baja (down-regulation) en exposiciones agudas a la luz, pero se desconoce si sucede lo mismo en exposiciones largas, en ciclo circadiano y de intensidad moderada. Los fotones lesivos de la luz tras ser absorbidos por la rodopsina crean una señal de muerte por activación de factor de transcripción AP-1 (Wenzel et al., 2000). Este es un complejo que consiste en heterodímeros de las familias Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2) y Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D) y homodímeros de Jun (Curran et al., 1988). Los complejos inducidos por la luz están compuestos principalmente de proteínas c-Fos, c-Jun y Jun-D (Hafezi et al., 1999). Por otro lado, la ejecución de la apoptosis depende de diferentes miembros de la familia Bcl-2 tanto antagonistas de la muerte (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Bag-1, Mcl-1, A1) como agonistas (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik, Hrk). La sobre-expresión de Bcl-2 retrasa la apoptosis inducida por iluminación constante (Chen et al., 1996) o exposiciones cortas a altas intensidades de luz (Joseph y Li, 1996). Otro de los sistemas implicados en la apoptosis es el de las cistein-proteasas o caspasas.

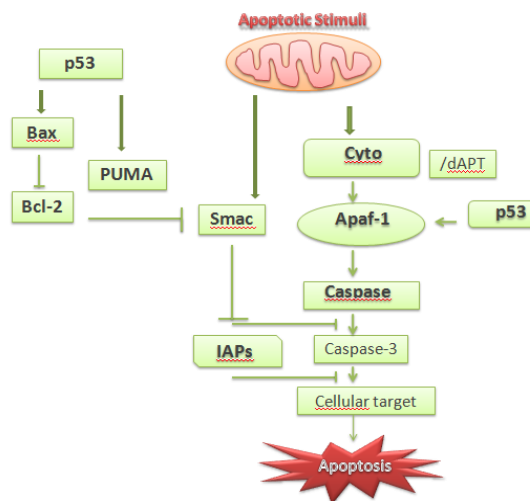


Figura 37b. Cascada de apoptosis

- Proteínas ligantes del calcio** implicadas en la homeostasis intracelular del ión calcio y mediadoras de algunas otras funciones. Como es sabido, el calcio (Ca^{++}) interviene en la mayoría de los procesos celulares, regulando diferentes canales de membrana, proteínas acopladas a ella y vías de señalización. Por ello el mantenimiento de su homeostasis intracelular es clave para la normal fisiología celular. Entre los mecanismos responsables del mantenimiento de las concentraciones intracelulares adecuadas de Ca^{++} se encuentra un grupo muy heterogéneo de proteínas denominadas colectivamente proteínas ligantes del calcio (Haeseleer y Palczewski, 2002). Muchas de estas proteínas se encuentran alteradas en las patologías neurodegenerativas y por ello se estudia si sufren modificaciones en las patologías retinianas relacionadas con la exposición a la luz. Según la bibliografía consultada no existe ninguna información respecto a los posibles cambios de estas proteínas tras iluminación a largo plazo en ciclo circadiano. En este trabajo se han incluido tres proteínas ligantes del calcio: una de fotorreceptores (S100a6) y dos de neuronas bipolares (calretinina y calbindina D28k).
- Receptor de las neurotrofinas Trk-B**, que podría estar implicado en los procesos de protección contra los efectos tóxicos de la luz ya que su ligando fisiológico, el **BDNF**, es un protector contra la degeneración retiniana inducida por la luz. Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que ejercen sus acciones principalmente en el tejido nervioso (Fariñas, 1999), pero

también en diferentes tejidos no nerviosos, especialmente sobre los órganos y células del sistema inmunitario (Vega y Cols., 2003, 2004). La familia de las neurotrofinas está formada por: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la NT-4. Estas moléculas actúan sobre las células sensibles a ellas uniéndose a receptores de la familia Trk: NGF se liga a Trk-A; BDNF y NT-4 a Trk-B; y NT-3 a TRC (Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006). Además, todas las neurotrofinas pueden ligarse a un pan-receptor de baja afinidad denominado p75NTR que media tanto funciones de supervivencia como de apoptosis de diferentes categorías celulares (Chao, 2003). De todas las neurotrofinas, el BDNF es la que parece tener más acciones sobre la retina. Así, se ha visto que actuando sobre Trk-B controla de manera célula-específica y experiencia-dependiente el remodelado de las estructuras neuronales del sistema visual (Liu et al, 2007), e incrementa la actividad fagocítica de las células pigmentadas del iris. Además, el BDNF parece estar más implicado en los fenómenos de protección de la retina ante diferentes tipos de lesión, desde los neurotóxicos hasta los inducidos por la exposición a la luz (Gauthier y Cols., 2005; Sailer y Cols., 2007). Sin embargo, la acción del BDNF sobre los fotorreceptores debe de realizarse de manera indirecta ya que estas células carecen del receptor Trk-B. Recientemente se ha propuesto que la acción del BDNF en la prevención de la degeneración de los fotorreceptores tras por acción de la luz se ejerce indirectamente a través de las células de Müller que liberarían CTNF y bFGF activos sobre los fotorreceptores. Pero Wilson y Cols. (2007) han observado que niveles bajos de BDNF producen protección de los fotorreceptores debido a una disminución del estrés oxidativo.

- **Metaloproteasas (MMPs) MMP-2, MMP-3 y MMP-9;** estas enzimas están implicadas en los procesos de renovación de la matriz extracelular y las membranas basales. Es conveniente conocer experimentalmente la implicación de algunas de estas enzimas ya que, está sobradamente referenciado que, en algunas enfermedades asociadas a la exposición a la luz se producen depósitos anómalos de sustancias que pueden relacionadas con la fisiopatología de las lesiones retinianas mediadas por la luz. Las metaloproteasas (MMPs) son una familia de proteínas que degradan de forma bastante selectiva los componentes

de la membrana basal y de la matriz extracelular. Entre sus funciones se encuentran las de participar en los procesos de neoformación vascular y la eliminación de tales restos celulares; igualmente, tienen un papel muy destacado en los procesos degenerativos y en los tumores (Lopez-Otin y Overall, 2002). Las MMPs están implicadas en todos los procesos que requieren remodelación de la matriz extracelular y actúan en equilibrio con sus inhibidores endógenos los TIMPs (tissue inhibitor of MMPs). Actualmente se conocen unas 20 MMPs agrupadas en 4 familias: 1) colagenasas (MMP-1, 8 y 13) que hidrolizan el colágeno intersticial; 2) gelatinasas (MMP-2 y 9) que hidrolizan el colágeno desnaturalizado y algunas proteínas no fibrilares; 3) la familia de la estromelina (MMP-3, 7, 10, 11 y 12); y 4) las MMPs unidas a membranas (MMP-14, 15, 16 y 17). La participación de estas proteasas en los procesos fototóxicos mediados por la luz se apoyan en datos tanto experimentales como clínicos. El grupo de Plantner (Plantner, 1991a; 1992; Plantner and Drew, 1994) fue el primero en describir la presencia de MMPs, concretamente MMP-1, MMP-3 y MMP-9, en la matriz situada entre los fotorreceptores; posteriormente se confirmó que la presencia de la MMP-2 aumenta tras la exposición a la luz (Plantner et al., 1998). La sobrestimulación de la retina por la luz lleva igualmente a un incremento en la expresión de la MMP-9 o gelatinasa B independientemente de que se produzca o no pérdida de fotorreceptores (Papp et al., 2007). Por otro lado se ha observado que la fotocoagulación con láser induce al epitelio pigmentario a producir MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (Flaxel et al., 2007).

- **Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.** Desde el punto de vista histopatológico, ciertas retinopatías se caracterizan por el cúmulo de depósitos de material rico en lípidos específicos por debajo del epitelio pigmentario, y por alteraciones en el “turn-over” de algunos componentes de la matriz extracelular (ME) de la membrana de Bruch, aunque se desconoce si son causa o consecuencia de la degeneración retiniana (Kliffen et al., 1997; Spraul et al., 1997, 1998, 1999). El mantenimiento de la estructura y fisiología de la ME, en condiciones de normalidad, requiere un “turn-over” permanente del colágeno y otros componentes de la misma y en este sistema desempeñan un papel clave las metaloproteasas (MMPs) y sus inhibidores tisulares específicos (TIMPs)

(Corcoran et al., 1996; Nagase y Woessner, 1999). Alteraciones mínimas en la proporción de estos factores producen cambios profundos en la ME, entre los que se incluyen engrosamientos o depósitos. La expresión de la mayoría de estas moléculas es regulada transcripcionalmente por factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, interacciones célula-célula y célula-matriz y la transformación celular (Jones et al., 2003). La actividad de las MMPs es controlada por diferentes moléculas entre las que se encuentran los TIMPs, tissue inhibitor matrix metalloproteinases (Williamson et al., 1999). Aunque estas moléculas tienen sustratos más o menos específicos de actuación, la mayoría de ellos pueden unirse a casi todas las MMPs. Los TIMPs están implicados en la invasión celular, tumorigénesis, metástasis y angiogénesis (Gomez et al., 1997) funciones que son atribuibles a la inhibición de las MMPs o a su propia actividad biológica. Se conocen cuatro TIMPs (TIMP-1 a TIMP-4) que también son regulados durante la remodelación tisular y en condiciones fisiológicas para mantener el balance de la ME (Gomez et al., 1997). Las MMPs y los TIMPs parecen estar implicadas en los procesos fototóxicos mediados por la luz (Plantner et al., 1998a, b; Elliot et al., 2006; Flaxel et al., 2007). El epitelio pigmentario posee altos niveles de expresión de MMP-2 (interviene en la degradación del colágeno IV, fibronectina y otros componentes de la ME) el cual es importante en la formación de los depósitos antes comentados (Ahir et al., 2002; Eichler et al., 2002) ya que se ha encontrado disminuida en ratones expuestos a luz azul en consonancia con la presencia de depósitos (Cousins et al., 2002). Por su lado el TIMP-2, también está presente en el epitelio pigmentario y es capaz tanto de favorecer como de inhibir a la MMP-2 (Leu et al., 2002). Los TIMPs 2 y 3 son los inhibidores específicos de las MMPs de membrana, y TIMP-3 es capaz de bloquear al TNF, pero todos ellos TIMPs pueden bloquear la acción de casi todas las MMPs. De cualquier forma, TIMP-3 se encuentra aumentado en el envejecimiento y Degeneración Macular Asociada a la Edad (Kamei y Hollyfield, 1999). La producción de algunas MMPs y agregasas ADAMTSs está regulada por citoquinas inflamatorias factores de crecimiento, interacciones célula-célula y célula-matriz. La mayoría de las MMPs se producen y liberan como formas inactivas mientras que otras sufren activación intracelular y liberadas como enzimas activas. Las vías para bloquear las metaloproteasas son: 1) inactivación de las citoquinas y factores de

crecimiento; 2) inhibición de las vías de señalización; 3) inhibición de la transcripción; 4) inhibición de la activación intracelular; 5) inhibición de la actividad metaloproteasas; 6) aumento de la producción de TIMPs.

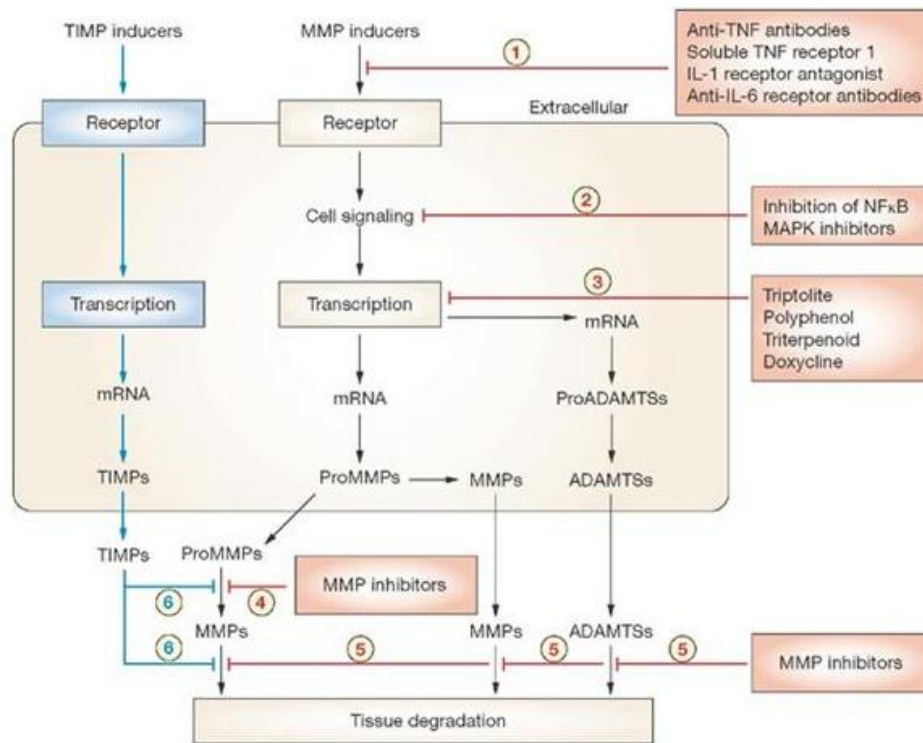
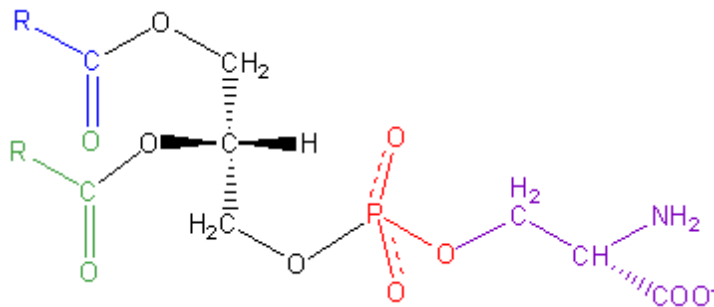


Figura 37c. Regulación de la actividad de las MMPs.

1.2.3.2.- Principales mecanismos implicados

Con relación a los genes pro- apoptóticos y anti-apoptóticos y como introducción a las caspasas es conveniente conocer que son una subfamilia de 13 cistein-proteasas que son sintetizadas de manera inactiva y son activadas en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares por corte proteolítico. Es de interés para este estudio conocer que las caspasas en la apoptosis se pueden clasificar en dos grupos: las iniciadoras (de señalización o que activan a otras caspasa) como las 2, 8, 9 y 10; y las efectoras o ejecutoras como las 3, 6 y 7 que hidrolizan sustratos selectivos. La consecuencia final es la fragmentación de la célula, formando pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos aún rodeados de membrana; la cual cambia de composición dándose una translocación de la fosfatidilserina a su superficie la cual sirve de señal de reconocimiento para macrófagos y así los cuerpos son rápidamente fagocitados. La fosfatidilserina es un componente de los fosfolípidos que usualmente se

mantiene en la monocapa lipídica interior, en el lado citosólico, de las membranas celulares gracias a una enzima llamada flipasa.



Cuando una célula sufre apoptosis, la fosfatidilserina ya no se limita a la parte citosólica de la membrana, sino también queda expuesta a la superficie de la célula.

Figura 38. Estructura de la fosfatidilserina.

Hasta ahora, se han evidenciado, en mamíferos quince miembros de la familia y para su mejor comprensión los expertos los han dividido tres subfamilias:

1. Subfamilia Bcl-2 (a): Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 y A1.
2. Subfamilia Bax (pro-apoptótica): Bax, Bak y Bok.
3. Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk, BNIP3 y BimL.

Las proteínas Bcl-2 son una familia de proteínas relacionadas en la respuesta a la apoptosis. Algunas de ellas (Bcl-2 y Bcl-XL) son anti-apoptóticas mientras que otras (Bad y Bax) son pro-apoptóticas. La sensibilidad de las células a la apoptosis depende del balance entre estas proteínas. Las proteínas pro-apoptóticas se encuentran en el citosol, donde actúan como sensores del daño celular o del estrés.

Si hay estrés celular se trasladan a la membrana de la mitocondria. Estas proteínas antagonistas forman dímeros, siendo su abundancia relativa la que determina el umbral de desencadenamiento de la muerte celular

En este momento de la introducción es conveniente considerar el papel de la mitocondria en la regulación de la muerte celular. La mitocondria juega un importante rol en la regulación de la muerte celular. Algunas proteínas anti-apoptóticas están localizadas en la parte exterior de la membrana de la mitocondria y también miembros pro-apoptóticos como Bad y Bax también realizan sus efectos a través de la mitocondria, sea interactuando de forma indirecta o por acción directa sobre la membrana de la mitocondria. Las mitocondrias tienen la habilidad de promover la apoptosis, dejando salir el citocromo-C que junto con Apf-1 (apoptotic Alproteases activating factor-1) y el ATP forman un complejo (apoptosoma que lleva a la activación de la caspasa 9 y de la cascada de las caspasas). La sobreexpresión de Bcl-2 y de Bcl-XL confiere a las células protección frente a agentes tóxicos.

Para introducir el concepto de protooncogen se acude a la definición de oncogén que es un gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogen. Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer. En el hombre se han identificado y secuenciado más de 60 oncogenes en los diferentes cromosomas del genoma, formando un conjunto muy heterogéneo de genes. Los protooncogenes son genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división de la célula. Codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de otros genes, moléculas de traducción de señales que estimulan la división celular y reguladores del ciclo celular que hacen que la célula progrese a través de este ciclo. Los productos de los protooncogenes pueden localizarse en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo, y sus actividades se controlan de diversas maneras, incluyendo la regulación a nivel transcripcional, traduccional y de modificación de la proteína. En definitiva la división celular, y por lo tanto, la proliferación, es finamente regulada por una compleja maquinaria en la que participan entre otros elementos los denominados factores de transcripción que viajan al núcleo de la célula después de ser fosforilados. En el núcleo, estas proteínas se unen al ADN en secuencias reguladoras específicas que controlan la expresión de los genes. La superfamilia de los factores de transcripción AP-1 (activator protein 1) está formada por dos familias de proteínas: Fos y Jun, ambas relacionadas porque tienen una estructura muy similar. Estas proteínas se asocian entre sí para formar homodímeros o heterodímeros que se unen al ADN específicamente a la secuencia AP-1. Las proteínas Fos y Jun son los productos de los protooncogenes correspondientes Fos y Jun, a los cuales se les relaciona con el control de la proliferación, con la diferenciación o con la apoptosis de muchos tipos de células.

En la expresión de los genes los elementos que funcionan como mensajeros nucleares de la señal extracelular son los llamados factores de transcripción. Estas proteínas citoplasmáticas pasan de un estado inactivo o de reposo a un estado activo, cuando son fosforiladas por las proteínas quinasas que les transfieren grupos fosfato a residuos de serina o de treonina.

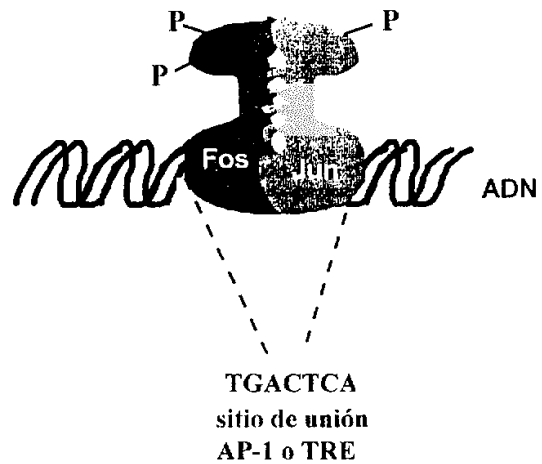


Figura 39. Esquema representativo de la secuencia consenso TGACTCA llamada AP-1 o TRE para el factor de transcripción AP-1. La secuencia AP-1 está presente en el promotor de una gran diversidad de genes

AP-1 es un factor de transcripción que resulta de la expresión de los protooncogenes Fos y Jun y de sus productos correspondientes. Este factor controla la expresión de muchos genes, pero además, contribuye a la actividad de otros factores. Fos y Jun, de manera independiente cada uno, forman dímeros con el factor ATF4, y Jun también con los factores ATF2 y ATF3.

De gran interés también en este estudio ha sido conocer las modificaciones de algunas proteínas ligantes de calcio presentes en las células de la retina. En este sentido y muy relacionado con los párrafos precedentes es sabido que entre los iones más distorsionadores de la configuración de las proteínas figuran el Ca^{2+} y el H^+ . Una de las reacciones que ocurren cuando se activan los genes de muerte es que aumenta la concentración de Ca^{2+} , que entra en una cantidad inusitada y activa enzimas (endonucleasas) que cortan las moléculas de ADN. El calcio es uno de los mensajeros más importantes dentro del microambiente celular. Alteraciones en la concentración de este ión puede influenciar diversos procesos celulares. Sin embargo, el calcio no actúa solo, sino unido a proteínas citoplasmáticas entre las que destacan la calbindina (CB) y calretinina (CR). Durante el desarrollo se ha relacionado a la calretinina con procesos de crecimiento dendrítico, remodelación, elongación axonal y sinaptogénesis, mientras que la calbindina está involucrada en migración neuronal, procesos de extensión y supervivencia celular. Dada la gran importancia de estas proteínas en el funcionamiento celular, y que su detección inmunohistoquímica permite identificar las células que las expresan se ha considerado su análisis en esta tesis.

En esta introducción no pueden faltar algunos conceptos elementales de proteínas implicadas en el metabolismo de la retina. No se va a realizar una exhaustiva explicación pues no es este el objeto de este epígrafe pero si se van a utilizar algunos párrafos para que con esquemas y conceptos elementales sea más productiva la aportación de este documento en su conjunto.

El receptor Trk-B es parte de la larga familia de receptores tirosinas quinasas. Una tirosina quinasa es una enzima que es capaz de añadir un grupo fosfato a ciertas tirosinas sobre proteínas diana, o substratos. Un receptor de la tirosina quinasa está localizada en la membrana celular, y es activado mediante un ligando al dominio del receptor extracelular. Otros ejemplos de receptores tirosina quinasa incluyen el receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.

La función primordial de la Tirosina Kinasa B es actuar como receptor catalítico de alta afinidad para varias proteínas de Factor de Crecimiento, que inducen la supervivencia y la diferenciación de distintas poblaciones de células.

Las neurotrofinas, también llamadas factores neurotróficos, son una familia de proteínas que favorecen la supervivencia de las neuronas. En este documento y para el objeto que se persigue es de especial interés la Tirosina Kinasa B (Trk-B).

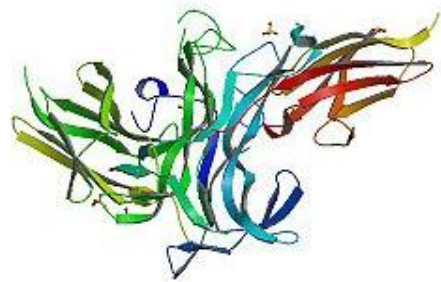


Figura 40. Esquema de la estructura del Trk-B

Las neurotrofinas que activan Trk-B son: Factor Neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), NT-4 (neurotrofina-4) y NT-3 (neurotrofina-3). Como tal, la Trk-B media los múltiples efectos de estos factores neurotróficos, que incluyen diferenciación neuronal y supervivencia.

Con relación al factor de crecimiento derivado del cerebro en el esquema siguiente se aprecia el ensamblaje de diferentes moléculas.

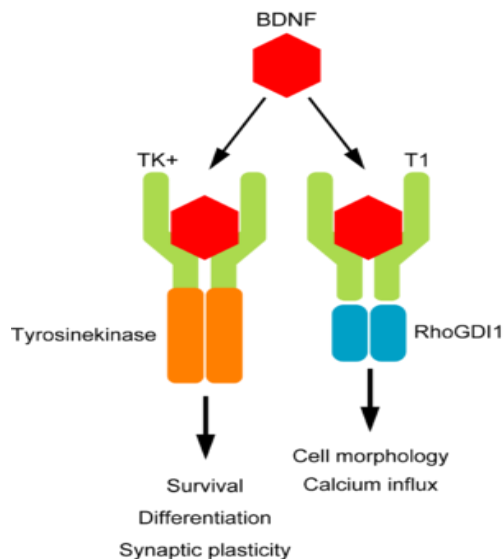


Figura 41. Esquema de receptores del BDNF.

El Factor neurotrófico de crecimiento del cerebro, también conocido como BDNF, es una proteína que en humanos es codificada por el gen BDNF. El BDNF es un miembro de las neurotrofinas, familia de los factores de crecimiento que está relacionada de manera convencional con el Factor de Crecimiento Nervioso, NGF. Los factores neurotróficos se encuentran en el cerebro y su periferia.

Por otro lado y para comentar algunos aspectos de interés de las enzimas metaloproteasas o metaloproteínas conviene recordar el concepto de matriz extracelular que es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta las células de los tejidos en mamíferos. La matriz extracelular está compuesta principalmente de tres clases de moléculas: proteínas estructurales como colágeno y elastina; proteínas especializadas como la fibrilina, la fibronectina y la laminina y proteoglicanos compuestos por una proteína central a la cual se unen cadenas largas de unidades de disacáridos repetitivos llamados glicosaminoglicanos (GAGs) formando así compuestos complejos de alto peso molecular que conforman la matriz extracelular. Por tanto las Metaloproteasas de matriz (MMPs) son enzimas codificadas por genes nucleares que pueden descomponer las proteínas, como el colágeno. Y dado que estas enzimas necesitan zinc o átomos de calcio para activarse adecuadamente, se las denomina metaloproteasas.

Las metaloproteasas participan en la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales. Existen 24 tipos distintos que participan en la remodelación del tejido conectivo, tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas, jugando un papel importante dentro de la respuesta inflamatoria y actuando como efectores de las interacciones en la modulación célula-célula.

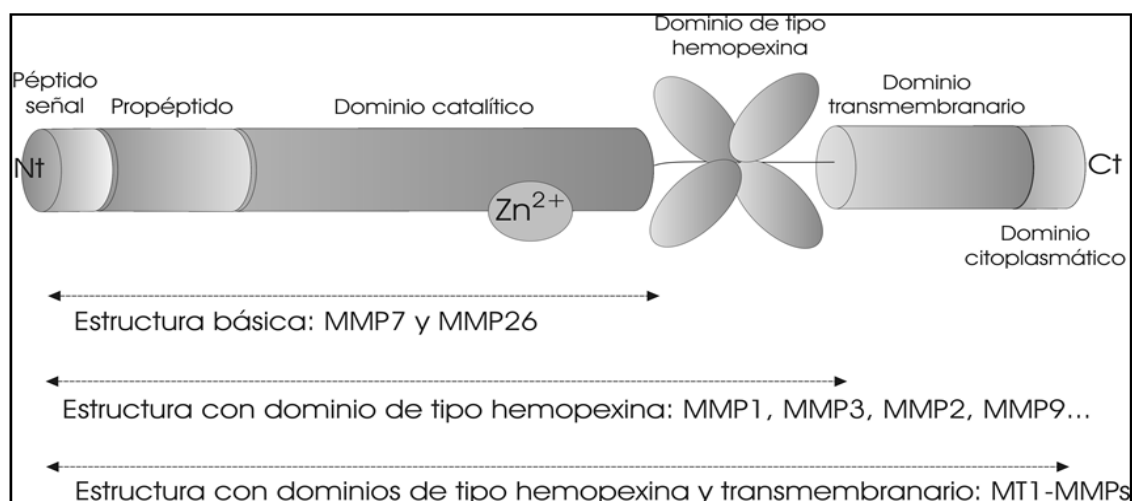


Figura 42. Esquema estructural de las metaloproteasas

La estructura básica de las metaloproteasas presenta una serie de dominios característicos: un péptido-señal que dirige la secreción al exterior de la célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes que median en la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembrana en el caso de las asociadas a la membrana plasmática. En la clasificación estructural de las metaloproteasas se distinguen ocho grupos: cinco grupos de metaloproteasas secretadas y tres de metaloproteasas asociadas a la membrana. Se dan muchos casos en los que las metaloproteasas liberan factores antiangiógenos por degradación de los componentes de la membrana extracelular, como es el caso de las MMP2 y MMP9, que están muy implicadas en la progresión tumoral pero que, además, intervienen en la hidrólisis de plasminógeno para liberar angiostatina, un potente antiangiógeno; otras, como la MMP8, están muy implicadas en procesos inflamatorios. En la figura se muestran las distintas estructuras de tres de las metaloproteasas implicadas.

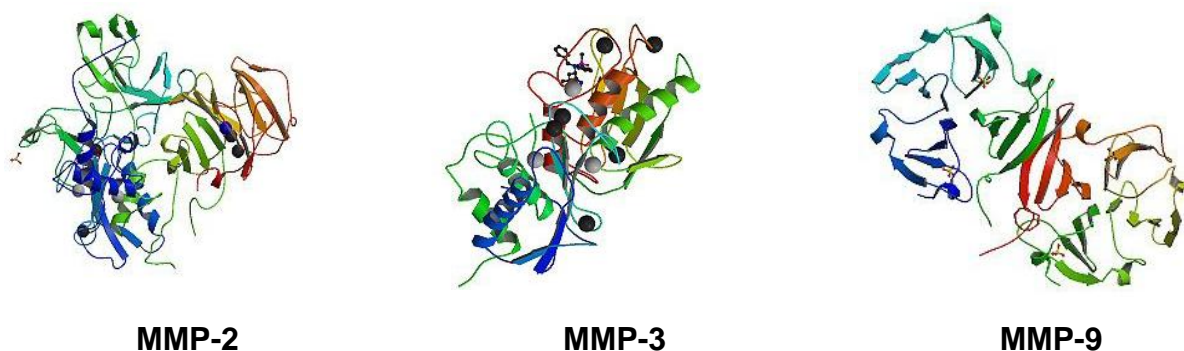


Figura 43. Estructura de las metaloproteasas analizadas en este estudio.

Como se ha referido en párrafos anteriores las metaloproteasas son proteasas que degradan prácticamente todos los componentes proteicos de la membrana extracelular. La actividad de estas enzimas está controlada por otras proteínas denominadas Inhibidores Tisulares de las Metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs se unen a las metaloproteasas y forman complejos que impiden a éstas degradar las fibras de la matriz. El balance del metabolismo del colágeno reflejará el equilibrio entre la intensidad de síntesis por expresión de los genes correspondientes y la acción catabólica de las metaloproteasas moduladas por sus inhibidores tisulares (TIMPs).

Los TIMPs inhiben las MMPs con gran afinidad mediante la formación de complejos de estequiometría 1:1. De forma genérica se diferencian tres tipos de Inhibidores de las metaloproteasas: TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 pero sólo el TIMP-1 y el TIMP-2 parecen tener estructuras primarias y propiedades inhibitoras relacionadas. Influyen sobre la activación de la pro-metaloproteinasa y modulan la proteólisis de la matriz extracelular, especialmente durante la remodelación tisular y los procesos inflamatorios. En ciertos tipos de células, pueden presentar una actividad similar a la del factor de crecimiento y pueden inhibir el fenotipo tumorogénico y metastásico en células cancerosas.

El Inhibidor de la metaloproteasa 1, también conocido como TIMP1, es una glicoproteína que es expresada en muchos de los tejidos del organismo. El TIMP 2 es el inhibidor de la metaloproteasa 2 se trata de un gen que actúa como un supresor del grupo de péptidas envueltas en la degradación de la matriz extracelular. Además del rol inhibitorio hacia las metaloproteasas, las proteínas codificadas tienen un único rol entre la familia de los TIMP en su habilidad para suprimir de forma directa la proliferación de células endoteliales. Como resultado de este hecho, la proteína codificada puede ser crítica para el mantenimiento de la homeostasis tisular suprimiendo la proliferación de tejido quiescente o estable, en respuesta a factores antigénicos, e inhibiendo la actividad de la proteasa en tejidos que sufren una remodelación de la matriz extracelular.



Figura 44. Estructura de los Inhibidores de las metaloproteasas analizados en este estudio

Según los estudios de Castelló Cros en 2004 los TIMPs son inhibidores específicos, así por ejemplo, el TIMP-1 se fija preferentemente a las colagenasas y las metaloproteasas 3 y 9 mientras que el TIMP-2 tiene una alta afinidad por metaloproteasa 2. Es sabido que los TIMPs 1 y 2 son secretados en forma soluble y difunden en el medio extracelular, mientras que el TIMP-3 está ligado a los constituyentes de la membrana extracelular por lo que su mecanismo de acción es distinto; según estudios clásicos de Leco en 1997 y anteriores de Pavloff en 1992 actúa impidiendo la fijación de las metaloproteasas a su sustrato.

Los últimos estudios indican que en el envejecimiento cronológico, los principales hallazgos indican un aumento de los niveles de metaloproteasas (MMPs) con la edad, derivados de una mayor expresión de los genes correspondientes una disminución de los Inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs).

1.3.- Interacción de la radiación electromagnética con el sistema visual

Una vez analizados en los epígrafes anteriores el emisor y el receptor de la luz, con sus elementos más interesantes para este trabajo, se procede a la introducción de la relación entre la radiación electromagnética y el sistema visual. En concreto estos apartados se van a referir al análisis elemental de la visión que puede subdividirse en tres etapas: la óptica, que permite la formación de una imagen; la foto recepción, que hace posible el registro de imagen; y el proceso neural la percepción visual.

1.3.1.- El ojo como instrumento óptico y receptor de energía radiante

Como es sabido, el sistema óptico del ojo está formado por cuatro superficies: dos dioptrios corresponden a la cornea y dos al cristalino. Para el mejor estudio de su comportamiento se ha intentado hacer modelos ópticos, pero esto no es sencillo debido a la asfericidad de la córnea, a la variación del índice de refracción del cristalino, a los cambios en las dimensiones oculares a lo largo de la vida o a la falta de simetría a lo largo del eje antero posterior.

Por otro lado se debe considerar que la pupila actúa como un diafragma de abertura del sistema óptico del ojo. La pupila de entrada del sistema óptico del ojo es aproximadamente un 13 por 100 mayor que la pupila del iris. El diámetro de la pupila puede variar entre 2 mm y 8 mm en función del nivel de iluminación. En la zona interior

del ojo hay dos zonas de especial interés que corresponden a las regiones retinianas de la fovea y de la papila o disco óptico. En la porción central de la fovea (foveola) se forma la imagen del punto de fijación. Sus dimensiones son 0,3 mm en el meridiano horizontal 0,2 mm en el vertical. El ángulo que subtiende respecto al punto nodal imagen es de 1 grado por 0,7 grados que corresponde a un área de 6,03 mm por 4,2 mm a una distancia de lectura de 35 cm.

La retina humana es una *retina invertida* en la que los fotorreceptores se encuentran en la capa más externa y las neuronas que intervienen en el procesamiento y la transmisión de la información al cerebro en las capas internas.

La papila mide unos 2 mm en el meridiano vertical y 1,5 mm en el horizontal. El ángulo que subtiende es de 7 grados por 5 grados respecto al punto nodal. La retina puede ser considerada como una porción móvil del cerebro, ya que es una estructura del sistema nervioso central que se mueve junto con el ojo. Ontogenéticamente constituye una extensión del cerebro anterior que avanza junto con el nervio óptico y formar las partes siguientes:

- a) La *neurorretina* (capa fotorreceptora) y el *epitelio pigmentario* hasta la ora serrata, límite de la retina funcional. Tiene una superficie aproximada de 5 cm² y unos 0,56 mm de grosor en la zona más espesa. En el ecuador es muy fina (0,18 mm) y en la ora serrata alcanza 0,88 mm.
- b) La *retina ciliar*, que cubre externamente el cuerpo ciliar.
- c) La *retina iridiana*, sobre la capa posterior del iris.

1.3.2. Mecanismos implicados en la función visual en la retina.

Para un mejor entendimiento de los apartados posteriores se exponen brevemente algunos aspectos de interés de los mecanismos implicados en la fotoquímica de la función visual de la retina. En el capítulo anterior se comentó la estructura de la retina y sus receptores. Como ya se ha dicho los fotorreceptores de la retina en los primates son de dos tipos: conos, que responden a niveles elevados de luminosidad y que son responsables de la visión diurna y en color (visión fotópica), y bastones, con respuestas a muy baja intensidad luminosa y que permiten la visión nocturna (visión escotópica), sin detalles ni color. En ellos tiene lugar la fototransducción, es decir, la transformación del estímulo luminoso en un impulso nervioso que será percibido en última instancia en las zonas específicas de la corteza

cerebral. Supone como primer evento la captación del fotón por la molécula de cromóforo (retinal) que se localiza en el interior del fotopigmento.

Los párrafos anteriores sirven para introducir el mecanismo de la fotoquímica de la visión: Cuando un fotón es absorbido por la rodopsina, ésta comienza a descomponerse en picosegundos y su conformación tridimensional cambia en sucesivas etapas que, concluye una separación del retinal y la opsina. La causa es la fotoactivación de los electrones en los enlaces insaturados del retinal, que produce un cambio casi instantáneo de la forma *cis* del retinal a la forma *trans*.

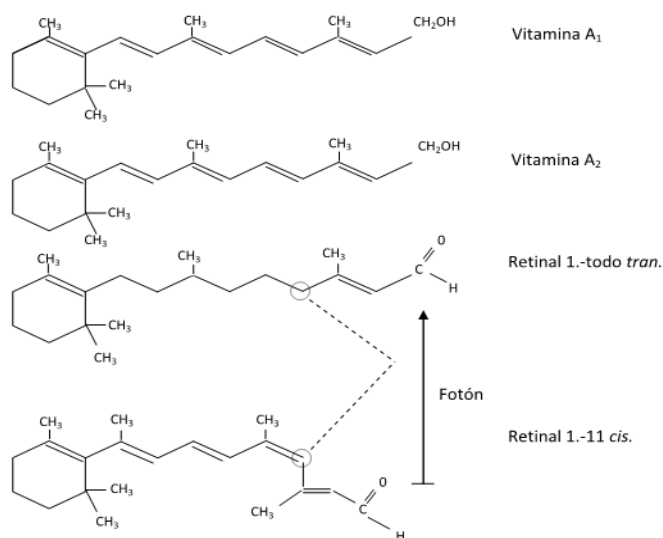


Figura 46. Fórmulas químicas de la Vitamina A y de los retinales.
Extraído de Óptica fisiológica.
Psicofísica de la Visión, de Artigas, Capilla, Felipe y Pujol. Ed.
Interamericana McGraw Hill. (1995)

A continuación se expone el conocido mecanismo de la cascada de activación por la luz de la rodopsina; cuando incide la luz, la rodopsina oscila en la membrana del disco y se pone en contacto con una proteína G llamada *transducina*, la cual es activada a su vez. La molécula transducina fija el *guanosín-trifosfato* (GTP) o trifosfato de guanosina, el cual activa a su vez una *fosfodiesterasa* que cataliza la conversión de una molécula cerrada, el *GMPC* (guanosín monofosfato en formato cíclico), en 5'GMP. El GMPC se halla en la oscuridad en una concentración elevada en el citoplasma de los fotorreceptores y mantienen abiertos los canales de sodio.

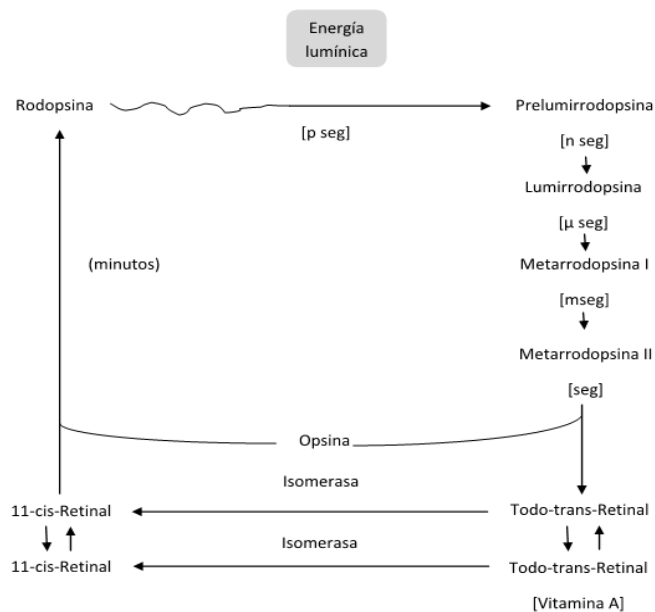


Figura 47. El ciclo visual o bloqueo de la Rodopsina en los bastones.

Es de suma importancia el ciclo visual rodopsina-retina y excitación de los bastones, por este motivo se incide en estos párrafos.

El segmento externo del bastón que se extiende hasta la capa pigmentaria de la retina, tiene 40% de concentración de la rodopsina. Esta sustancia se compone de una combinación de la proteína escotopsina y del pigmento carotenoide retinal.

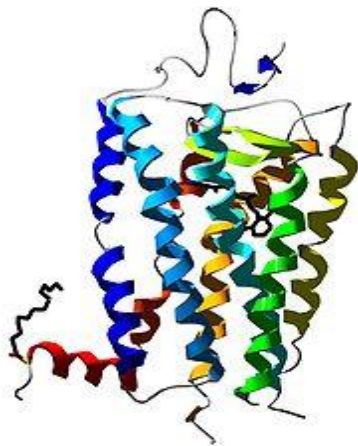


Figura 48. Estructura de la Rodopsina

Además, esta forma de retinal es de un tipo determinado, denominado 11-cis retinal. Esta forma cis del retinal es importante porque se trata de la única que puede unirse a la escotopsina para sintetizar la rodopsina. Cuando la rodopsina absorbe la energía lumínica, este pigmento se descompone en billonésimas de segundo. La causa reside en la fotoactivación de los electrones de la fracción retinal de la rodopsina, que determina un cambio instantáneo de la forma cis a la forma todo-trans que conserva la misma estructura química que la forma cis, pero con una estructura física distinta: se trata de una molécula recta en lugar de una molécula doblada, a la altura del carbono 11. Como la orientación tridimensional de los sitios de reacción de todo-trans retinal ya no se ajusta a los sitios de reacción de la proteína escotopsina, aquél comienza a separarse de la escotopsina. El producto inmediato es la batorrodopsina, una combinación

La disminución de la concentración de GMPc cierra los canales de sodio y como resultado se produce la hiperpolarización. Esta cascada de reacciones amplifica la señal luminosa y ayuda a explicar la gran sensibilidad de los bastones, que son capaces de dar una mínima respuesta cuando una molécula de rodopsina capta un único fotón luminoso (Hecht, 1938).

parcialmente disociada del todo-trans retinal y la escotopsina. La batorrodopsina es sumamente inestable y se descompone en nanosegundos en lumirrodopsina. Ésta, a su vez, se descompone en microsegundos en metarrodopsina I; a continuación, en un milisegundo aproximadamente forma metarrodopsina II y, por último, mucho más lentamente (en segundos), se descomponen los productos completamente disociados. Es de interés reseñar que la regeneración de la rodopsina consiste en la reconversión del todo-trans retinal en 11-cis retinal. Este proceso requiere energía metabólica y está catalizada por la enzima retinal isomerasa. Una vez formado el 11-cis retinal, se recombina automáticamente con la escotopsina para volver a formar rodopsina, la cual permanece estable hasta que la absorción de energía lumínica vuelve a desencadenar su descomposición. La regeneración total de la rodopsina dura 35 minutos.

Como es sabido, el mecanismo de la fototransducción consiste en una serie de procesos que se inician cuando la retina está en condiciones de oscuridad. En este momento se encuentran abiertos una serie de canales iónicos a nivel de los segmentos externos de los fotorreceptores que permiten la entrada fundamentalmente de iones sodio. Esta entrada de sodio, despolariza parcialmente a los fotorreceptores, permitiendo la liberación de neurotransmisor a nivel de sus terminales sinápticos. El transmisor liberado es Glutamato. Cuando la luz estimula a la molécula de rodopsina, se producen una serie de cambios que se presentan esquemáticamente en la imagen siguiente, que van a producir el cierre de los canales iónicos permeables al sodio.

Con relación a la fotoquímica de la visión por los conos, la composición química de los fotopigmentos de los conos coincide casi por completo con la de la rodopsina de los bastones. La única diferencia reside en que las porciones proteicas, las opsinas, llamadas fopsinas en los conos, son ligeramente distintas de la escotopsina de los bastones. La porción retinal de todos los pigmentos visuales es exactamente la misma en los conos que en los bastones. Los pigmentos sensibles al color de los conos son, por tanto, combinaciones de retinal y fopsinas. Cada uno de los diferentes conos sólo posee uno de los tres tipos de pigmentos de color lo que determina la sensibilidad selectiva de los conos a colores distintos: azul, verde y rojo.

Después de comentar el inicio del proceso visual mediante la fotoquímica retiniana y de repasar de forma elemental la bioquímica de la visión, se comenta en esta tesis doctoral la función nerviosa de la retina.

Para explicar el procesamiento neuronal de la visión, es necesario introducir el concepto de campo receptor de célula bipolar y célula ganglionar. Los estudios de

Kuffler, Barlow, Hubel y Wiesel en el decenio de los años sesenta pusieron de manifiesto una característica común de las células bipolares y ganglionares en la retina, las células del cuerpo geniculado lateral y las células de la capa IV del área 17 de la corteza visual. Todas estas células responden de una forma casi óptima a un estímulo circular, pequeño y que incida dentro de su campo sensorial receptor. Campo receptor de una célula ganglionar de la retina es la zona del entono que al proyectarse sobre una zona concreta de la retina y estimularla influye sobre la frecuencia de descargas de dicha célula, aumentándola (ON) o disminuyéndola (OFF). Además, dentro de su campo sensorial receptor, a un anillo de luz situado alrededor del centro (iluminación del borde o periferia) inhibe la respuesta al punto central. El centro puede ser excitador y la periferia inhibidora (célula de centro ON o célula de encendido en el centro) o bien el centro puede ser inhibidor y la periferia excitadora (célula de centro OFF o célula de apagado en el centro).

En los propios fotorreceptores, la conducción desde sus segmentos externos, donde se generan las señales visuales, hasta los cuerpos sinápticos se lleva a cabo mediante conducción electrotónica. Así, cuando se hiperpolariza el segmento externo por acción de la luz, se conduce un grado aproximadamente igual de hiperpolarización por flujo directo de corriente eléctrica hasta el cuerpo sináptico, sin que tenga lugar la producción de un potencial de acción. Cuando posteriormente el neurotransmisor de un fotorreceptor excita a una célula horizontal o a una bipolar, de la misma manera la señal se transmite desde la entrada hasta la salida mediante electrotono. El electrotono es, asimismo, la forma en que se transmiten las señales visuales en la mayoría de los tipos de células amacrinas. El significado fisiológico de la conducción electrotónica es que esta modalidad de conducción permite la conducción gradual de la fuerza de la señal. De este modo, en el caso de los fotorreceptores, la señal hiperpolarizante de salida está directamente relacionada con la intensidad de la iluminación. La señal no es de “todo o nada” como ocurría en el caso de que la conducción se hiciera a través de potenciales de acción, con lo que no se percibirán intensidades graduales de iluminación.

Para entender debidamente las conexiones neuronales y la interacción funcional de ellas se explica el concepto de Campo Receptor de una neurona de la vía visual como la zona de la retina sobre la cual tiene que incidir la luz para que esa neurona sea estimulada y dé una respuesta. Si una neurona recibe información de fotorreceptores localizados en la fóvea, su campo receptor se localiza en el punto de fijación ocular. Si

la recibe de la periferia retina, su campo receptor se localizará fuera y a un lado de dicho punto.

En la periferia de la retina muchos fotorreceptores individuales convergen en una única célula ganglionar, suministrando información de una zona relativamente amplia del campo visual. La visión foveal, en cambio, es más directa, ya que existen allí casi el mismo número de ganglionares y de conos, lo que explica porqué la visión foveal es más aguda que la periférica. Como campo receptor puede definirse por lo tanto, en sentido amplio, como la zona de influencia de una neurona.

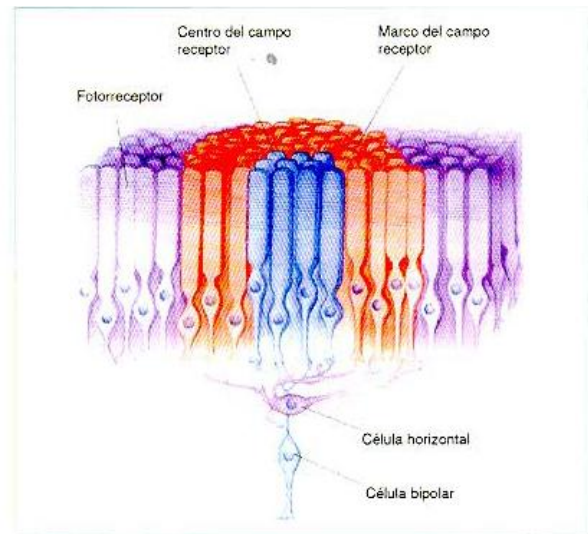


Figura 49 : Estructura del Campo Receptor de una Célula Bipolar (Bear, 1998)

La base anatómica de estos campos receptores fue propuesta por Dowling y Boycott en 1966 según: la secuencia directa de fotorreceptores a células bipolares y a una célula ganglionar, se traduce en el sustrato anatómico del centro de un campo receptor, y la secuencia indirecta de fotorreceptores a bipolares a través de las horizontales y de las bipolares a la misma ganglionar a través de las amacrinas, es el encadenamiento básico de la zona periférica.

Por otro lado, en el siguiente nivel, se estudia el Campo Receptor en células bipolares. El Campo Receptor de una célula bipolar, es la zona de la retina cuya estimulación provoca respuesta en esta célula. El tamaño del Campo Receptor de centro-ON o de centro-OFF, se corresponden muy exactamente con la dispersión de las ramificaciones dendríticas de la bipolar, por lo que la respuesta central debe estar producida por los fotorreceptores en contacto sináptico directo. Dado que la periferia del campo receptor es mucho más extensa que las ramificaciones dendríticas de la bipolar, la respuesta debe originarse a partir de la contribución de fotorreceptores que influyan en la bipolar de manera indirecta, mediante la interacción lateral de células horizontales.

Existen dos tipos funcionales de células bipolares: bipolar de centro-ON: Se despolariza con estímulos luminosos puntuales que incidan en el centro del campo receptor, hiperpolarizándose con estímulos luminosos anulares en su periferia; bipolar de centro-OFF. Se hiperpolariza con estímulos luminosos puntuales que incidan en el centro del campo receptor, despolarizándose con estímulos anulares en su periferia.

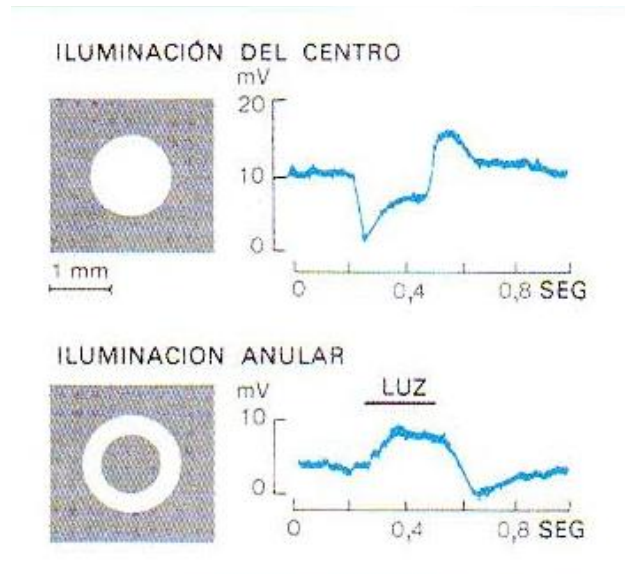


Figura 50. Respuestas al iluminar el centro (arriba) y la periferia (abajo) en una célula bipolar de centro Off. Tomado de Kuffler, 1982.

Las células bipolares emiten las señales verticalmente desde los bastones, conos y células horizontales hasta la capa plexiforme interna, es decir, transmiten las señales desde los conos a las células ganglionares a través de vías directas e indirectas. La información visual pasa de los conos a las células ganglionares mediante dos vías existentes en la retina. Los conos del centro del campo receptivo de la célula ganglionar establecen conexiones sinápticas directas con las células bipolares y éstas con las ganglionares; estas conexiones se conocen como vías directas o verticales.

Todas las células retinianas transmiten sus señales visuales por conducción electrotónica, es decir, por un flujo de corriente eléctrica en el citoplasma desde el punto de excitación hasta el terminal presináptico (transmisión de la señal de forma pasiva). Esto permite una conducción gradual de la intensidad de la señal. Así la intensidad de la señal de hiperpolarización de los conos y los bastones está relacionada con la intensidad de iluminación (la señal no es todo o nada). Como los axones de las células ganglionares (constituyen el nervio óptico) tienen que recorrer distancias considerables hasta el encéfalo, transfieren la señal por potenciales de acción. Cuando los conos del centro del campo receptivo se activan, las células bipolares de centro conectado se despolarizan, mientras que las células bipolares de centro desconectado se hiperpolarizan. La activación de los conos periféricos provoca la respuesta contraria. Hay dos tipos de células bipolares: despolarizante e hiperpolarizante. Cuando los bastones y los conos se excitan unas células bipolares se

despolarizan y otras se hiperpolarizan. Esto permite a la mitad de las células bipolares transmitir señales positivas y a la otra mitad negativas.

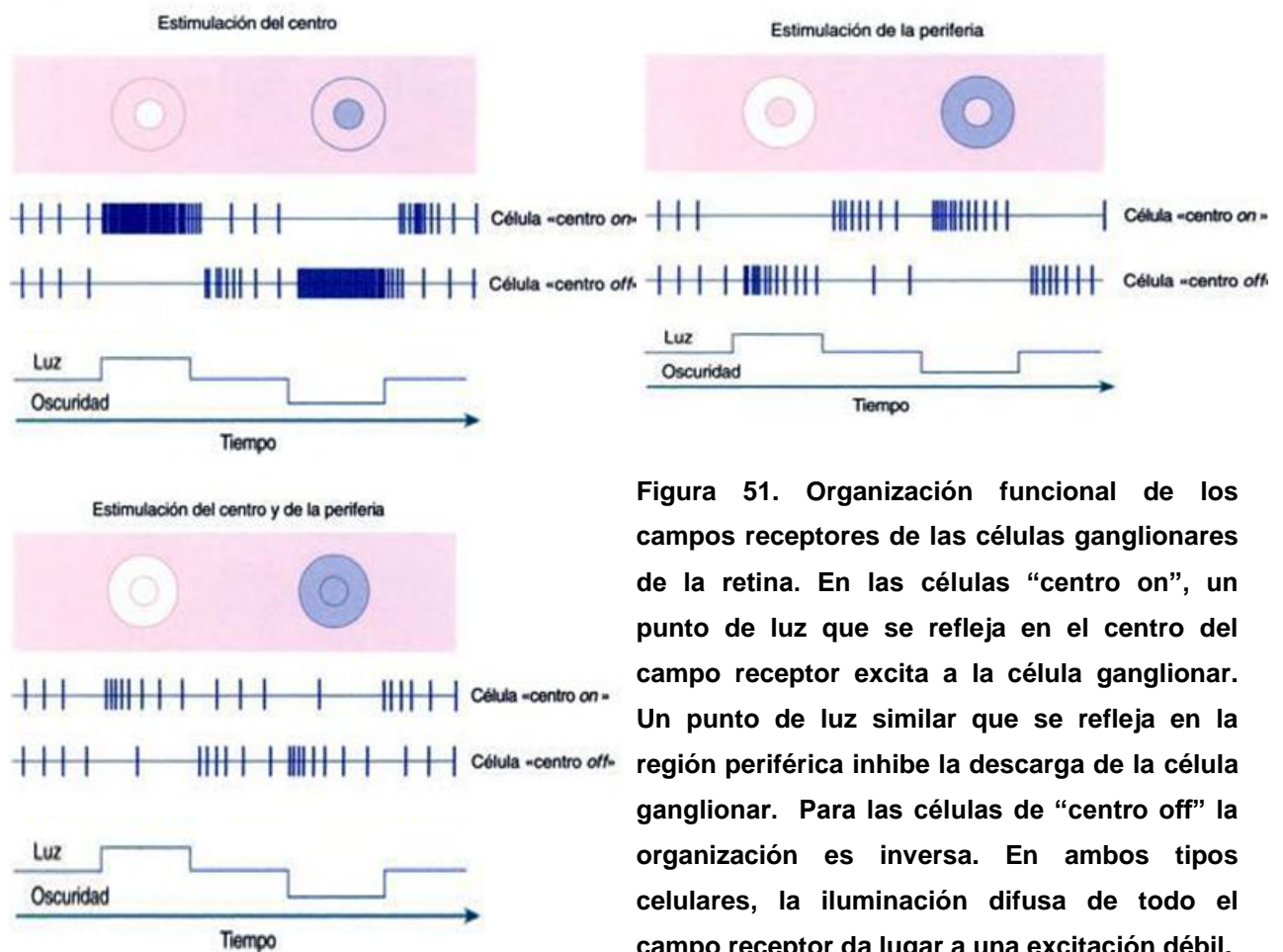
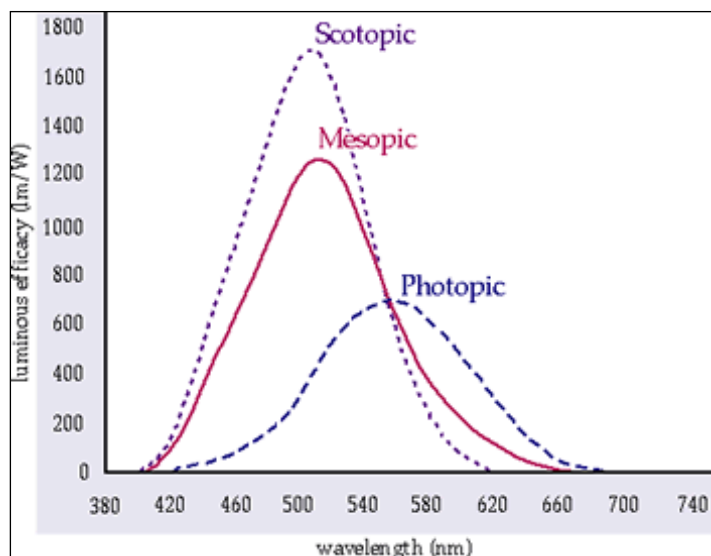


Figura 51. Organización funcional de los campos receptores de las células ganglionares de la retina. En las células “centro on”, un punto de luz que se refleja en el centro del campo receptor excita a la célula ganglionar. Un punto de luz similar que se refleja en la región periférica inhibe la descarga de la célula ganglionar. Para las células de “centro off” la organización es inversa. En ambos tipos celulares, la iluminación difusa de todo el campo receptor da lugar a una excitación débil.

El ritmo de activación de una célula ganglionar proporciona una medida de la diferencia en la intensidad de la luz que ilumina el centro y la periferia. Así, la información sobre pequeñas diferencias de intensidades se transmite directamente a los centros superiores. El ritmo de activación de las células ganglionares de centros conectados es bajo con una iluminación débil; por tanto, un aumento rápido de la activación indica un aumento rápido de la intensidad de la luz en el centro del campo receptor. El ritmo de activación de las células ganglionares desconectadas en el centro es bajo con la luz; un aumento rápido de la activación de estas células indica una rápida disminución de la intensidad de la luz en el centro de su campo receptivo.

1.3.3.- Eficiencia luminosa fotópica, mesópica y escotópica.

Como se ha dicho con anterioridad, la capacidad del sistema visual para discernir diferencias de intensidad se denomina adaptación y depende de la iluminancia del entorno. La calidad del sistema visual depende de la contribución de factores ópticos y neuronales, y sus medidas subjetivas dependen de factores psicofísicos.



Las curvas que reflejan la sensibilidad espectral del ser humano adaptado a la oscuridad es casi perfectamente pareja al espectro de absorción de la rodopsina, con un pico de sensibilidad que se produce a los 500nm.

Figura 52. Niveles de iluminación Fotópica, Mesópica y Escotópica.

La curva de luminosidad fotópica para los tricrómatas normales es razonablemente pareja al espectro de absorción que representa a los tres pigmentos de los conos.

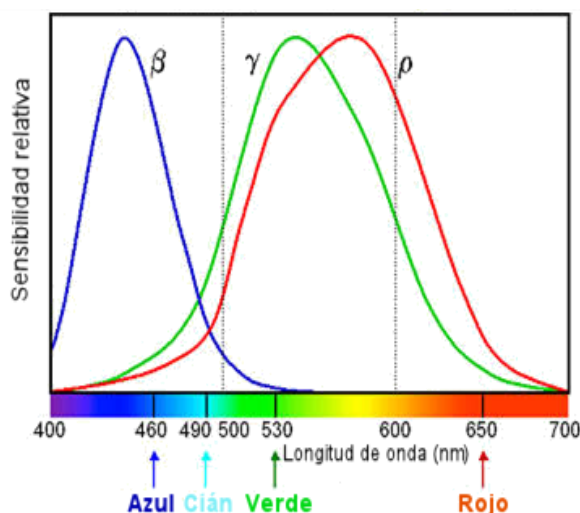


Figura 53. Curvas de sensibilidad relativa para Conos-S, Conos-M y Conos-L

Los niveles típicos de iluminación en condiciones naturales varían en un rango de unos 9^{-11} órdenes de magnitud, desde la iluminación estelar nocturna, inferior a $5 \cdot 10^{-3}$ lux, hasta la luz solar a mediodía. El sistema visual humano se adapta para optimizar la imagen formada, funcionando principalmente las células bastones de la retina en niveles bajos de luminosidad (respuesta escotópica) y los conos en condiciones de alta luminosidad, (respuesta fotópica).

La sensibilidad de luminancia del ojo es dependiente de la longitud de onda de la luz. Se ha definido de forma numérica la sensibilidad relativa $V(\lambda)$ del observador estándar, como se puede ver en la tabla de la derecha en condiciones fotópicas. Existe también una valoración de la sensibilidad relativa denominada $V'(\lambda)$. La sensibilidad espectral se caracteriza por la respuesta relativa, $V(\lambda)$, cuya dependencia espectral (con la longitud de onda) cambia según las condiciones de luminosidad:

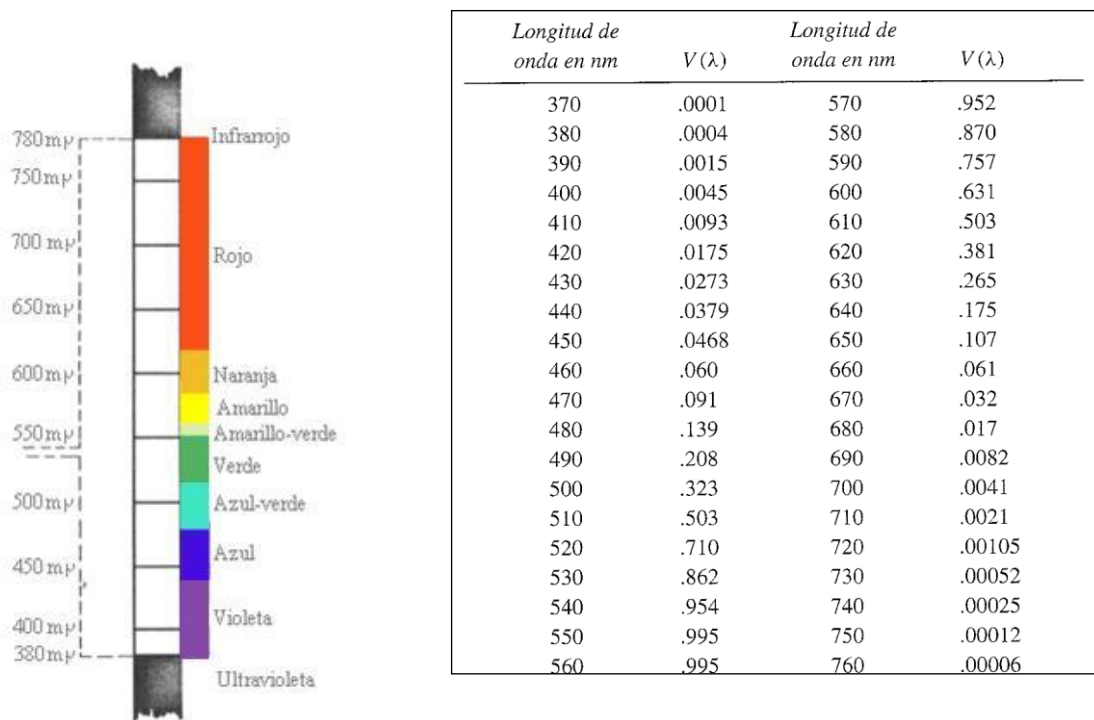


Figura 54. Valores de la sensibilidad relativa para el observador estándar, en condiciones fotópicas.

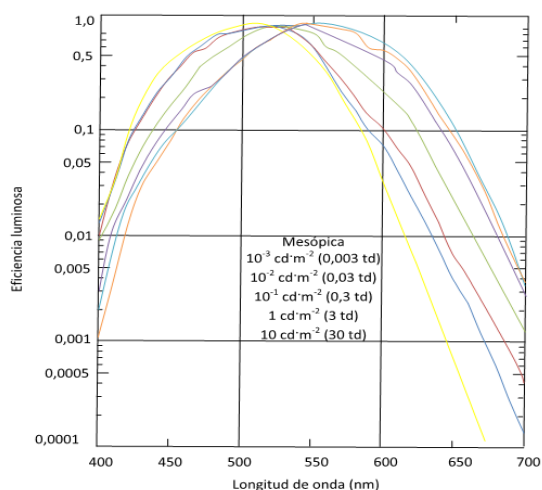


Figura 55. Modificado de Óptica Fisiológica: Psicofísica de la Visión. Artigas (1995).

Una condición de iluminación ambiente especial y muy poco estudiada hasta la actualidad es la condición mesópica, en la que la sensibilidad del sistema visual se sitúa en una situación intermedia entre las condiciones fotópicas y escotópicas, tal y como se aprecia en la figura.

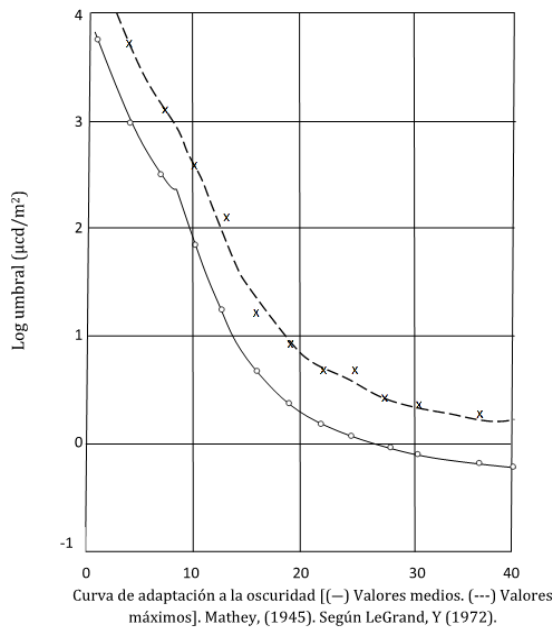


Figura 56. Curvas de adaptación a la oscuridad. Modificado de Óptica fisiológica. Psicofísica de la Visión.

Es de interés reseñar que la capacidad para distinguir entre longitudes de onda próximas no es constante a lo largo del espacio cromático y la capacidad de discriminación puede representarse mediante las llamadas elipses de MacAdam. Estas elipses representan áreas del diagrama cromático de forma que todos los puntos dentro de una elipse corresponden a colores que no pueden discriminarse unos de otros. No todas las elipses tienen el mismo tamaño: la discriminación del color es mejor para longitudes de onda próximas a 490 nm donde las elipses son menores que en la región del 540 nm, donde las elipses son mayores. La capacidad de discriminación es muy variable en función de la raza, de la altitud y del entrenamiento, por tanto el tamaño de las elipses es muy variable. Actualmente, sólo hay dos funciones reconocidas internacionalmente que describen la eficiencia luminosa espectral del ojo, la función CIE 1924 (V_λ) para la visión fotópica (CIE 1926), y la función CIE 1951 (V'_λ) para la visión escotópica (CIE 1951).

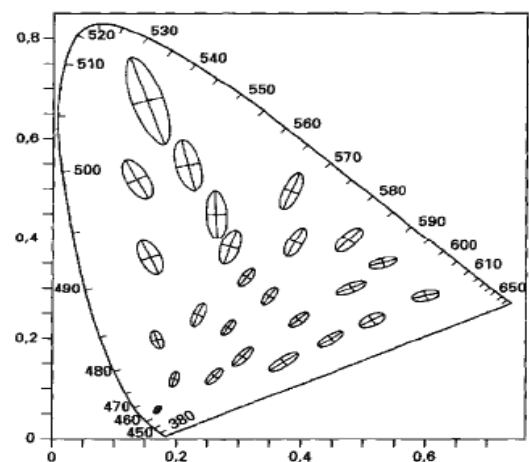
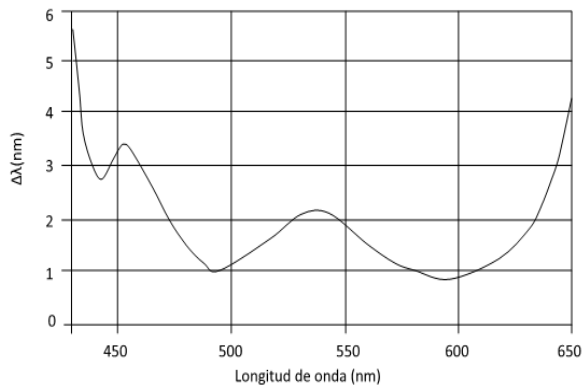


Figura 57. Elipses de MacAdam en el diagrama cromático XY



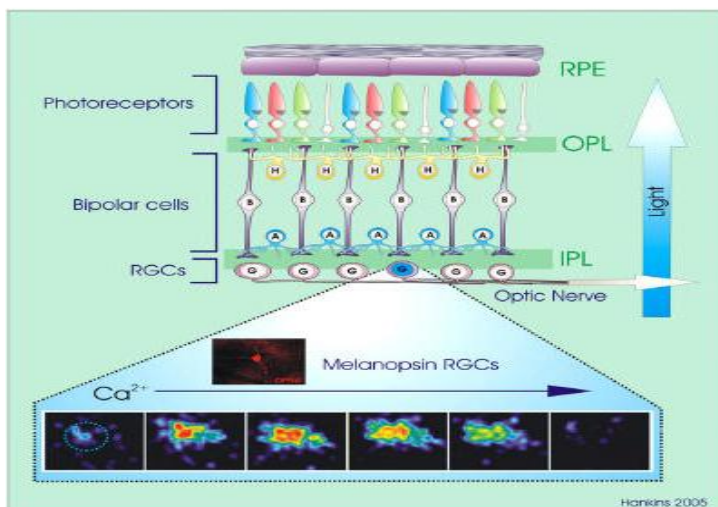
Este apartado no quedaría completo sin explicar la diferente sensibilidad respecto a la discriminación del color en función a la longitud de onda en el sistema visual humano, representada en la gráfica adjunta.

Figura 58. Umbrales diferenciales de longitudes de onda en colores espectrales. Modificado de Wright, (1934)

En definitiva, el sistema sensorial se ocupa en general de detectar, codificar y transmitir información de muy diferente índole, para que posteriormente pueda ser procesada e interpretada. Los mecanismos que llevan a cabo el proceso de la visión se ocupan concretamente de codificar y transmitir la información contenida en las imágenes ópticas formadas en la retina.

1.3.4. Mecanismos no visuales inducidos por la luz.

Son numerosos los estudios que indican la existencia de nuevos tipos de células fotosensibles en los vertebrados. Ya en 1928, los estudios del reflejo pupilar con ratones ciegos se observó una reacción de la pupila en ratones totalmente ciegos. Este hecho indujo a diferentes hipótesis entre las que se encontraba la estimulación lumínica directa de las células ganglionares (Keeler et al, 1928).



La idea de la presencia de nuevos tipos de células fotosensibles fue ganando adeptos y en 1993, las investigaciones de Kashani apuntaban como hipótesis una “triple visión” en la retina (Kashani, 1993).

Figura 59. Esquema de la retina donde se muestra la existencia de ganglionares melanopsínicas

En otro sentido y en estudios posteriores se introdujeron nuevas pistas sobre los mecanismos de regulación de hormonas con ajuste circadiano, como es la independencia de los conos y bastones en la liberación cíclica de melatonina (Lucas et al, 1999a; 1999b). En 1998 se caracterizó una nueva opsina en melanóforos denominada melanopsina. Los primeros estudios importantes en mamíferos fueron realizados por Provencio a partir de 1998 y pusieron de manifiesto la presencia de este mismo tipo de fotopigmento en ojos de mamíferos (Provencio et al, 1998a; 1998b; 2000). La pregunta de si esta nueva molécula fotosensible, descubierta en vertebrados, presentaba la capacidad en otras especies tuvo su respuesta en las investigaciones simultáneas del Berson y Hattar, ambas en el año 2002. Como características propias la melanopsina es menos sensible a la luz que los fotopigmentos de los fotorreceptores clásicos y su respuesta es 100 veces más lenta (Fu et al, 2005), por tanto, las células portadoras de ella son especialistas en la detección de estímulos relativamente brillantes y mantenidos.

Estas células se denominaron, por sus características, como células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (*ipRGCs*, *intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells*). En base a la morfología de estas células se ha determinado que podrían ser incluidas dentro de las células ganglionares tipo III o W (Provencio et al, 1998a; Gooley et al, 2001) presentando un campo receptor extraordinariamente amplio, 200-300µm (Hattar et al, 2002) y sus axones de estas células proyectan a diversos centros visuales. Es interesante conocer, además, que su número poblacional es muy reducido, no alcanzando el 3% del total de las células ganglionares.

En estudios morfológicos se han descrito dos tipos de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en el ratón adulto (Provencio et al, 2002b), realizado principalmente en la especie *Mus musculus* dependientes de la posición de los procesos dendríticos: a) Células con procesos dendríticos localizados en regiones más internas de la capa plexiforme interna y b) Células con procesos dendríticos en regiones externas.

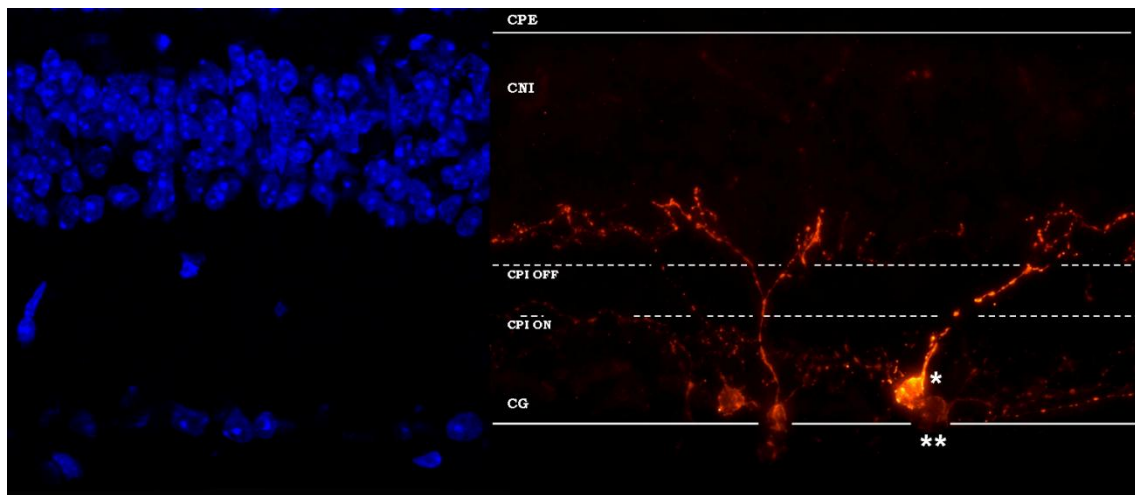


Figura 60a y 60b. Tipos de células ganglionares melanopsínicas en función de la arborización de sus dendritas. *=célula con proyección a zonas más exteriores de la CPI

****= célula con proyección en zona más interna de CPI.**

En la doble figura 60 a y b tomada de la reciente tesis (2009) del Dr. Javier Vicente-Tejedor, se puede apreciar en la retina de ratón, a la izquierda, los núcleos de la capa ganglionar (CG) y de la capa nuclear interna (CNI), y a la derecha, dos tipos de ipRGCs según la localización de sus procesos dendríticos.

Con respecto al procesamiento de las señales resulta muy clarificadora la figura correspondiente en la que se indica, de manera esquemática, las diferentes vías: aferencia, eferencia y no-visual. La aferencia de las ipRGCs a diferentes estructuras subcorticales en el ratón se muestra en línea azul oscuro: NSC=núcleo supraquiasmático; NGLv=núcleo geniculado lateral ventral; LIG=lámina intergeniculada; NOP=núcleo de la oliva pretectal). Las eferencias vegetativas para el control del reflejo fotomotor a nivel del iris se presentan con línea azul claro: NOP; EW=núcleo de Edinger Westfall; GC=ganglio ciliar. La señal emitida por la vía no visual incluye caminos a nivel del hipotálamo (NPV=núcleo paraventricular), de la espina dorsal (IML=núcleo intermediolateral) y otros centros (GCS=ganglio colículo superior) para la liberación fotópicamente regulada de melatonina (P= glándula pineal).

Hasta el momento la clasificación de las células ipRGCs mantiene cierto carácter indeterminado. La clasificación estructural de las células portadoras de melanopsina aún queda más abierta por lo incompleto del conocimiento genético sobre el pigmento fotosensible.

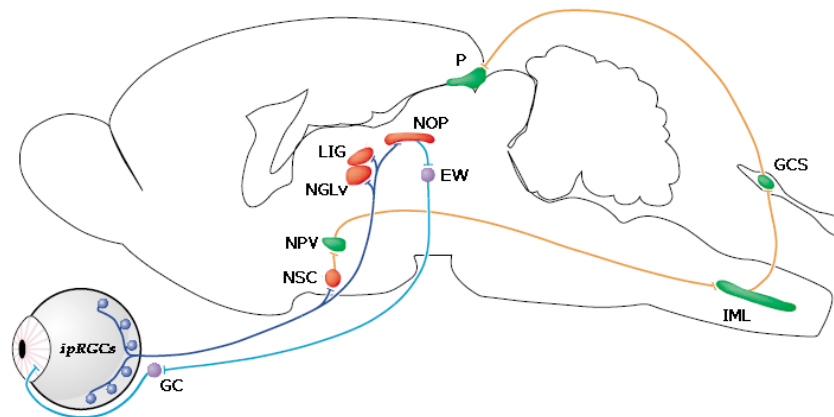


Figura 61. Proyecciones de las células ganglionares de la vía no visual. Modificado de Berson, 2003.

Recientes investigaciones aportan nuevos elementos de discusión para la clasificación de las células portadoras del pigmento fotosensible melanopsina. Pires y colaboradores han publicado recientemente sus trabajos referentes a la presencia de dos isoformas de la melanopsina (Pires et al, 2009). Estudios anteriores han dividido las ipRGCs en tres tipos, identificadas en retina de ratones jóvenes, en base a la latencia de disparo y fotosensibilidad (Sekaran et al, 2003; 2005; Tu et al, 2005; 2006; Hattar et al, 2006; Baver et al, 2008; Schmidt et al, 2008; 2009):

- *Tipo I (M1)*: 70% del total. Tienen una elevada fotosensibilidad. Largo periodo de latencia de actividad en respuesta a iluminación débil. Las más abundantes a edades cortas del animal.
- *Tipo II (M2)*: constituyen el 15%. Sensibilidad baja y larga latencia. En el adulto es preponderante este tipo.
- *Tipo III (M3)*: son el 15% restante. Sensibilidad alta y latencia corta.

Al margen de las posibles clasificaciones, desde un punto de vista funcional, es importante entender que las ipRGCs reciben un *input* doble. Por un lado, las ipRGCs reciben un estímulo directo de la luz ambiental (respuesta intrínseca), y por otro reciben un *input* sináptico desde los fotorreceptores clásicos, a través de las sinapsis que establecen con las interneuronas retinianas (células bipolares y amacrinas) (Belenky et al, 2003; Dacey et al, 2005; Pérez-León et al, 2006; Wong et al, 2007).

En resumen, en la actualidad se propone que las funciones no visuales de las ipRGCs son la **sincronización del ritmo circadiano con** los ciclos luz/oscuridad (Provencio et al, 2000; Gooley et al, 2001; 2003; Hannibal y Fahrenkrug, 2002; Hannibal et al, 2002a; Hattar et al, 2002; 2003; Panda et al, 2002; 2003; Ruby et al,

2002; Rollag et al, 2003; Semo et al, 2003; Warren et al, 2003), la **regulación del diámetro de la pupila** dependiente de la luz (Lucas et al, 2001; 2003; Gooley et al, 2003; Hattar et al, 2003; Panda et al, 2003), la **supresión de melatonina** debida a estimulación lumínica (Freedman et al, 1999; Lucas et al, 1999a; 1999b; Thapan et al, 2001), la **supresión de la actividad motora** (*masking*) (Mrosovsky y Hattar, 2003), y la **regulación de las fases de sueño/vigilia** (Panda et al, 2003; Lupi et al, 2006; 2008; Altimus et al, 2008).

1.3.5. Efectos nocivos de la luz en el Sistema Visual.

La rodopsina es regenerada en el Epitelio Pigmentario a través del ciclo visual del metabolismo retiniano. Los conos y los bastones, usan casi toda su energía no en la iniciación de los mensajes visuales sino en la incesante producción de sus propias moléculas, un proceso que parece ser principalmente independiente de la función. El concepto de la renovación implica la existencia de un estado estable en el cual la tasa de formación equipara la tasa de destrucción. La migración de los discos desde la base hasta el extremo del segmento externo del bastón lleva aproximadamente 10 días en retinas de primates.

En términos ontogenéticos, las células fotorreceptoras son post-mitóticas y pueden sobrevivir y funcionar durante toda la vida del animal, tal y como hacen todas las células del sistema nervioso (SNC). No obstante los fotorreceptores son más frágiles que otras neuronas del SNC, siendo más vulnerables a pequeñas mutaciones de sus proteínas y más sensibles al daño causado por el medio ambiente. El funcionamiento y el mantenimiento del segmento externo requiere enormes cantidades de energía en forma de nucleótidos fosforilados, particularmente adenosin trifosfato (ATP). Las células generan ATP principalmente de la glucosa, ambos por metabolismo oxidativo y glicólisis. Este metabolismo meramente oxidativo tiene lugar en la mitocondria en la porción elipsoide del segmento interno. Los fotorreceptores usan 3-4 veces más oxígeno que otras células de la retina y otras neuronas del SNC, siendo probablemente las células del cuerpo con más alta tasa de metabolismo oxidativo.

Como es sabido, el epitelio pigmentario juega un papel crítico en el control del volumen y en la composición del fluido en el espacio subretinal a través de transporte activo de iones, fluido y metabolitos, y este control es a su vez responsable de mantener la integridad de la interfaz Epitelio Pigmentario- Fotorreceptor .

Para la comprensión correcta de esta tesis es necesario un pequeño recordatorio de la naturaleza del daño por luz en la retina. Como es natural, la luz es necesaria para la visión pero puede dañar al globo ocular y a partes del sistema visual. La porción de energía absorbida en cualquier tejido depende de la transparencia del tejido para luz incidente. La manera en que la luz penetra en el tejido es un importante factor que determina el tipo de efectos fotobiológicos producidos: la energía de la luz, al ser absorbida, puede causar daños patológicos. La acción mecánica subyace básicamente del impacto rápido de energía en los melanosomas del epitelio pigmentario, que genera ondas de choque. Éstas causan un daño irreparable a los fotorreceptores y al epitelio pigmentario, denominado daño fotomecánico. El efecto nocivo en el tejido puede resultar de unas fuerzas mecánicas compresoras o tensoras, que conducen a la formación de burbujas de que son letales tanto para el epitelio pigmentario como para otras células. El efecto es causado por altas irradiaciones (en el rango megavatios / cm^2) y cortos periodos de exposición (en el rango nanosegundos a picosegundos) durante los cuales la energía es absorbida tan rápidamente por los gránulos de melanina en el epitelio pigmentario que la dispersión de calor no puede tener lugar.

Por otro lado, conviene definir el daño fototérmico. Un quantum de energía radiante (un fotón) puede ser absorbido por una molécula sólo si la energía del fotón equipara a la diferencia de energía entre el nivel de energía normal de una molécula y el máximo nivel de energía permitido. Los estados rotacionales y vibracionales de los quantum de las moléculas predominan sobre los estados de excitación por las longitudes de onda más largas en el espectro “visible” y en el infrarrojo cercano (600-1400nm). La vibración de energía ganada por la molécula es rápidamente disipada mediante colisiones con otras moléculas, aumentando momentáneamente el nivel local de la misma energía cinética, un proceso que es visto como un aumento de la temperatura. Las lesiones térmicas no son producidas por el incremento de energía cinética hasta que la irradiancia de la radiación es suficientemente alta como para aumentar la temperatura en, al menos 10°C , por encima del nivel ambiental de la retina. Consecuentemente, la reacción térmica depende de los umbrales de irradiancia.

El daño térmico es mucho mayor en el centro de la lesión dónde el aumento de la temperatura es mucho más elevado. Las lesiones causadas por una alta temperatura cubren una gran área de la retina, porque el calor se dispersa desde el lugar primario de absorción.

Por último, es importante reseñar que el riesgo del daño fotoquímico como una forma diferente de interacción entre la energía radiante y las moléculas biológicas tiene lugar cuando la radiación incidente tiene una longitud de onda en la porción de alta energía del espectro “visible”: daño fotoquímico. Un electrón en estado excitado puede volver al estado inhibido disipando la energía extra de una de las varias formas que tiene para hacerlo. La forma de eliminar energía es romper una unión en otra molécula mediante un intercambio directo de electrones o un intercambio directo de hidrógeno produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como un ‘singlet’ de oxígeno, radicales de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales de hidroxil. El proceso también puede producir otros radicales libres, importante en la producción de tejido dañado.

Una radiación particular de longitud de onda siempre aporta el mismo tipo de cambio. Un cierto número de fotones son necesarios para completar la reacción mediante la ruptura de un cierto número de uniones. Teóricamente existe una reacción recíproca entre la irradiancia y la duración de la exposición requerida para causar un cierto nivel de daño, y las reacciones fotoquímicas dependen del total de dosis recibidas. La regla de reciprocidad se rompe en exposiciones muy largas (mayores de 24h) porque los mecanismos de reparación se vuelven significativos en exposiciones tan largas. Ningún daño agudo tiene lugar por debajo de un cierto umbral de nivel de irradiancia. El daño por exposición crónica, que viene a ser, períodos de exposición de meses e incluso años a altos niveles ambientales es regulado por distintas leyes.

Con relación a los aspectos generales del daño fotoquímico retinal en animales, fue Noell, en 1965, el que descubrió accidentalmente que la retina de ratas albinas puede ser dañada de forma reversible mediante exposiciones de varias horas o días a luz ambiental dentro del rango de intensidad de la luz natural. El mismo daño que en albinos es producido en ratas pigmentadas cuando las pupilas son dilatadas. A continuación se da un repaso a la investigación en animales:

Según el trabajo “Daño fotoquímico en la retina” de Wu, del 2006, el daño fotoquímico retiniano ocurre con diferentes tipos de morfología Kuwabara y O’Steen emplearon microscopios de luz y microscopios de electrones para estudiar los cambios patológicos que ocurren en la retina de la rata tras una exposición en una habitación con fluorescentes durante varias semanas o meses. Las primeras alteraciones ocurren en los segmentos externos de las células de los fotorreceptores. Los segmentos externos aparecen tortuosos e hinchados y las estructuras del lamelares se rompen,

mostrando separaciones y formando túbulos y vesículas. La hinchazón de la mitocondria aparece en el segmento más interno. El número de cuerpos mieloides en el pigmento epitelial se incrementa. Finalmente todos los fotorreceptores dañados desaparecen, acabando con una completa adhesión de epitelio pigmentario y las células de Müller

Los bastones son más sensibles que los conos al daño por luz en la rata. Marshall et al estudiaron en palomas que el daño retinal ocurre exclusivamente en conos en exposiciones de 6 horas a un nivel de luz correspondiente a la iluminación de un cielo nublado. El daño en el segmento externo lamelar es similar al daño que tiene lugar en los bastones de la rata.

Lawill expuso conejos pigmentados a la luz por más de 4h y demostró que el daño es mayor en el área de la línea visual, dónde la densidad de los fotorreceptores es más alta. Está claro que la morfología del daño retiniano por luz varía entre especies y que depende de la severidad del daño. La variabilidad inherente de modelos de animales en vivo, un amplio espectro de condiciones experimentales y un amplio rango de métodos de evaluación, hacen difícil comparar las características morfológicas de varias lesiones retinianas inducidas por luz.

Se ha observado el típico daño de los fotorreceptores en monos expuestos a fluorescentes que imitan la luz solar durante varias horas al día que, mientras que el daño se restringe al epitelio pigmentario cuando los monos son expuestos a 1,000 segundos en varias líneas espectrales de longitud de onda corta. Los segmentos externos de los fotorreceptores muestran primero signos de daño cinco días más tarde cuando los macrófagos invaden y se rompen las células de epitelio pigmentario. No obstante, una característica general del daño fotoquímico es que es mucho mayor en las capas externas en la parte central de la retina.

Muchos estudios han intentado determinar qué longitudes de onda de luz producen el mayor nivel de daño. Noell et al usaron una serie de estímulos de banda corta y demostraron que bandas de 495nm inducen más pérdida de electroretinograma (ERG) que las de 435-nm o las de 578-nm, cuando la irradiancia de todas las bandas era igual. Los autores concluyen que el efecto dañino de la luz se correlaciona con su eficacia al blanquear la rodopsina.

El daño retinal por luz es mediado por la rodopsina en ratas expuestas a constantes flujos de fotones en 6 longitudes de onda. La hipótesis de que el daño retiniano por luz es mediado por fotopigmentos es apoyada por diversos experimentos

en los cuales los ojos de los monos fueron expuestos a longitudes de onda que blanqueaban predominantemente el pigmento en una clase particular de fotorreceptores. Los resultados mostraron que la luz puede dañar selectivamente una clase de receptor de cono. El daño a los conos azules es permanente mientras que el daño a los verdes es temporal.

En contraste, Ham et al mostraron que la sensibilidad retiniana depende de la longitud de onda en una manera que no es relativa al espectro de absorción de la rodopsina. La sensibilidad de la retina del mono se incrementa continuamente cuando decrecen las longitudes de onda. Los autores sugieren que sistemas moleculares adicionales se vuelven vulnerables a la excitación electrónica y el daño fotónico cuando la energía por fotón se incrementa. Lawill et al demostraron que esto mismo ocurre con conejos a los que se expone a luces de 4 longitudes de onda diferentes. Parece que hay dos espectros de acción diferentes, uno coincide con el espectro de absorción de la rodopsina y otro alcanzando el máximo en la región de longitud de onda corta (lo que proporciona la base para el concepto de riesgo de luz azul).

Consecuentemente, ha sido propuesto que hay dos clases de daño fotoquímico en la retina, que previamente se mencionaron: El daño de clase I tiene una acción espectral que es idéntica al espectro de absorción del pigmento visual y ocurre tras la exposición de varias horas a la semana a irradiancias relativamente bajas, por debajo de 1 Mw/cm^2 , de luz azul. El daño inicial está principalmente localizado en los fotorreceptores. La lesión de clase II tiene un espectro de acción que alcanza su pico máximo en longitudes de onda cortas y esta lesión ocurre bajo exposiciones a altas irradiancias de luz azul, por encima de 10 Mw/cm^2 . El daño inicial está generalmente confinado en el pigmento epitelial. Las dos acciones espectrales son encontradas en la retina de la rata, demostrando que las dos clases de daño por luz, daño al fotorreceptor y el daño mediado por epitelio pigmentario, están presentes en diferentes especies animales.

Según el estudio de Wu los factores que refuerzan la susceptibilidad del daño por luz identificados hasta ahora en estudios animales, son:

1. Longitud de onda

Dos tipos de daño retinal por luz son inducidos en ratas pigmentadas mediante radiación de pequeñas parcelas de retina tanto a 380nm como a 470nm. La exposición a la luz a 380nm daña específicamente a las células de los fotorreceptores, particularmente a los bastones. La exposición a la luz a 470nm daña tanto la capa del

receptor como al epitelio pigmentario. Grimm et al han demostrado que la luz azul causa severos daños retinianos bajo condiciones experimentales y que la luz verde no induce a cambios histológicos en la retina.

2. Intensidad de luz y duración de la exposición

El daño fotoquímico depende del total de dosis recibida. O'Steen et al, además, han demostrado que existen diferencias cualitativas entre el daño de baja intensidad y el causado por alta intensidad. Demostraron que la media de degeneración está directamente relacionada con la intensidad de la iluminación y que la magnitud de la degeneración retinal y la involucración del epitelio pigmentario es mayor con iluminantes de alta intensidad. También demostraron que el modelo de degeneración, especialmente en el lugar inicial de la destrucción celular es diferente con iluminación de alta intensidad. La evidencia se ha presentado recientemente demostrando que la traducción está implicada en el daño retiniano producido por luz con baja intensidad. En contraste, el daño retinal inducido por luz con alta intensidad en el que no depende del proceso de traducción.

3. Efectos acumulativos de la luz

Noell fue el primero en demostrar el efecto acumulativo de la luz en el daño retiniano. Demostró que a 5 minutos de exposición no se produce ningún efecto significativo, mientras que tras tres o cuatro exposiciones de 5 minutos cada una y cada uno seguido de una hora de intervalo de oscuridad, conducen a un daño significativo. Este hecho sorprendente no tiene lugar si la retina se recupera lo suficiente del daño subliminal durante un intervalo de oscuridad antes de la siguiente exposición. Organisciak et al han confirmado que la exposición a luz intermitente puede dar como resultado un mayor daño en el fotorreceptor que en exposición continua, y esto exacerba el daño de tipo I en ratas.

4. Ritmos circadianos

Duncan y O'Steen demostraron que la susceptibilidad a la muerte celular inducida por luz depende del periodo durante el ciclo de luz-oscuridad en el cual los animales reciben una exposición a la luz diurna. Las retinas de los animales expuestos durante la mitad del periodo de oscuridad o durante las primeras 5 horas del periodo de luz fueron significativamente más dañadas que las retinas de los animales expuestos durante las últimas 9 horas del periodo de luz. Cuando se incrementa la exposición de luz durante el periodo de fagocitosis del segmento externo de bastón también se

refuerza el daño en el fotorreceptor. También Organisciak et al mostraron idénticos resultados.

5. Estado adaptativo

Noell et al demostraron que el daño retiniano por la luz está correlacionado con cambios adaptativos en los fotorreceptores. Encontraron que las ratas que se criaron en la oscuridad tienen un nivel aumentado de rodopsina en la retina, y que son más susceptibles al daño retiniano por luz inducido que aquellos animales criados en luz cíclica. Las ratas se volvieron menos susceptibles al daño por luz cuando se cambiaron de un periodo de cría en un ambiente oscuro a un periodo de cría con luz cíclica débil, mientras que las ratas criadas en luz cíclica se vuelven mucho más sensibles al daño por luz si pasan tiempo en un ambiente oscuro. Esta observación fue confirmada por Organisciak et al que demostraron que el 50% de las células de los fotorreceptores en ratas criadas en la oscuridad se pierden tras 8 horas de exposición a la luz. Son requeridas aproximadamente 24 horas para producir el mismo grado de daño en ratas criadas en luz cíclica. Estudios adicionales han demostrado que las ratas criadas bajo bajas iluminancias tienen una alta densidad de rodopsina, una media mayor de longitud de segmento externo y mayores niveles de ácido docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3) que animales criados en niveles de luz más altos.

6. Drogas fotosintetizantes

Ciertas sustancias son fototóxicas para el ojo. Agentes exógenos que traspasan la barrera de sangre de la retina pueden producir un daño fotoquímico a la retina, si absorben la radiación en UV o rango “visible”. Las estructuras heterocíclicas, tricíclicas y porfirin- relacionadas son buenas candidatas para los fotorreceptores. Los estudios de laboratorio han demostrado que las células del epitelio pigmentario son fotosensibles y que la muerte celular aumenta después de la radiación con luz azul o UVR lo que explica la retinopatía pigmentaria en pacientes tras el tratamiento.

7. Edad

La susceptibilidad al daño por luz aumenta con la edad en un proceso que es diferente de los cambios degenerativos relacionados con la edad. O'Steen et al expusieron animales de diferente edad a la misma duración de luz y compararon la histología de la retina. Aquellos animales de 9-10 semanas mostraron discontinuidades en la capa externa de la retina y se volvieron progresivamente más severos en animales con 11-14 semanas. Aproximadamente en 95% de los fotorreceptores fueron dañados en retinas adultas (16-18 semanas).

8. Genética

a. Pigmentación ocular

Noell et al estudiaron el daño retinal en ratas albinas y pigmentadas bajo idénticas condiciones de luminancia y demostraron que el tiempo de exposición puede ser doblado en las ratas pigmentadas para lograr la misma pérdida de ERG, incluso cuando las pupilas son dilatadas. No obstante la luz monocromática enfocada hacia la retina da el mismo grado de daño en ratas pigmentadas que en albinas.

b. Modelos animales de la degeneración retinal humana

Las ratas *Royal College of Surgeons* (ratas RCS) están genéticamente predispuestas a un daño en la retina por luz inducido, y estas ratas tienen un modelo de retinitis recesiva pigmentosa autosómica (RP) muy característico debido a un defecto en el RPE que resulta de una acumulación de segmentos externos 'debris' y consecuentemente una pérdida de células fotorreceptoras. Los modelos de animales transgénicos P23H y S334ter tienen más bajo umbral de fototoxicidad que las castas normales, y esto sostiene la hipótesis que aquellos pacientes con RP son menos susceptibles de sufrir pérdida de visión cuando trabajan en ambiente de luz de alta intensidad.

Después de la exposición pormenorizada sobre el daño retiniano en animales de experimentación, realizada en los párrafos precedentes, tomado del trabajo de Wu a continuación se realiza una actualización de la bibliografía científica referente al tema. Aunque existe abundante bibliografía científica sobre los efectos de la luz en la retina (ver Wenzel y Cols., 2005; Wu y Cols., 2006) se está lejos de conocer los mecanismos exactos por los que actúa y, sobre todo, de poder prevenir las lesiones que produce.

Existen evidencias de que la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y otras patologías retinianas están relacionadas con la intensidad de la luz, la longitud de onda y el tiempo de exposición (Meyers, 2004). Se considera que la exposición a luz intensa de forma aguda causa un daño térmico, mientras que exposición a luz no tan intensa pero de forma crónica produce daño fotoquímico. A pesar de los abundantes estudios sobre los efectos de la luz en la patogenia de la DMAE aún no hay evidencias claras de su participación directa (Margrain y Cols., 2004).

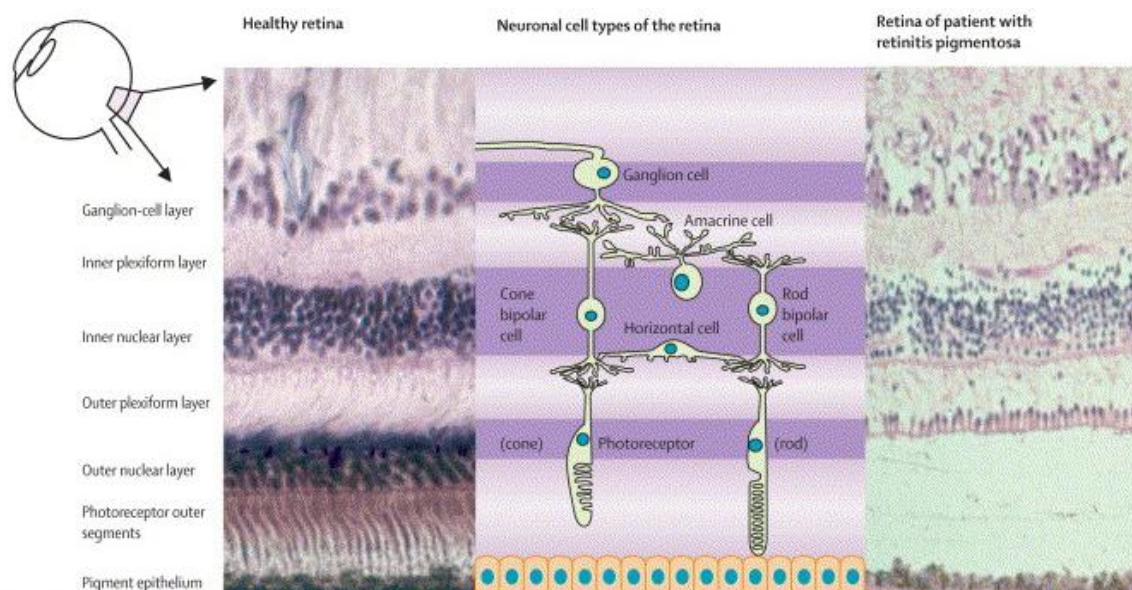


Figura 62. Estructuras retinianas sana y con patología.

Se denomina reacción fotoquímica a la que ocurre cuando una molécula absorbe un fotón. Como consecuencia de ello se producen moléculas de oxígeno reactivo que son oxidantes y muy tóxicas para las células en las que se ha producido la reacción: fotorreceptores y epitelio pigmentario (Margrain y Cols., 2004). Consecuentemente estas dos capas de la retina son las que se afectan en la fototoxicidad inducida por la luz, pero existen evidencias de que de forma secundaria se afectan los estratos nerviosos de la retina.

Este trabajo de tesis doctoral pretende colaborar en el esclarecimiento de algunos de los mecanismos implicados en la fototoxicidad retiniana.

1.4.- Mecanismos naturales de protección ocular frente a la luz visible: Extrínsecos e Intrínsecos

1.4.1.- Absorción atmosférica de Radiación electromagnética

La capa de ozono situada en la estratosfera fue descubierta en 1913 y descrita con mayor exactitud en los años treinta. El ozono de la estratosfera terrestre es creado por la luz ultravioleta que choca con las moléculas de oxígeno gaseoso, que contiene dos átomos de oxígeno (O_2), separándolas en átomos de oxígeno (oxígeno atómico); el oxígeno atómico se combina con aquel O_2 que aún permanece completo, formando así el ozono, O_3 . Las moléculas de ozono son inestables (aunque en la estratosfera poseen una larga vida) y cuando la luz ultravioleta choca con el ozono, este se separa nuevamente en sus reactantes (O_2 y O), formando así un proceso continuo llamado

"*ciclo del ozono y oxígeno*", el cual provoca la formación de la capa de ozono en la estratósfera. El ozono troposférico es creado en pequeñas cantidades a través de diferentes mecanismos.

En 1974 los químicos Sherwood Rowland y Mario Molina (premios Nobel, 1996), alertaron sobre el deterioro de la capa de ozono causado por el hombre. El ozono actúa como filtro de las radiaciones nocivas que llegan a la Tierra, como parte del espectro ultravioleta y de la bandas azul y violeta del espectro "visible", permitiendo el paso de las otras como ultravioleta de onda larga que llega a la superficie terrestre. En los últimos años se considera amenazada a capa de ozono. La reducción de la capa de ozono (estratosfera 12-20 Km) influye en nuestro escudo protector ante las radiaciones, afectando muy considerablemente a las radiaciones de más energía, como son las UV. El enrarecimiento grave de la capa de ozono provocaría el aumento de los casos de cáncer de piel, de cataratas oculares y de degeneración retiniana.

La luz "visible" puede causar lesiones por fotocoagulación térmica. Cuando la retina recibe altas intensidades de luz se producen quemaduras en su estructura. La gravedad de la lesión dependerá de la intensidad de la fuente. Puede producirse una lesión no térmica con la exposición a largo plazo a niveles de luz ambiental con intensidades muy por debajo de las necesidades para provocar una lesión térmica.

Los estudios experimentales con animales han demostrado que puede producirse una lesión retiniana con niveles relativamente bajos de luz "visible" y, por tanto, existe la preocupación de que dicha exposición pueda ser la responsable de la degeneración retiniana en el ser humano (Noell y colaboradores, 1996; Kuwabara y Gorn, 1968; O'Steen y Cols, 1972; Lanum, 1978; Ham y Cols, 1982). Se ha demostrado que la exposición a largo plazo a niveles bajos de luz "visible" y UV causa lesiones de los fotorreceptores, en especial los conos y el epitelio pigmentario de la retina (Heriot, 1985; Marshall, 1985; Mainster, 1987; Young, 1988). Parece que la sobrecarga de fotopigmentos provoca una cadena de acontecimientos metabólicos que puede conducir a una lesión reversible o irreversible de los fotorreceptores.

Los conos son más sensibles a las lesiones que los bastones (Marshall y Cols; Sykes y Cols, 1981) y en especial a la región azul de la luz "visible" y UV. Por ello, debemos conocer bien los niveles de iluminación para las tareas habituales, ya que se ha visto que, a niveles de iluminación muy altos, se produce ftopatología retiniana en primates y en el ser humano. Sin embargo, la tendencia a niveles de iluminación más elevada debe estudiarse con precaución en vista de la lesión que se produce en los

fotorreceptores –conos- que puede contraerse con estos niveles elevados (Lerman, 1987). En los países donde la luz y el calor son muy intensos, se adelanta en varios años la presbicia en la mayoría de la población (Heys, Friedrich et al. 2007; Truscott, 2010).

1.4.2.- Cristalino

El ojo dispone, de forma fisiológica, de un sistema de protección combinado que consigue evitar que las neuronas maculares absorban la luz violeta y azul. Esta protección está sustentada principalmente por la presencia de sustancias amarillas en la trayectoria que siguen los rayos de luz a su paso a través del sistema óptico del ojo. Existen unas sustancias llamadas cromóforos que actúan como bloqueantes de las longitudes de onda cortas, absorbiendo una proporción de estas bandas espectrales más energéticas. Los cromóforos producidos en el proceso de madurez y envejecimiento del cristalino, se colorean de manera progresiva según la edad del sujeto.

Desde hace décadas, fueron experimentalmente demostrados los cambios del color del cristalino humano en función de la edad, los trabajos de Hood, Garner y Truscott, en 1999, ratifican mediante estudios bioquímicos las diferentes concentraciones de cromóforos o colorantes naturales que modifican el espectro de luz incidente.



Figura 63. Cambios de coloración del Cristalino según Lerman.

Estas sustancias están representadas por el N-formilquinurenina glucósido y según Meyers, Ostrowsky y Bonner (2004) son resultantes del metabolismo del triptófano, siendo su mecanismo de acción la unión a proteínas presentes en el cristalino. En 2001 Delori, Goger y Dorey demuestran que el aumento de pigmentos en el cristalino aumenta la capacidad de filtración del espectro ultravioleta A (UVA) y de la luz violeta y azul.

La siguiente gráfica muestra experimentalmente medidas realizadas en los laboratorios de la Universidad Complutense de Madrid, en septiembre de 2005, las curvas de transmisión espectral de distintas zonas de lentes intraoculares coloreadas. Se puede apreciar las variaciones ostensiblemente en las curvas de transmitancia/absorbancia. Por otro lado esta gráfica permite exponer la variabilidad en las medidas en función de la zona de la lente observada debido a la acumulación heterogénea distribución de pigmentos, que se ve claramente reflejada en las tres funciones, cuya diferencia única es la proporción de transmitancia/absorbancia.

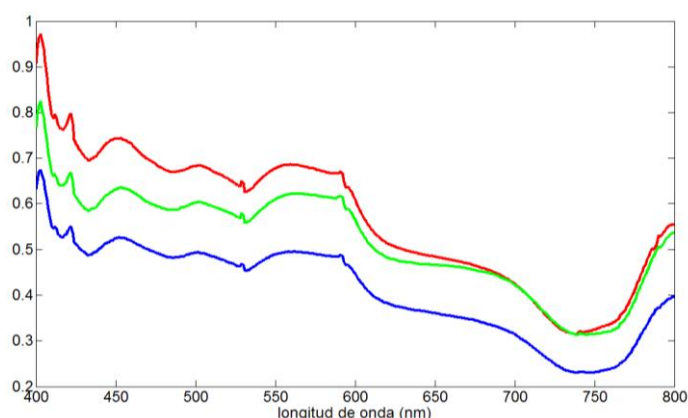


Figura 64. Funciones de Transmitancia/Absorbancia según las zonas valoradas de la lente.

Por este motivo, en las personas mayores de 65 años la luz violeta (<400 nm) no llega hasta la retina y además disminuye marcadamente la recepción de luz azul (400-500 nm).

Una situación especialmente delicada es la que se presenta después de una intervención de catarata. Como es sabido este tipo de cirugía, actualmente ambulatoria, está muy extendida y se estima que el número de pacientes anuales en España es próximo a 350.000. Con la extracción del cristalino en la cirugía de cataratas, se eliminan las sustancias naturales amarillas(cromóforos) que filtran la luz

violeta y azul, dejando la retina expuesta a las nocivas longitudes de onda corta, altamente energéticas, que pueden producir daños irreversibles.

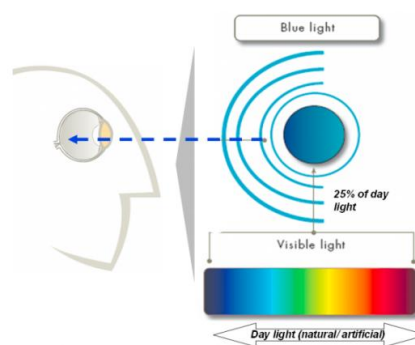
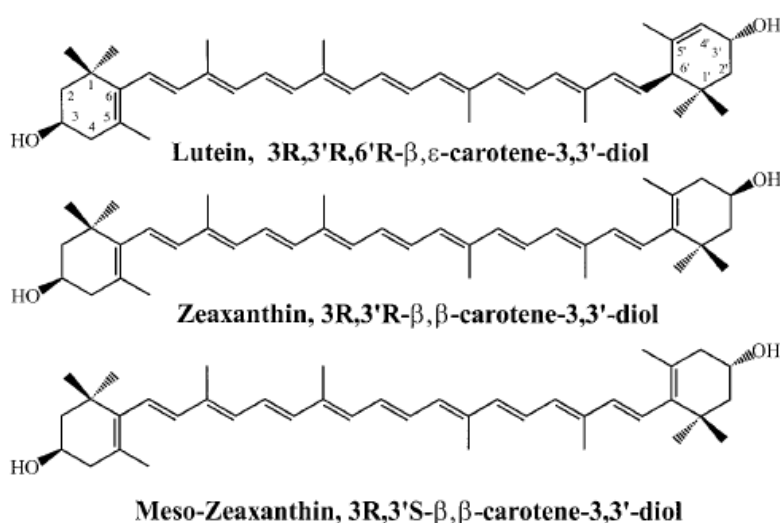


Figura 65. Absorción en los dioptrios oculares de las distintas bandas del espectro de luz “visible”.

1.4.3.- Pigmento macular.

A nivel de la retina, hay dos mecanismos de protección frente a la luz de longitud de onda corta. Primero, la distribución no homogénea de los fotorreceptores retinianos, y en concreto la carencia de fotorreceptores sensibles a la luz azul en la depresión macular (el epígrafe siguiente desarrollará pormenorizadamente esta circunstancia) y en segundo lugar, el hecho de que las neuronas de la retina contengan pigmentos amarillos, los carotenoides (luteína, zeaxantina y meso-zeaxantina) que la protegen del estrés oxidativo.

El pigmento macular es el responsable de la apariencia amarilla de la zona central de la retina que es la mácula lútea. Estos datos ya los proporcionaba Wald en 1945. Autores de la talla de Maxwell (1864), Haidinger (1844,1854) ya demostraron la absorción de la luz azul por parte del pigmento macular y la conjunción de carotenoides que constituye su composición química. Desde la década de los 70 se postuló, de manera firme, el papel fotoprotector del pigmento macular (Ditchburn, 1973). Es muy conocido el papel antioxidante en el sistema metabólico de los carotenoides, especialmente en presencia conjunta de luz y oxígeno.



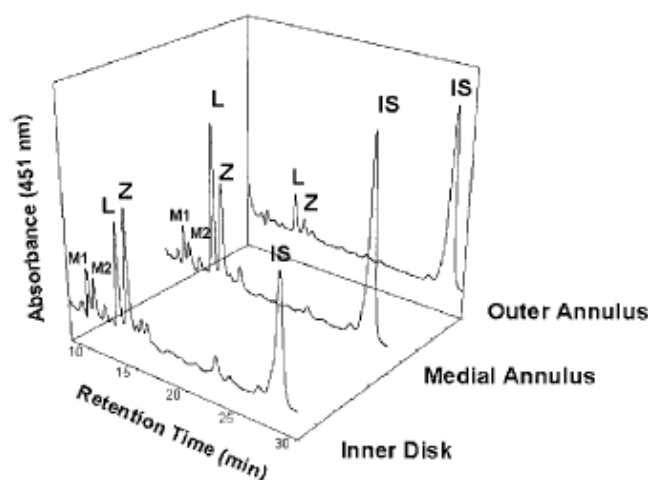
Según Snodderly (1995) la retina es un tejido con una demanda extraordinaria de oxígeno y, obviamente, con una alta exposición lumínica. Estas dos características le convierten en un tejido-diana para los procesos neurodegenerativos.

Figura 66. Estructura de los carotenoides mayoritarios de la mácula humana (Landrum, 2001).

El pigmento macular está compuesto principalmente por tres carotenoides isoméricos: la luteína, la zeaxantina y la meso-zeaxantina, que según Handelman (1988) representa el 36%, 18% y 18% respectivamente, del total de carotenoides contenido en la retina.

De la revisión realizada para Archivos de Bioquímica y Biofísica, por Landrum y Bone en 2001, se extraen las gráficas de las estructuras de los carotenoides que mayoritariamente componen el pigmento macular.

Desde el punto de vista estructural, en la figura siguiente se tipifican las distintas zonas maculares en función del tiempo de retención de los diferentes cromóforos (luteína y zeaxantina). La distribución y densidad de cromóforos es importante para la profilaxis y terapia, ya que su conocimiento permitirá replicar la proporción adecuada en los filtros ópticos artificiales que suplementa la protección retiniana tal y como se verá en los epígrafes correspondientes.



Investigaciones recientes estudian la influencia de los distintos cromatogramas en la neuroprotección de la retina, con objeto de intentar replicar de manera artificial mediante filtros ópticos u otros tipos de dispositivos, el efecto beneficioso de los cromóforos naturales frente a efectos nocivos de la luz azul y

Figura 67. Cromatogramas de los cromóforos en violeta. retina humana (Landrum, 2001).

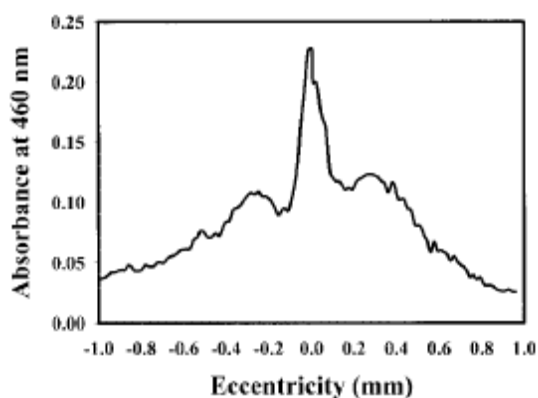


Figura 68. Curva de absorción espectral del pigmento macular en macaco, medido por espectrofotometría (adapted from Snodderly, 1991).

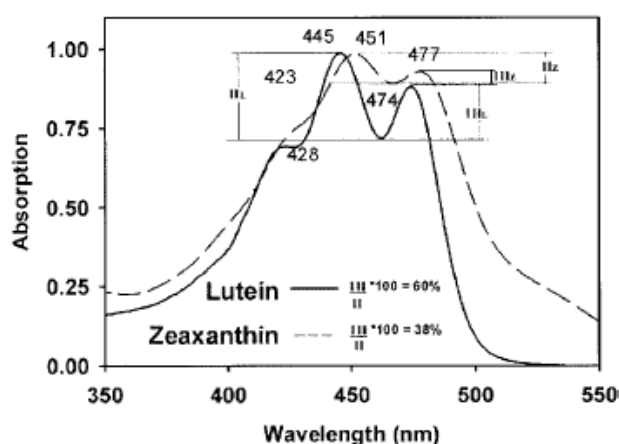


Figura 69. Espectro de luteína y zeaxantina. Características diferenciales. (Landrum, 2001).

La más obvia característica de los carotenoides es su intensa coloración. Destacan tres publicaciones de referencia que se quieren mencionar en esta tesis: en primer lugar la aportación del Dr. Isler, en 1971, con su libro Carotenoides, posteriormente los Dres. Klaui y Bauernfeind, en 1981, amplian los estudios y sus resultados son publicados en un libro titulado Carotenoides como colorantes y precursores de vitamina A y por último, en 1985, y publicada por la misma editorial (Birkhauser-Verlag) el Dr. Britton presenta una nueva revisión denominada también Carotenoides. Todas ellas inciden en la importancia de las curvas de absorción espectral de luteína y zeaxantina, que se presentan en las figuras anteriores.

Los carotenoides son frecuentemente citados por su habilidad en la función antioxidantes de los sistemas biológicos, acción que realizan por mecanismos diferentes. Probablemente la más importante distinción entre luteína y zeaxantina es que la luteína es mucho más fácilmente oxidada que la zeaxantina. Este hecho marcará la diferente composición de los complementos nutricionales que colaborar en el aumento del pigmento macular.

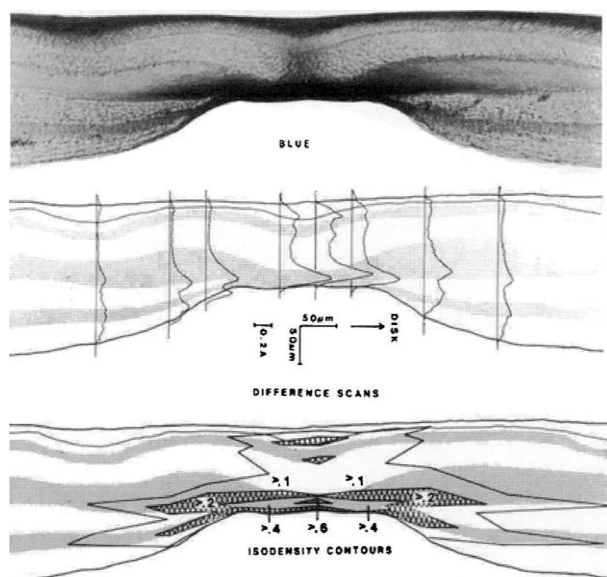


Figura 70. Microspectrofotometría en secciones retinianas.

Desde el punto de vista anatómico y usando microespectrofotometría en secciones retinianas, Snodderly y colaboradores (1984), describieron la distribución espacial de los carotenoides en la retina central. Sus resultados indican un incremento drástico en la concentración de los pigmentos en el centro de la mácula. La distribución de carotenoides es asimétrica, con altas concentraciones en las láminas internas, tal y como se muestra en las figuras correspondientes.

1.4.4.- Ausencia de conos-S en la foveola

Como es sabido, la fovea central humana es tritanope o “ciega al azul” (König, 1894; Wald, 1967; Willmer, 1946). Los trabajos de Magnussen (2001,2004) analizan en profundidad tanto la representación esquemática del escotoma foveal azul como el

campo periférico que lo rodea. En la gráfica siguiente se muestra un esquema de los trabajos de Magnussen de 2004, donde se ratifica el escotoma foveal al azul obtenido con luz monocromática de 440 o 450 nm. La apariencia de la post-imagen está ilustrada en la figura.

Se muestran 3 distintas regiones: una zona externa de bordes difusos, de aproximadamente 5° , una zona interior más iluminada de aproximadamente 2° de diámetro y, en su interior, un agujero pequeño de aproximadamente 25 min de arco, parecido a un estímulo blanco de mayor brillo que el fondo.

La zona central brillante representa el escotoma foveal a la luz azul, es decir, el área libre de conos S.

En las cuatro gráficas siguientes, seleccionadas de los trabajos de Magnussen (2001, 2004), se muestran respecto a las bandas de longitud de onda corta del espectro de luz “visible”, los resultados de dos y tres observadores.

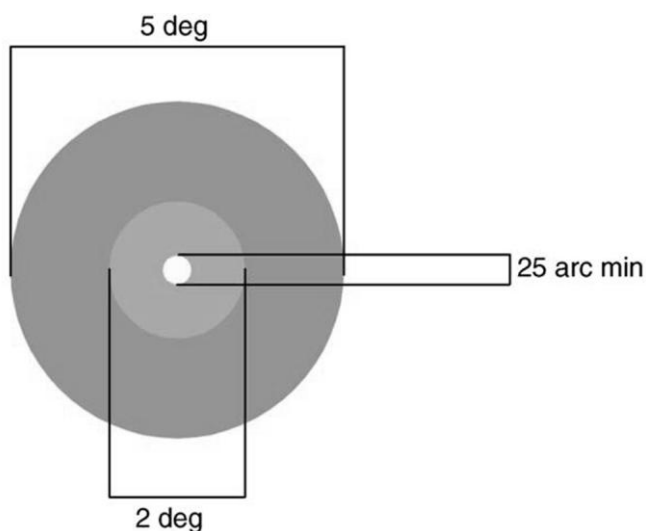


Figura 71. Representación esquemática de la post-imagen negativa de un círculo monocromático de longitud de onda de 450nm.

En las dos primeras gráficas se representa la post-imagen negativa en función a la longitud de onda y en las dos segundas gráficas el tiempo de llenado del estímulo brillante central con relación a la longitud de onda del campo de adaptación.

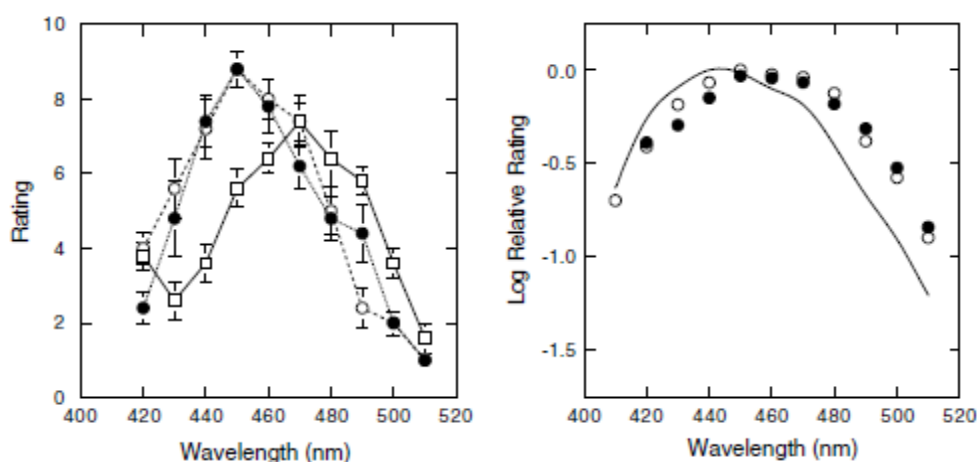


Figura 72. Ratio de la post-imagen negativa en función de la longitud de onda monocromática.

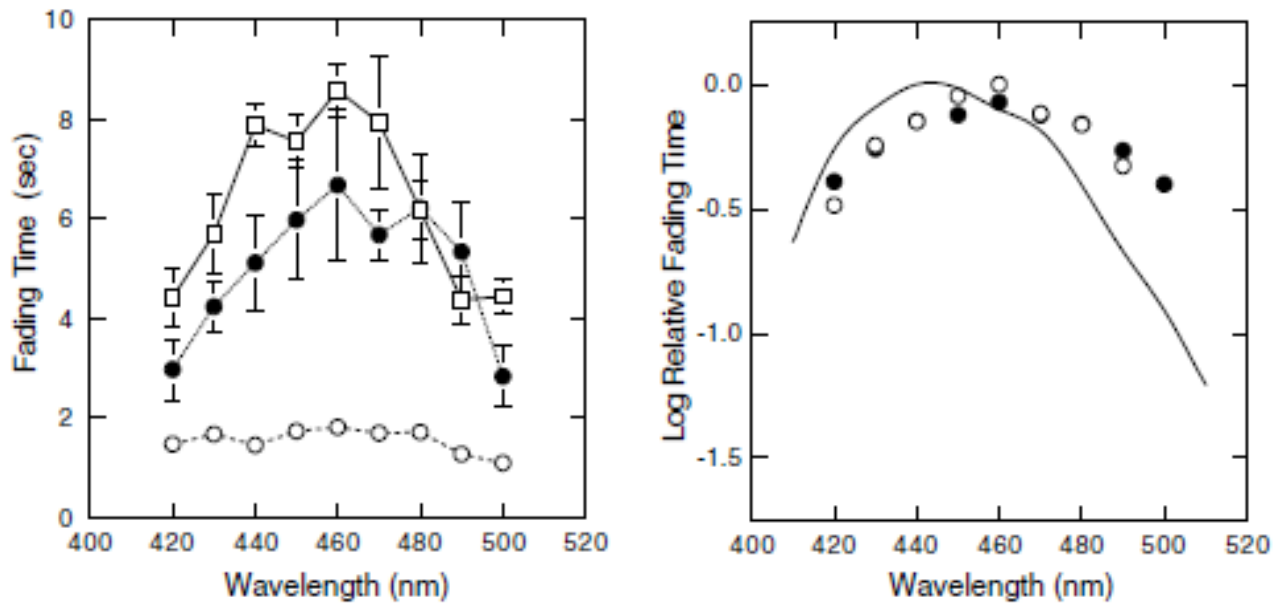


Figura 73. Tiempo de llenado del estímulo brillante central en la post-imagen negativa en función de la longitud de onda.

Esta tesis doctoral tiene interés en remarcar la ausencia de conos-S en la foveola porque junto con los epígrafes que con anterioridad se han descrito (Amarilleamiento del cristalino y Pigmento macular) se considera que es el mecanismo combinado natural de defensa por medio del cual la retina se preserva; no en cualquier zona, sino en su área más perfecta, donde la densidad de fotorreceptores conos es de 150.000 fotorreceptores por mm^2 . El resto de la retina presenta una densidad uniforme de 10.000 conos por mm^2 . Como es sabido, la distribución de los distintos tipos de conos en la retina humana no es uniforme y además de los 6 millones de conos que aproximadamente presenta una retina patrón, el 65% corresponde a conos-L (sensibles a longitudes de onda larga), el 33% a conos-M (sensibles a longitudes de onda media) y sólo el 2% a conos-S (sensibles a longitudes de onda corta).

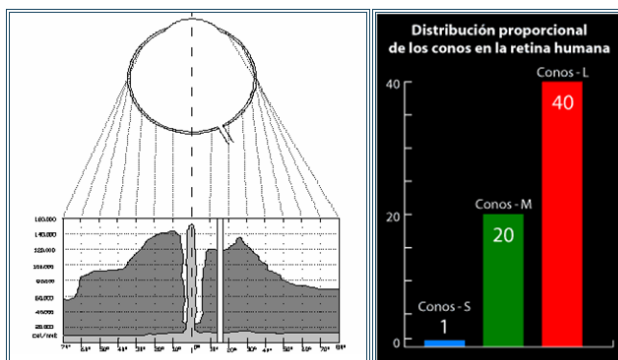


Figura 74. Distribución de fotorreceptores

1.5.- Mecanismos artificiales de protección ocular frente a la luz

1.5.1.- Filtros ópticos

1.5.1.1. - Transmitancia/Absorbancia/Reflectancia.

En una definición genérica se dice que un filtro es un dispositivo diseñado para separar, pasar o suprimir un grupo de objetos o cosas del total de la mezcla. En el tema que nos ocupa en este documento que es el filtrado del espectro electromagnético y más concretamente de una parte de éste que es la luz “visible” los filtros ópticos son elementos ideados para la selección de un determinado intervalo de longitudes de onda de luz. El mecanismo es siempre sustractivo, consiste en el bloqueo de unas longitudes de onda, permitiendo el paso de otras. Así, no intensifican un color, sino que se limitan a oscurecer el color complementario.

Para describir las propiedades ópticas de un filtro se utilizan distintos conceptos: absorción, absorbancia, coeficiente de absorción, transmisión, transmitancia, coeficiente de transmisión, reflexión, reflectancia y coeficiente de reflexión.

La **Absorción (A)** de un material se define como el cociente entre la intensidad de la luz que absorbe y la que incide sobre el mismo. El valor de A estará siempre entre 0 (transmisión total) y 1 (absorción total). La absorción se da a menudo en %.

La **Transmisión (T)** de un material se define como el cociente entre la intensidad de la luz que transmite y la que incide sobre el mismo. Su valor también está entre 0 y 1, y se da en %.

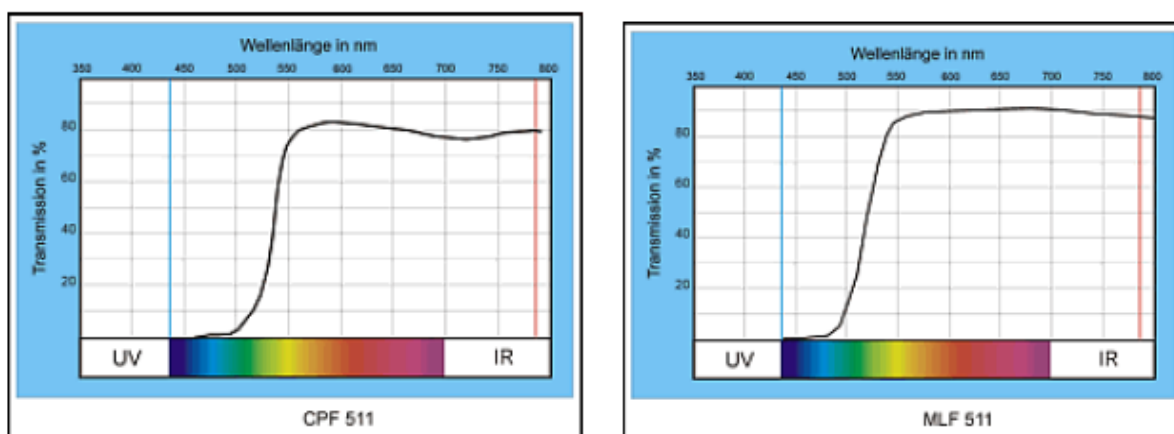


Figura 75. Curvas de transmitancia de un filtro CPF 511 (mineral fotocromático) y un MLF 511 (orgánico monofocal)

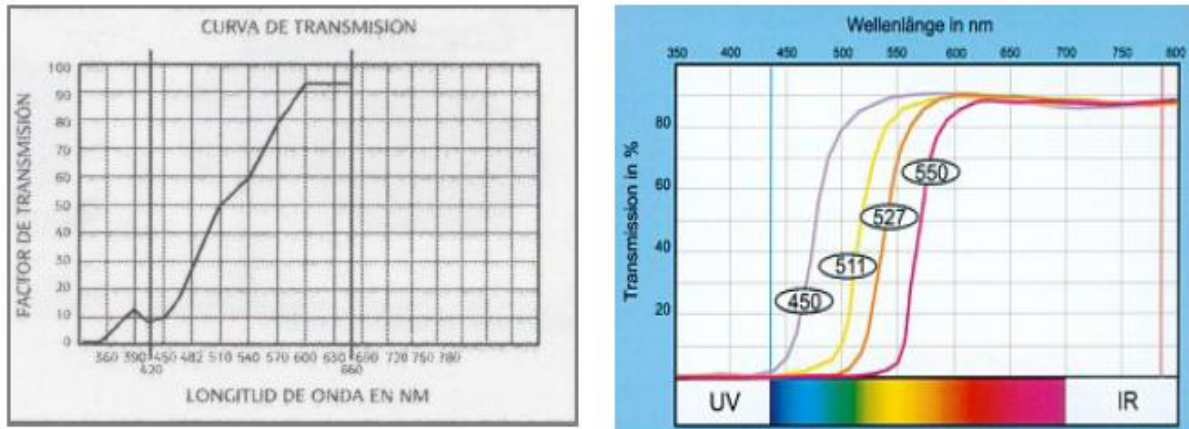


Figura 76. Diferentes curvas de transmitancia de Filtros: la primera de un filtro menos eficaz que el segundo

La **Reflexión (R)** de un material se define como la intensidad de la luz que se refleja y la que incide sobre el mismo. Su valor también está entre 0 y 1, y se da en %.

La relación entre absorción y transmisión y reflexión es $A+T+R=1$

En la gráfica siguiente se muestra un ejemplo de la transmisión de la luz de un ojo normal y de la curva correspondiente a la luz que llega al ojo después de atravesar un filtro de longitud de onda de corte de 511 nm. Como se puede ver en el eje de abscisas se presenta el espectro de luz “visible” y las franjas de ultravioleta A y B, y en el eje de ordenadas se muestra el porcentaje de transmitancia

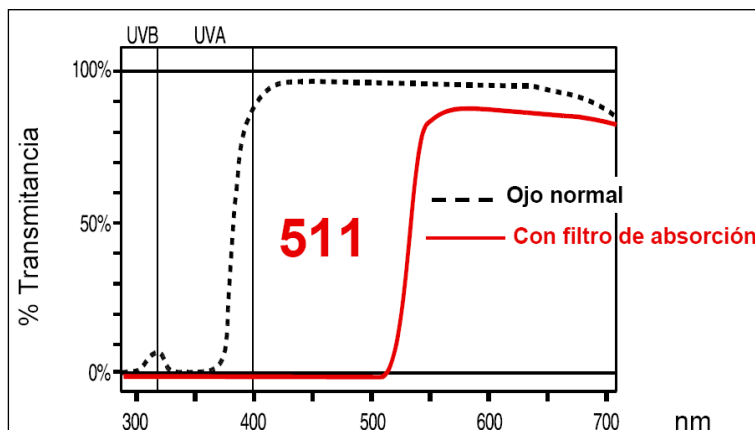


Figura 77. Diferencia de transmitancia entre un ojo sin filtro y otro con un filtro de corte en 511nm.

La técnica más habitual para la caracterización de filtros es la espectrofotometría, considerada como el método de medida de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda. La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía

llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía. Por todo ello, las 2 magnitudes más significativas a la hora de definir o caracterizar un filtro son la Transmitancia y la Absorbancia. En la gráfica siguiente se representan 7 filtros ópticos con sus respectivas curvas de caracterización, resultado del uso del espectrofotómetro.

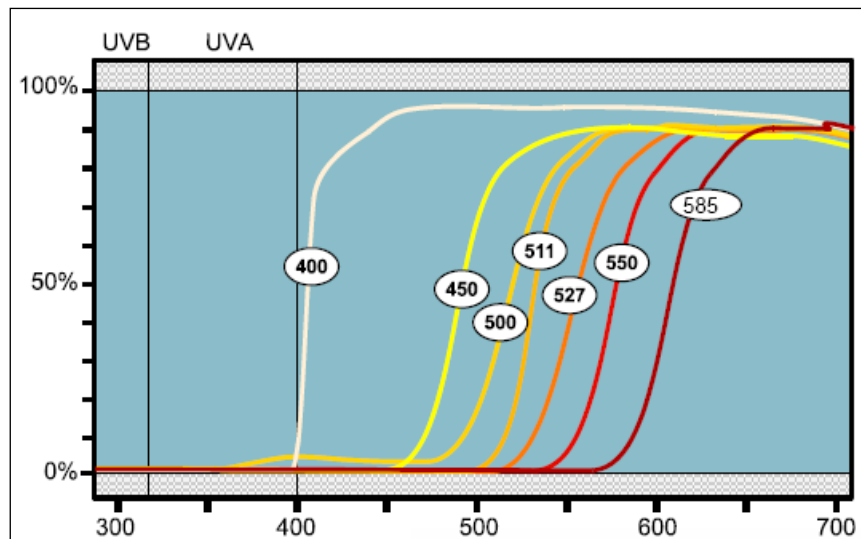


Figura 78. Curvas de absorción espectral de diferentes filtros, medidos por espectrofotometría.

El esquema que a continuación se presenta es el más sencillo de un espectrofotómetro de doble haz. Se utiliza como fuente de luz una lámpara que tenga una emisión intensa en todo el intervalo de longitudes de onda que se quiere analizar. La emisión de la lámpara pasa a través de un monocromador que selecciona la luz de una determinada longitud de onda.

Esta luz monocromada se divide mediante un “beam splitter” que la separa en dos haces de luz con una intensidad de luz aproximadamente igual. Uno de los haces pasa directamente al detector, mientras que el otro atraviesa la muestra antes de llegar al mismo. Posteriormente el detector compara la luz que le llega en los dos sensores y calcula la cantidad de luz que ha transmitido (o absorbido) la muestra. La operación se repite variando la longitud de onda de la luz que sale del monocromador con lo que se obtiene el espectro de absorción. Normalmente, los espectrofotómetros vienen controlados por un ordenador que permite almacenar los datos para realizar cálculos con ellos posteriormente.

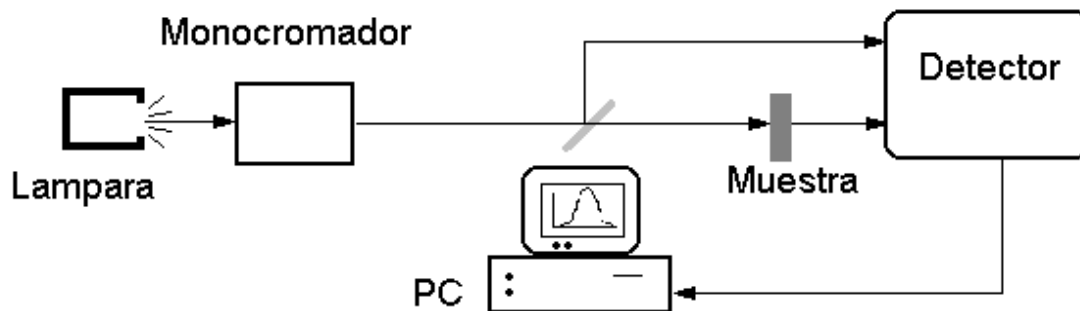


Figura 79. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz

Los físicos ópticos utilizan para el diseño de un filtro una función de red con el rango de frecuencias que se desean suprimir.

La función de red es la relación de la transformada de Laplace de la salida con respecto a la transformada de Laplace de la entrada.

$$H(s) = \frac{Y(s)}{X(s)} \dots (1)$$



Figura 80. Función de transferencia o función de red. Relación salida contra entrada

La Transformada de Laplace es una función de la variable independiente s , donde s es una variable compleja y puede escribirse como $s = \sigma + j\omega$, σ es la parte real y $j\omega$ es la parte compleja. Todas nuestras funciones de red estarán desarrolladas en s .

1.5.1.2. – Tipos de filtros.

Los filtros ópticos se pueden clasificar en función de varios criterios, en este documento se han seleccionado los más interesantes. Así, existen principalmente dos tipos de filtros, si se clasifican en función de la selección espacial o temporal:

1. Selectivos en el Tiempo.

Conocidos como “Pasa Todo”. Este tipo de filtro no modifica el espectro en magnitud. Se emplea para derivar o integrar una señal $\pm 90^\circ$, elimina el desfase de una señal (problemas de fase) y ocasionan un retraso.

2. Selectivos en Frecuencia.

Son capaces de suprimir o permitir el paso de determinado rango de frecuencias, estos filtros modifican la magnitud de la señal. Los filtros selectivos en

frecuencia se dividen en cuatro tipos: Pasa Bajas (Low Pass) / Pasa Altas (High Pass) / Pasa Bandas (Bass Pass) / Rechaza Bandas (Stop Bass)

Por otro lado, si se utiliza como criterio de clasificación la densidad óptica, la relación dictada por la Comisión Europea (UNE-EN 1836:2006+AI), clasifica los filtros en 4 categorías, con relación a su transmisión, indicando además las aplicaciones, las restricciones y las indicaciones de uso. En la tabla siguiente se exponen todos los casos.

Categoría de filtro	Transmisión	Aplicaciones	Restricciones	Indicaciones Uso
0	De 80% a 100%	Lentes claras o ligeramente coloreadas	Ninguna	Interior o cielo nublado
1	De 43% a 80%	Lentes ligeramente coloreadas	No válidas para la conducción nocturna	Luminosidad solar atenuada
2	De 18% a 43%	Lentes medianamente Coloreadas	No válidas para la conducción nocturna	Luminosidad solar media
3	De 8% a 18%	Lentes fuertemente coloreadas	No válidas para la conducción nocturna	Fuerte luminosidad solar
4	De 3% a 8%	Lentes muy oscuras	No válidas para la conducción nocturna	Luminosidad solar excepcional. No adaptadas para conducción de automóviles.

Tabla 4: Categorización de filtros según norma UNE-EN 1836:2006

Otro criterio de clasificación de alta utilidad se expone en el esquema siguiente:

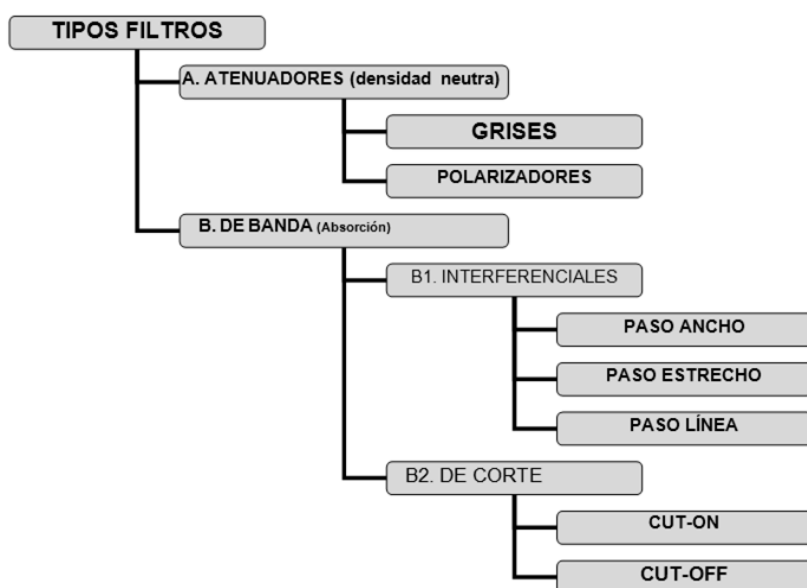


Tabla 5: Tipos de filtros. Clasificación.

A) Filtros Atenuadores o de Densidad Neutra

Reducen la intensidad de todos los colores por igual. Se dividen en filtros grises, y polarizadores. Estrictamente, alteran en la misma proporción todas las frecuencias del espectro “visible”, con lo que reducen el brillo de la imagen, pero no modifican el tono. Además tienen un corte de protección ≤ 390 nm. Con ellos se puede disminuir a voluntad el brillo de una imagen. Un filtro gris simplemente atenúa en una proporción fija la luz incidente. Por el contrario, un polarizador modifica la intensidad absorbida a voluntad del usuario, por lo que en la práctica equivale a un ilimitado número de filtros grises.

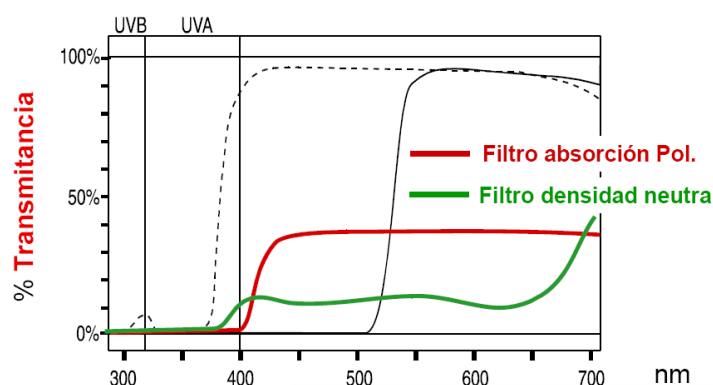


Figura 81. Curvas de absorción espectral de filtros

Un filtro polarizador realmente consta de dos filtros idénticos montados juntos, llamados polarizador y analizador, que tienen la propiedad de sólo permitir el paso de la luz que posea un plano de oscilación paralelo a la estructura microscópica del material. A medida que se va anulando la perpendicularidad de los planos mediante el giro del analizador, la imagen se va aclarando gradualmente.

B1) Filtros interferenciales

También llamados filtros dicróicos, dieléctricos o de Fabry-Perot, son filtros de banda que seleccionan la luz no por absorción, sino por interferencia. Se usan tanto en el espectro “visible”, como UV e IR (200-15000 nm).

En esencia constan de dos o más grupos de capas, separados entre sí por láminas de resina o aire. Cada grupo está a su vez constituido por apilamientos de finísimas capas de un material transparente, generalmente dieléctricos como MgF_2 o CaF_2 , alternadas con películas de materiales de un mayor índice de refracción (láminas metálicas o de ZnS), formando subgrupos. Los subgrupos a su vez se separan con

capas espaciadoras y de acoplamiento, para hacer posibles las interferencias. El conjunto queda encerrado entre dos placas de vidrio plano para su protección. Un filtro ordinario de este tipo suele constar así de varias decenas de capas, depositadas sucesivamente. Normalmente los grosores se eligen de forma que cada cuatro capas formen dos filtros completos. Controlando el espesor de las láminas de dieléctrico interpuestas, se puede seleccionar una longitud de onda, que será reforzada en esa etapa del filtro. Existen filtros de banda interferenciales, de gelatina, de vidrio, mixtos y líquidos.

La selección del color se produce por medio de interferencias destructivas de la radiación incidente. Así, cuando un haz luminoso de rayos paralelos se dirige hacia un filtro interferencial, parte de la luz atraviesa la primera capa metálica, cruzando a continuación la primera capa de dieléctrico interna. Al llegar a la segunda capa, de mayor índice de refracción, parte de la luz la atravesará, pero una fracción importante será reflejada hacia el interior, dirigiéndose de nuevo hacia la superficie. El encuentro entre un nuevo haz directo y el reflejado produce fenómenos de interferencia. Así, sólo aquellas frecuencias de luz cuyo recorrido por el interior del filtro sea un múltiplo entero de su longitud de onda serán reforzadas, mientras que el resto se anularán total o parcialmente. La repetición de este fenómeno múltiples veces consigue que poco a poco la radiación emergente sea gradualmente más pura.

La formación de las capas y películas separadoras es un proceso difícil y costoso. Típicamente, un filtro nebular puede contener 40 o más capas depositadas sucesivamente, una sobre otra. La uniformidad del espesor, que determina la pureza del filtraje, requiere un control muy riguroso de fabricación. Habitualmente la selección se consigue con el segundo grupo de capas y que se llama bloqueador (al primer grupo se suele llamar selector de banda). También es una práctica corriente depositar una capa coloreada, que igualmente puede eliminar los armónicos o reducir la luz base.

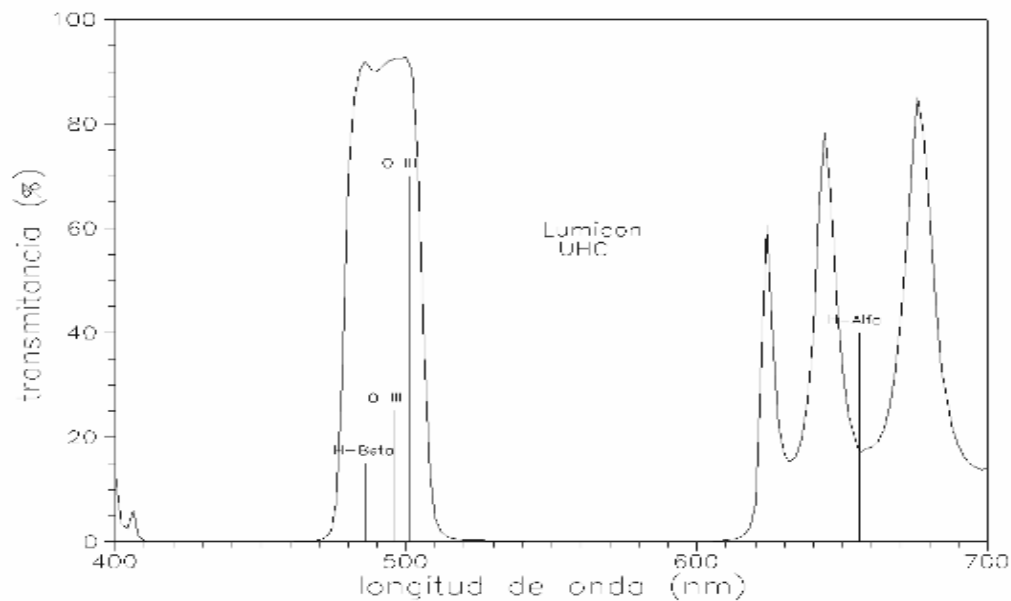


Figura 82. Perfil de transmisión de un filtro de paso estrecho (Lumicon UHC)

Estos filtros se dividen en tres clases según la eficiencia con que seleccionan las líneas de emisión de las nebulosas:

- filtros de paso ancho (broad band),
- filtros de paso estrecho (narrow band)
- filtros de paso línea (line filters).

Los filtros de interferencia proporcionan grandes transmitancias en dominios muy estrechos de longitudes de onda. Su elevada selectividad ha facilitado el desarrollo de múltiples aplicaciones. Los filtros de paso ancho: la mayoría son filtros mixtos de absorción e interferencia, con pasos de banda en la región del verde. Los filtros de paso estrecho: El paso de banda hace posible distinguir muchos objetos de una debilidad extrema. Los filtros de paso línea: son los más selectivos con transmisiones del 97%.

B2) Filtros de banda o de corte selectivo

Los filtros de corte selectivo son aquellos que tienen poder de absorción en una sola porción del espectro luminoso. Los más interesantes para en este trabajo son los que absorben las longitudes de onda corta (azul), radiación muy energética, que produce daño retiniano.

Se usan en la región “visible” del espectro y en el infrarrojo cercano, desde los 380 a los 2000 nm. En realidad, son sustancias que absorben luz, que se encuentran

disgregadas y suspendidas en un medio inerte, como un líquido, plástico o gelatina, o bien vidrios a los que se ha adicionado algunas sustancias para darles color.

A modo de ejemplo se presentan a continuación varias curvas de absorción espectral de filtros utilizados en algunos trabajos de investigación realizados por el grupo de Neuro-Computación y Neuro-Robótica de la Universidad Complutense de Madrid.

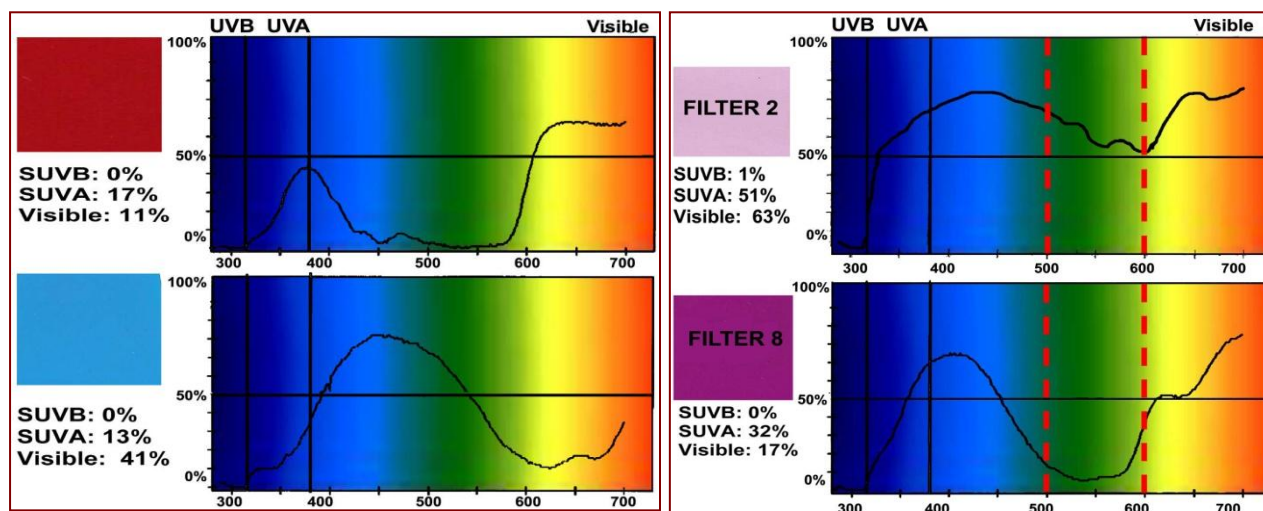


Figura 83. Curvas de absorción espectral

Se suelen caracterizar mediante dos parámetros, relacionados con su perfil espectral: porcentaje de transmitancia o máxima relación observada entre la luz que atraviesa el filtro y la que en un principio llegó hasta él (se define transmitancia como la fracción de luz incidente que consigue atravesar un determinado medio) y ancho de banda efectivo o amplitud de la banda de transmisión a la mitad de su altura máxima.

Se pueden construir combinaciones uniendo un filtro de paso alto y otro de paso bajo, siempre que ambos posean un dominio de transmisión compartido, aunque es más común valerse de otros medios.

Los filtros de corte constituyen sólo un caso particular de filtro de banda, parte de cuyo dominio de absorción se prolonga hacia el “visible”, desde el infrarrojo (paso bajo) o desde el ultravioleta (paso alto). Es frecuente también encontrar filtros constituidos por una capa de pigmento que recubre un soporte transparente. El grado de opacidad del filtro a una determinada longitud de onda, puede ser cuantificado mediante la ley de Beer-Lambert.

En la gráfica siguiente se exponen curvas de absorción espectral para aclarar los conceptos anteriores.

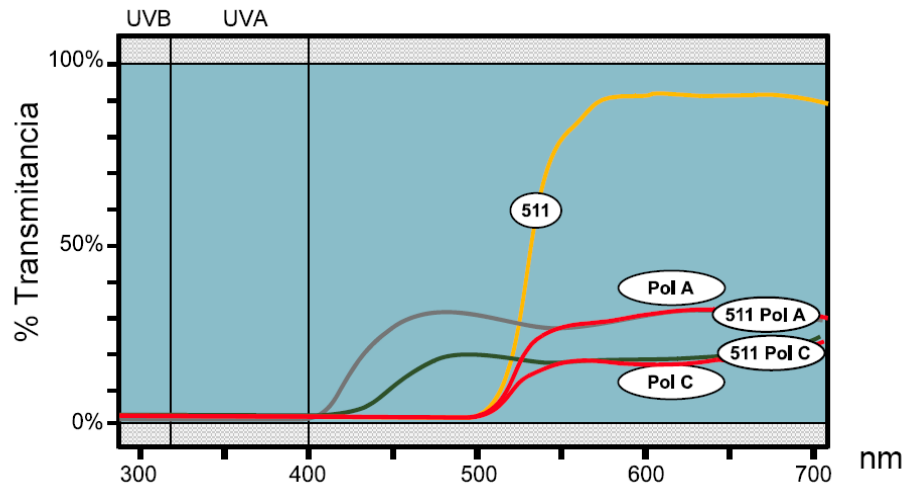


Figura 84. Diferencias entre las curvas de transmitancia de 1 Filtro de corte en 511nm frente a 2 Filtros con distintas polarizaciones y a otros 2 que combinan Filtro y polarización.

En definitiva, la intensidad transmitida en la región espectral seleccionada depende de la naturaleza química del compuesto absorbente (coeficiente θ_0), del espesor del filtro (d), y de la concentración del pigmento (c). En la figura inferior se puede apreciar tres curvas que corresponde a un ojo normal y a dos tipos diferentes de filtros.

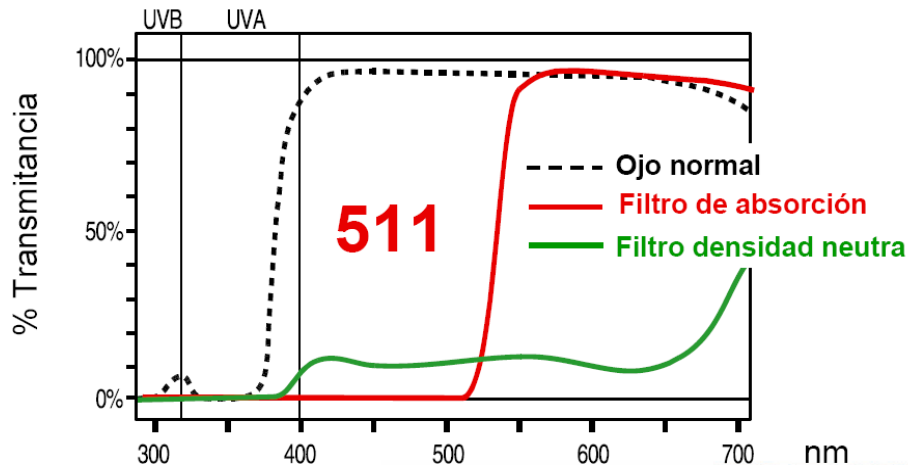


Figura 85. Diferentes curvas de transmitancia en función del tipo de Filtro utilizado

2.- Objetivos

2.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto fototóxico de la luz y la acción protectora contra las longitudes de onda corta de los filtros ópticos de absorbanza selectiva en la retina de animales de experimentación.

2.2.- Objetivos Específicos

2.2.1.- Análisis Estructural de la retina

- 1.- Realizar un análisis cuantitativo de los diferentes estratos nucleares de la retina como punto de partida al ser indicativo de las capas retinianas que se ven más afectadas.
- 2.- Comparar la densidad celular de las capas nuclear externa e interna de retinas de conejos expuestos a luz de diferente composición espectral. Los animales serán sometidos a implante mixto de lentes intraoculares de distinta absorbanza en cada uno de los dos ojos (amarilla/transparente).
- 3.- Determinar si la luz induce muerte celular por apoptosis o si en la pérdida de celularidad inducida por la luz intervienen otros mecanismos.
- 4.- Analizar el efecto protector de los filtros ópticos de absorbanza selectiva de las bandas más energéticas del espectro luminoso en los cambios en el proceso de muerte celular de la retina.
- 5.- Determinar el tipo de fotorreceptor visual más afectado por los distintos tipos de iluminación.
- 6.- Valorar el efecto de las lentes intraoculares con filtro selectivo a la luz azul respecto al tipo de fotorreceptor afectado.

2.2.2.- Análisis expresión génica

- 7.- Estudiar el efecto de la exposición a la luz sobre la expresión de diferentes genes implicados las vías pro y anti-apoptóticas.
- 8.- Determinar si la luz produce modificaciones en la expresión de algunas proteínas ligantes del calcio presentes en las células de la retina y si este efecto puede ser prevenido por la implantación de lentes intraoculares que eliminan la parte azul y violeta del espectro luminoso.

- 9.- Estudiar las variaciones en la expresión del Trk-B, el receptor del BDNF, como consecuencia de la exposición a la luz.
- 10.- Contribuir al conocimiento de la regulación de las metaloproteasas en la patogenia de la degeneración retiniana inducida por la luz.
- 11.- Evaluar el efecto de la exposición a la luz sobre la expresión de los genes TIMP-1 y TIMP-2 y analizar si este efecto puede ser prevenido mediante filtros de absorbancia selectiva para longitudes de onda corta.

3.- Hipótesis

3.1.- Hipótesis Conceptual:

La luz de longitud de onda corta provoca un proceso neurodegenerativo en el sistema visual que es menor si se interponen filtros ópticos que absorban esta radiación.

3.2.- Hipótesis Fisiológica:

Los filtros ópticos de absorbanza selectiva del espectro “visible”, que contienen pigmentos amarillos, protegen la retina.

4.- Muestra, Material y Método

4.1.- Muestra

Según la Asociación Americana de criadores de Conejos existen 28 razas y alrededor de 80 variedades de conejos que pueden ser utilizados como animal de experimentación. Su clasificación taxonómica es: clase: mamífera, orden: lagomorpha, familia: leporidae, género: *orictolagus*. A continuación se exponen algunos datos biológicos de estos animales: Su vida media es de 6 a 7 años. Su peso al nacer está comprendido entre 30 y 70 gr, según la raza, alcanzando un peso adulto muy variable entre 1 y 6 kg. Algunas características elementales de estos animales de experimentación son: presentan 4 dígitos posteriores y 5 anteriores; su fórmula dentaria es I 2/1; C 0/0; PM 3/2; M 3/3; el esqueleto corresponde al 7 % del peso corporal; su campo visual es casi independiente con 15° de binocularidad; presentan un corazón pequeño, 3 pulmones derechos y 2 izquierdos; el timo altamente desarrollado y un hígado que presenta 4 lóbulos. Su vida reproductiva es de 3 a 4 años y el periodo de gestación de 32 días; el tamaño de camada es de 6 animales, en promedio, con un tiempo de destete de 6 a 8 semanas.

Respecto al macroambiente es interesante reseñar que la iluminación en estabulación habitual suele ser de 12 horas luz/12 horas de oscuridad. La temperatura ambiental debe ser de 15 a 20°C y la humedad relativa del ambiente debe oscilar entre 50 y 55 % de HR.



Figura 86. Diferentes razas de conejos de experimentación

Con relación al microambiente, sólo comentar que se mantienen en jaulas metálicas de una superficie recomendada de 0,14 m² para animales de menos de 2 kg, de 0,37 m² para animales entre 2 y 5 kg, y una superficie adicional de 0,19 m² para hembras lactantes.

El alimento y agua se suministra habitualmente ad libitum, generalmente dispuestos en tolvas y sistemas automáticos.

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado conejos pigmentados de la raza Leonado de Borgoña, con edades comprendidas entre 2 y 2,5 años, procedentes del bioterio de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Es importante destacar la necesidad de utilizar un modelo animal que permita la intervención quirúrgica con lentes intraoculares, además, al seleccionar la raza se tuvo en consideración que las retinas fueran pigmentadas. Esta aclaración es de interés ya que, en general, los conejos utilizados en experimentación animal son albinos y en consecuencia sus retinas están desprovistas de pigmentos. A continuación se explicarán algunas características de la raza seleccionada.



Figura 87. Animal de experimentación seleccionado

Es de origen francés y semejante al neozelandés rojo. Tiene buena morfología corporal. No se adapta bien a los suelos de rejilla, lo que supone un inconveniente para su estabulación. Presenta el pelo liso y tupido de color marrón en todo el cuerpo. Ojos oscuros. Tamaño mediano, con peso adulto entre los 4,0 y 4,5 Kg.

Luz	No intervenidos (control)		Intervenidos	
				<div>OD LIO-A</div> <div>OI LIO-T</div>
	Inicial	Término	Inicial	Término
No expuestos	7	4	11	8
Luz Blanca	8	6	12	7
Luz Amarilla	8	5	12	8
Luz Azul	6	5	5	3
TOTAL	29	20	40	27

Tabla 6: Muestra total de animales de experimentación.

La muestra se ha dividido en dos grupos según hayan sido o no intervenidos para el implante de las lentes intraoculares. El grupo de no-intervenidos (control) contó

en un principio con un total de 29 conejos de los cuales llegaron a término 20 animales. Por otro lado el grupo de conejos intervenidos para el implante de las lentes intraoculares se inició con 40 conejos de los cuales finalizaron el proceso 27 animales. Los motivos de las pérdidas fueron varios. Algunos conejos murieron durante la propia intervención, otros por razones desconocidas después de la cirugía y otros tuvieron que ser sacrificados por sufrir infecciones por sarna.

En la tabla superior puede observarse la distribución de los animales según las exposiciones a distintos tipos de luz y los no expuestos. La muestra final estuvo compuesta por 20 conejos no intervenidos (4 no fueron expuestos, 6 expuestos a luz blanca, 5 expuestos a luz blanca exenta de azul y 5 expuestos a luz azul) y 27 conejos intervenidos (8 no expuestos, 7 expuestos a luz blanca, 8 expuestos a luz blanca exenta de azul y 3 expuestos a luz azul).

4.2.- Material

A continuación se relaciona el material utilizado **para cirugía de implantación de lentes intraoculares, sustitutivas de los cristalinos de cada conejo:** Lente intraocular Acrysoft Natural (Alcon), Lente intraocular Acrysoft (Alcon), Blefarostato, Blefarostato desechable, Inyector Monarch II, Cuchilletes (Slit Knife Dual Bevel 8065993247_3,2 mm), Lancetas (V-Lance Knife 20GA 8065912001 - 1,3 mm); Cuchilletes oftálmicos (Ophthalmic Knife 15° 8065921501), Cánulas de hidrosección curvas ("J" shaped cannula 27 GA_ 8065441120); Cánulas de hidrosección rectas (Hidrossection cannula 27 GA, 8 mm bend_8065441620), Manguitos de irrigación



Maxvac Manifold Set (ref 8065740882), Pinzas de capsulorépsis rectas, Pinzas de capsulorepsis rectas desechables, Pinzas de capsulorépsis curvas, Pinzas de capsulorépsis curvas desechables (Monarch II IOL Delivery System Cartridges 8065977758), Cartucho Monarch II B, Agujas hipodérmicas, Lancetas quirúrgicas V- Lance Knife 20 GA de 1,3 mm y Lancette

Figura 88 a. Quirófanos e instrumental utilizados.



Chirurgicale.Ophthalmique 8065913198), Viscoelástico (Celoftal), Supresor de Burbujas BSI, Jeringuilla de insulina, Jeringuilla de 2 ml, agujas, Bolsa de drenaje, Suero fisiológico, Guantes quirúrgicos, Batas asépticas, Gorros, Calzas, Mascarillas, Guantes de látex, Recipientes para análisis de orina, Batas no esterilizadas, Gasas.

Figura 88 b. Quirófanos e instrumental utilizados.

Los fármacos utilizados fueron Tropicamida al 1% (Alcon Cusí), Fenilefrina de Llorens Colirio 10% (Fenilefrina hidrocloreto, Tetracaína), Maxitrol de Alcon Cusí (Dexametasona, Neomicina sulfato, Polimixina B sulfato), Alsir-40 (Enrofloxacin, 200mg), Diclofenaco Sódico (Lepori), Flumixin de Schering Plough (meglumine 50mg). Microscopio quirúrgico con luz coaxial., facoemulsificador Universal de la casa Alcon, caja de cirugía de catarata con blefarostato, pinzas de córnea tipo Barraquer, pinzas MacPherson, tijeras Weskott y tijeras Vannas. Así como todos los instrumentos necesarios para la anestesia de los animales de experimentación.



Figura 89. Material fungible utilizado

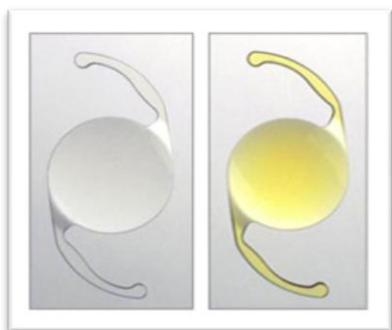


Figura 90. Lentes Acrysoft y Acrysoft Natural (Alcon®)

Las lentes intraoculares fueron siempre de la marca Alcon en dos modalidades: Acrysoft (transparente) y Acrysoft Natural (con pigmentación amarilla). Las curvas de absorción espectral se encuentran en la figura correspondiente en la que se comparan ambas lentes y cristalinos de diferentes edades.

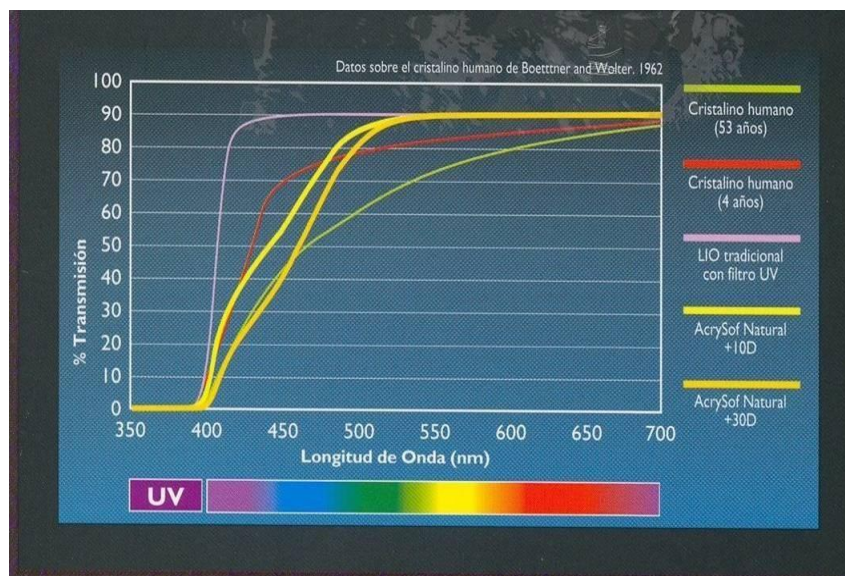


Figura 91. Curvas de absorción espectral de distintas lentes y cristalino humano.

Con posterioridad a las necesidades de material para la cirugía de cristalino se han utilizado jaulas realizadas expresamente para este experimento, en los Talleres de metalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de Madrid. El material utilizado fueron varillas de acero inoxidable curvadas manualmente para adecuarlas a un espacio donde pudieran vivir los animales expuestos a la iluminación requerida, que se detallará en el apartado correspondiente. Las medidas fueron de 482x630x300mm, siguiendo las directrices sugeridas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.



Figura 92. Jaulas metálicas sin ninguna superficie bloqueante de luz, realizadas expresamente para este experimento.

El material utilizado para la iluminación de las jaulas eran fuentes de luz con características específicas y curvas de emisión espectral propias de luz blanca, iluminante patrón D65. Todas las medidas técnicas y valoraciones de mantenimiento de la instalación lumínica fueron realizadas por profesores de la Escuela Universitaria de

Óptica de la Universidad Complutense de Madrid. La marca seleccionada fue Phillips. Cada jaula dispuso de tantas fuentes de iluminación como fueron necesarias hasta conseguir una iluminación homogénea y controlada.

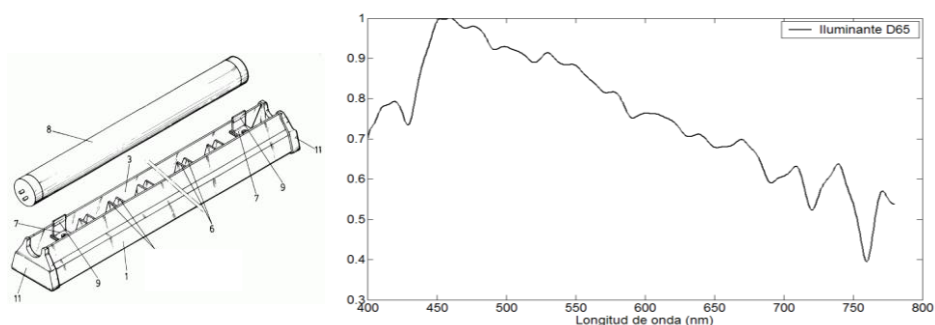


Figura 94. Aspecto externo y emisión espectral relativa para el D65 de la CIE

Se utilizaron tres tipos de iluminación: en primer lugar luz blanca, en segundo lugar luz blanca exenta de azul, para lo cual se ha utilizado tubos fluorescentes de luz blanca cubiertos por filtros de absorbancia selectiva cuyas características se expondrán en los siguientes párrafos, y en tercer lugar tubo fluorescentes de luz azul cuya curva de emisión espectral normalizada al azul se muestra en la gráfica correspondiente.

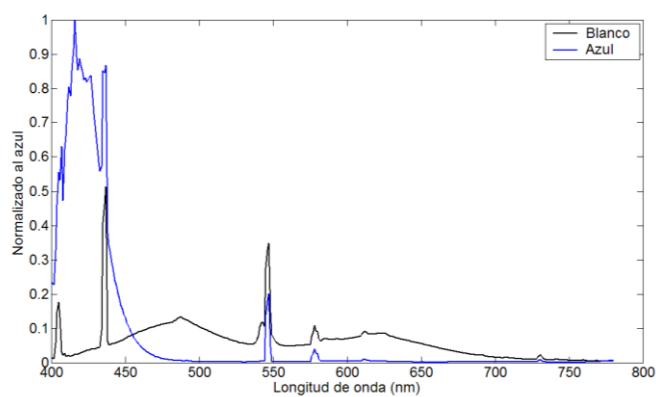


Figura 95a. Emisión espectral relativa al fluorescente azul

En la tabla siguiente se resume el flujo radiante porcentual en cada tramo de fuente de iluminación.

Fluorescente\Tramo	400-450	450-500	500-550	550-600	600-650	650-700	700-750
Blanco	15.5	23.3	20.6	13.8	16.6	7.5	2.6
D65 (estándar CIE)	14.4	17.7	16.5	14.9	13.37	12	11
Azul	90.7	4.9	2.1	0.9	0.6	0.3	0.3

Tabla 7: Flujo radiante porcentual en cada tramo de cada fluorescente así como para el D65.

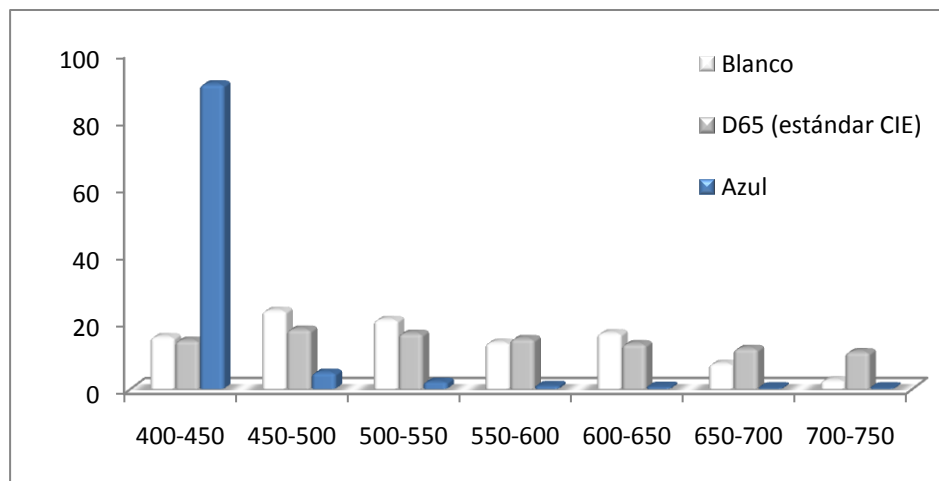


Figura 95 b. Gráfica comparativa de la composición espectral por bandas de las distintas luces

La luz blanca exenta de azul se consigue mediante la disposición de filtros E-Colour #010: Medium Yellow (Transmisión = 83,91%) de la marca ROSCO Ibérica S.A. cubriendo la fuente de luz blanca. La curva de absorción espectral del filtro óptico se muestra en la gráfica siguiente.

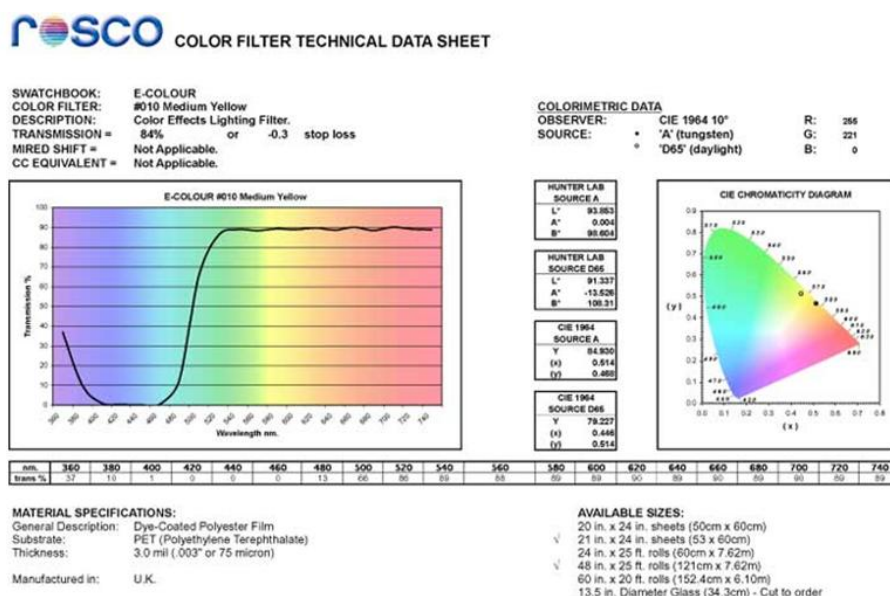


Figura 96. Características ópticas de los filtros superpuestos a las jaulas en exposición.

Las mediciones de los filtros E-Colour #010: Medium Yellow realizadas por los expertos en iluminación dieron las siguientes curvas

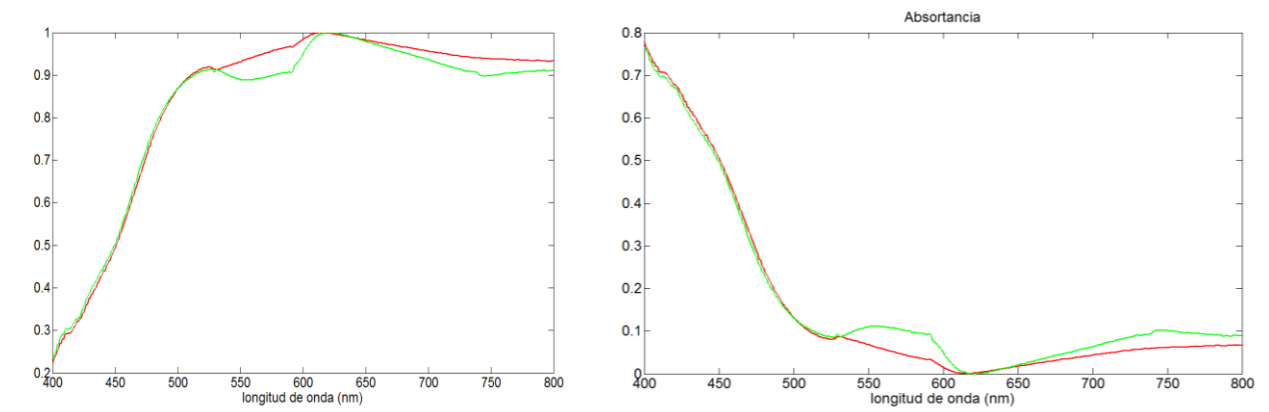


Figura 97. Curvas de absorción y transmisión en diferentes zonas de las lentes intraoculares utilizadas en las intervenciones quirúrgicas

Por otro lado, para el análisis comparativo estructural se han utilizado los anticuerpos primarios siguientes:

	Animal	Especificidad en conejo	Dilución	Obtenidos de
anti-PGP 9.5	Conejo	Si	1:500	Biogenesis
anti-NFPp	Raton	No	1:100	Sigma-A
anti-MAC	Ratón	Si	1:50	Chemicon
anti-GFAP	Ratón	Si	1:100	Boehringer
anti-CP3	Conejo	No	1:50/1:100	Cell Sign.T.
anti-CR	Cabra	No	1:50/1:100	Sta. CBT
anti-S100 P	Conejo	No	1:200	Dako
anti-CBD28k	Mouse	Si	1:100	Sigma-A
anti-PV	Mouse	Si	1:100	Sigma-A
anti-TrkA	Conejo	Si	1:100	Sta. CBT
anti-TrkB	Conejo	Si	1:100	Sta. CBT
anti-TrkC	Conejo	Si	1:100	Sta. CBT
anti-opsin	Ratón	No testado	1:100	Sigma-A
anti-RPE 65	Ratón	No testado	1:50/1:100	Biocompare
anti-Bcl-2	Ratón	No testado	1:25/1:50	Sta. CBT

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en el experimento.

Para el análisis génico se han utilizado los primers siguientes, que se muestran clasificados en función de su utilidad, en los siguientes párrafos.

Genes relacionados con la apoptosis
β-actin: up: 5'-caa cgg ctc cgg cat gtg c-3'; down: 5'-ctc ttg ctc tgg gcc tcg-3'.
Bad: up: 5'-aga gta tgt tcc aga tcc cag-3'; down: 5'-gtc ctc gaa aag ggc taa gc-3'.
Bcl-2: up: 5'-ttg tgg cct tct ttg agt tcg-3'; down: 5'-att tct act gct tta gtg aac c-3'.
Bcl-XL: up: 5'-gac ttt ctc tcc tac aag c-3'; down: 5'-cga aag agt tca ttc act ac-3'.
Caspase-1: up: 5'-gag aag aga gtg ctg aat cag-3'; down: 5'-caa gac gtg tac gag tgg ttg-3'.
d-Jun: up: 5'-gca atg ggc acat cac cac-3'; down: 5'-gaa gtt gct gag gtt ggc g-3'.
c-Fos: up: 5'-caa cgc cga cta cga ggc gtc at-3'; down: 5'-gtg gag atg gct gtc acc g-3'.
Proteínas S100
S100a6: up: 5'-atg gca tgc cct ctg gat-3'; down: 5'-tta ttt cag agc ttc att-3'.
CB28k: up: 5'-cca cca ctc cat gac tcc aac-3'; down: 5'-cac ttg ggt tct ctc att ttc tga-3'.
CR: up: 5'-gac gcc ctc ctg aag gat ct-3'; down: 5'-tgc act ctg ttg gac tcg gaa gcta-3'.
Metaloproteasas
MMP-2: up: 5'-cca ctg cct tcg ata cac-3'; down: 5'-gag cca ctc tct gga atc ttc aaa-3'.
MMP-3: up: 5'-gct ttg aag gtc tgg gag gag gtg-3'; down: 5'-cag cta tct tcc tgg gaa atc ctg-3'.
MMP-9: up: 5'-gtt ccc gga gtg agt tga-3'; down: 5'-ttt aca tgg cac tgc aaa gc-3'.
Trk-B
TrkB: up: 5'-ggg gaa gga gcc ttc ggg-3'; down: 5'-cat cca tcg gat ggg caa cat-3'.
TIMP1 (FL) - ACCESSION NM_001082232
atggc ccccttgga gccctggcct ccagcatgct gctgctgctg tggctggtag cccccagcag agcctgcacc tgtgtccac ctcacccgca gacggccttc tgcaactccg acctgtcat caggccaag ttgtggggg ctccagaagt caatcatact acctgttacc agcggtatga aatcaagacc accaagatgt tcaaggatt tgacgccttg gggcatgcca cggatatccg gttgtctac acccccgcca tggaaagtgt ctgcgggtac cccagaaccg cagcgaggag ttctcatcg ctggacaact gcggaacggg ctctgcaca tcacgacttg cagtttcgtg gttccctgga acagtctgag ctctctcaa cgttcggct tcaccaagac ctacgtgcc ggctgtgaca tgtgcacagt gttgcctgt gcatccatcc cctgccatct ggagagtac actcattgct tgtggacaga cagctctcaggcttgaca agggctcca gagccgcat ctgcctgcc tgccacagga gcctgggctg tgcgcctggg agtccctgag gccccgaaa gactga
TIMP2 (PCD) - ACCESSION AF069713
gtagtatca gggccaaagc ggtcagcgag aaggaggtgg actctgggaa cgacatctac ggcaaccca tcaagaggat ccagtatgag atcaagcaga tcaagatgt caaaggcccc gacaaggaca tcaggtcat ctacacagcg ccgtcctcgg ccgtgtgcgg cgtgtccctg gacgtgggag gcaagaagga gtatctcatt gcagggaagg ccgagggcga cggcaggatg cacatcacgc tctgtgact catcgtgcc tgggactccc tgagcagcac gcagaagaag agcctgaacc acaggtacca gatgggctgc gagtgaaga tctgcgcgtg cccatgatcccgctgctaca tctctctcc ggacgagtgc ctctggatgg actgggtcac agagaa

Tabla 9. Primers utilizados en el experimento

4.3.- Metodología

Los fármacos utilizados fueron Tropicamida al 1% (Alcon Cusi), Fenilefrina de Llorens Colirio 10% (Fenilefrina hidrocloreto, Tetracaína), Maxitrol de Alcon Cusi (Dexametasona, Neomicina sulfato, Polimixina B sulfato), Atropina 1%, Alsir-40 (Enrofloxacin, 200mg), Diclofenaco Sódico (Lepori), Flumixin de Schering Plough (meglumine 50mg).

Respecto a las intervenciones quirúrgicas se van a relacionar los distintos protocolos utilizados.



Figura 98. Protocolo pre operatorio

En el Preoperatorio se utilizó Tropicamida 1%: 1 gota 3 veces al día; Fenilefrina 10%: 1 gota 3 veces al día; Maxitrol (Dexametasona, Neomicina sulfato, Polimixina B sulfato): 1 gota 3 veces al día; Alsir-40 (Enrofloxacin): 10mg/kg/24h vía subcutánea. Una de las principales dificultades encontradas durante las primeras cirugías fue debida a la rápida miosis que se producía en el momento de la incisión. Por este motivo fue necesario un cambio del protocolo pre-quirúrgico.

A continuación se exponen ambos: El Primer Protocolo Prequirúrgico consistió en: el día previo se instiló Tropicamida: 1 gota 3 veces al día; Fenilefrina 10%: 1 gota 3 veces al día; Maxitrol: 1 gota 3 veces al día; Enrofloxacin (Alsir): 10mg/kg/24 h vía subcutánea. El día de la intervención se administró Tropicamida: 1 gota por la mañana; Fenilefrina 10%: 1 gota por la mañana; Maxitrol: 1 gota por la mañana y dos horas antes de la cirugía: 1 gota cada 30 minutos de fenilefrina, tropicamida y diclofenaco.



El Segundo Protocolo Prequirúrgico no se modificó el tratamiento del día previo, sin embargo en el día de la intervención se administró el mismo tratamiento pero dos horas antes de la anestesia fue necesario administrar Atropina, 2 aplicaciones cada 30'.

Figura 99. Ojo de experimentación con pupila dilatada

Finalizada la administración de atropina se administran en el orden expuesto y cada 15 minutos hasta el momento de la anestesia los siguientes colirios: Fenilefrina, Homatropina, Cicloplégico.

Para la inducción anestésica, por cada animal y en función de su peso, 20 minutos antes de la intervención, se aplicaron, vía intramuscular, los siguientes fármacos: Ketamidina (Imalgene al 10%): 20 mg/kg, Medetomidina (Domtor): 0,1 mg/kg y Metoxicam (Metecam): 1 mg/kg.

A los cinco minutos de iniciado el proceso, se pasó a aplicar oxígeno mediante mascarilla, para mezclar con el anestésico inhalatorio (PO_2 - Isoflurano) gradualmente.

Este proceso evita la apnea voluntaria del animal al detectar el anestésico. Una vez alcanzada la cantidad requerida, se mantuvo durante toda la intervención una proporción constante de oxígeno y anestésico.



Figura 100. Diferentes fases del trabajo pre-quirúrgico, en anestesia

Mientras se administró el anestésico inhalatorio se aplicaron electrodos para controlar y monitorizar las frecuencias cardíaca y respiratoria del animal durante la intervención. Una vez finalizada la cirugía, se procedió a reducir la concentración de Isoflurano, aumentando la de oxígeno gradualmente, hasta la eliminación del anestésico. Se mantuvo el oxígeno hasta que se observó que el animal comenzaba a realizar los primeros movimientos de forma autónoma y respiraba sin dificultad.



Figura 101. Proceso de facoemulsificación clásica

La técnica quirúrgica empleada fue la Facoemulsificación (Cirugía de Catarata con ultrasonido) que consiste en la extracción del cristalino a través de una pequeña incisión en la córnea por la cual se introduce una sonda de ultrasonido que va fragmentando el cristalino. El instrumento de ultrasonido utilizado fue el Modelo Universal de la Marca Alcon. Los fragmentos se extrajeron aspirándolos con la misma sonda, por el procedimiento habitual en operaciones de esta naturaleza. Posteriormente se introduce la lente intraocular mediante un inyector. La cirugía practicada por veterinarios y residentes de oftalmología de la Facultad de Veterinaria y

Medicina de la Universidad Complutense de Madrid respectivamente. Se utilizaron los quirófanos de la Clínica Veterinaria de la Facultad.



Figura 102. Dependencias del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

Durante 4 días se realizó el siguiente protocolo post-operatorio: Maxitrol: 1 gota 4 veces al día, Diclofenaco colirio: 1 gota 4 veces al día, Enrofloxacin: 10 mg/kg/24h vía subcutánea. Pasados estos cuatro días se reduce la aplicación de los colirios a 3 aplicaciones/día durante el tiempo que fue necesario, entre 8 y 12 días, según la evolución del ojo intervenido. Además, en los casos en los que se observó una alta presión intraocular se instiló 1 gota Alphagan cada 12 horas y, en los casos de edema corneal muy marcado, solución anti-edema, 1 gota tres veces al día.



Figura 103. Escenas post-quirúrgica

Método de Exposición

Se realizaron unas valoraciones en la Ciudad de Murcia, por el Laboratorio de Física Óptica de esa Universidad, para medir la intensidad y la composición espectral de la luz a diferentes horas del día y en días diferentes según la incidencia solar (soleado, nublado, nebuloso, muy luminoso). Estos valores permitieron la obtención de la media de exposición normal de un humano a la radiación solar. También se considero el número de horas y el tipo de iluminación artificial a la que estamos

expuestos los humanos. Con todo ello se calcularon las características de las luces que debían replicar las circunstancias normales de la exposición lumínica de un humano para transferirlas al experimento con los animales seleccionados. El lugar de disposición de las luminarias, la intensidad de ellas, el número de horas de actividad y el resto de las circunstancias necesarias se evaluaron para que existiera una iluminación por superficie iluminada. Todas las medidas se realizaron para luz blanca (compuesta por todas las bandas del espectro “visible”), para luz violeta y azul (correspondiente al 23% de la luz blanca) y a luz exenta de azul (que contiene, naturalmente el 77% restante).

La exposición a luz diseñada para este experimento pretende replicar las condiciones de iluminación habituales, tanto desde el punto de vista de intensidad y composición espectral como de número de horas de exposición, para lo cual se necesita una exposición controlada de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los conejos fueron mantenidos en las condiciones de iluminación que se indican en la siguiente tabla, durante un tiempo medio de 2 años, entre 21 y 26 meses.

	<i>Luz blanca</i>	<i>Luz blanca exenta de azul</i>	<i>Luz azul</i>
Iluminancia (lux)	100%	77%	23%
	3086	2376	710

Tabla 10. Iluminancia de exposición para las diferentes fuentes de iluminación

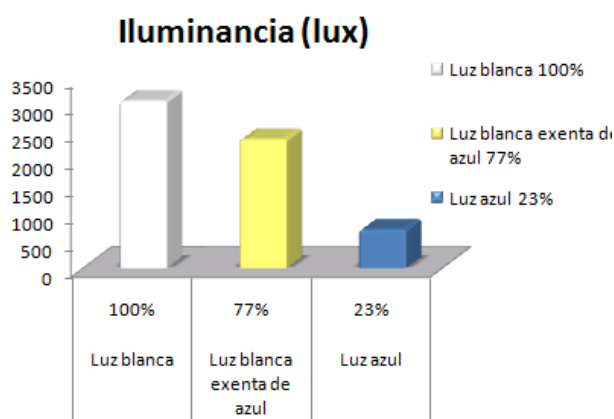


Figura 104 a. Gráfica de la intensidad lumínica, en lux, de cada una de las fuentes de iluminación utilizadas.

Es decir, los animales después de la intervención y de la necesaria convalecencia de una media de 2 meses fueron expuestos o a luz blanca con una iluminancia de 3086 lux o a luz blanca exenta de azul con 2376 lux o a luz violeta y azul con una iluminancia de 710 lux.

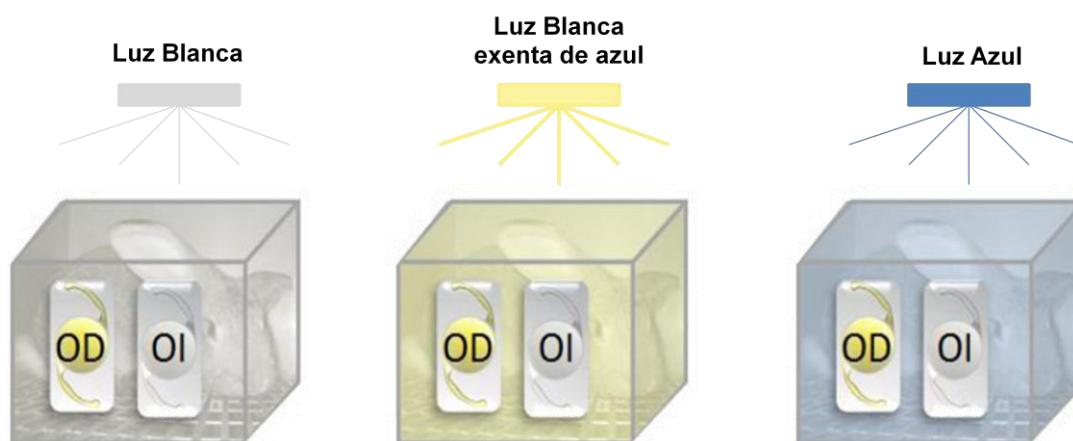


Figura 104 b. Esquema del tipo de iluminación ambiental (amarilla, blanca y azul) y de las lentes intraoculares (transparente en el ojo izquierdo I, y amarilla en el derecho, D) implantadas a los conejos.

Por otro lado, se ha utilizado un grupo control sin ninguna iluminación especial, que vivía con la iluminación habitual del animalario. Transcurrido el tiempo de exposición se procedió a la extracción de los globos oculares y a su fijación en formol al 10% durante un periodo de tiempo superior a un mes.

Cada uno de los ojos fijados fue abierto por el limbo esclero-corneal y se procedió a la extracción de la lente intraocular y el cuerpo vítreo para facilitar la entrada del fijador en el interior del ojo (24 horas). A continuación se dividió el globo ocular en 4 partes siguiendo dirección antero-posterior. Una mitad nasal y otra temporal de la retina fueron incluidas en el estudio sobre el que se basa esta tesis doctoral.

Las partes seleccionadas para la realización del trabajo, se lavaron abundantemente en agua corriente, y se procesaron de forma rutinaria para su inclusión en parafina: deshidratación en etanoles de graduación progresiva, xilol, xilol-parafina blanda, parafina blanda y parafina dura. Los bloques obtenidos fueron cortados a un grosor de 10 μm y las secciones obtenidas montadas sobre portaobjetos tratados con pegamento Aptex® (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma). Sobre estas secciones se procedió a la realización de estudios estructurales (asociados a análisis cuantitativo) y estudios inmunohistoquímica con los anticuerpos y al análisis génico.

4.3.1.- Método de Análisis Estructural de la Retina

Estudio estructural: técnica de la hematoxilina-eosina.- La estructura general de la retina se estudió en secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Para ello se realizó el siguiente protocolo: Desparafinado en estufa durante 30 minutos a 60° y baño en xilol durante 10 o 15 min. A continuación se procedió a la hidratación, sumergiendo la muestra en alcohol absoluto durante 5 minutos, alcohol 96° durante 5 minutos y alcohol 70° durante 5 minutos. Se lavó en agua destilada y se realizó la tinción con Hematoxilina durante 5 minutos. Se lavó con agua destilada durante 2 minutos y se realizó la tinción con Eosina alcohólica durante 1 minuto. A continuación se procedió a la deshidratación con baños sucesivos en alcohol de 70°, alcohol de 96°, alcohol absoluto, Xilol. Posteriormente se realizó el montaje analizando 10 secciones por pieza y animal, separadas 100 µm entre ellas.

Análisis cuantitativo.- Sobre las secciones histológicas procesadas mediante la técnica de la hematoxilina-eosina se procedió a la realización de un estudio cuantitativo en el que se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) densidad de núcleos en la capa granular externa, utilizado como método indirecto para cuantificar la densidad de conos y bastones;
- b) densidad de núcleos en la granular interna, utilizado como método para valorar, sobre todo, la densidad de neuronas bipolares;
- c) densidad de neuronas ganglionares.

El estudio se realizó sobre 20 campos por sección, en 10 secciones por animal (5 nasales y 5 temporales), utilizando un objetivo 40x acoplado a un sistema de análisis de imágenes (Quantimed 500; Servicio de Análisis de Imágenes, Universidad de Oviedo). El observador desconocía la muestra que estaba estudiando.

Técnica de TUNEL para la detección de la muerte celular por apoptosis.- Para detectar la presencia de células apoptóticas en la retina se procedió de la siguiente manera: secciones desparafinadas y rehidratadas se lavaron con PBS (Phosphate-Buffered Saline) al 0.1 M, pH 7.5. A continuación las secciones se procesaron utilizando el Kit POD de detección de muerte celular *in situ* (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN, USA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las secciones de control positivo fueron tratadas con DNAase, 0,1 U/ut a temperatura ambiente.

El número de perfiles nucleares TUNEL-positivos fue evaluado en 20 campos por sección, en 10 secciones por animal (5 nasales y 5 temporales), utilizando un objetivo 40x acoplado a un sistema de análisis de imágenes (Quantimed 500; Servicio de Análisis de Imágenes, Universidad de Oviedo). Los datos se expresan como valores de la media \pm S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA y se consideraron como significativos valores de $p < 0.05$.

Detección de la apoptosis por ensayo de la caspasa-3.- La actividad caspasa-3 se midió mediante el kit caspasa-3 BD Apoalert (BD Bioscience Clontech, La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones de uso facilitadas por el fabricante. Se utilizaron homogenizados de retina, incubados en tripsina y tampón de lisis. El pellet se centrifugó durante 10 minutos a 4°C. Cada muestra se dividió en tres partes, de las cuales una se incubó con inhibidor de caspasa 3 DEVD-CHO durante 30 minutos y se utilizó como control negativo; estas muestras fueron posteriormente incubadas con un tampón de reacción 50ul de 2x que contiene sustrato de caspasa-3 DEVD-AFC 10 mM DTT y 50mM, a una temperatura de 37°C durante 1 hora. En otra muestra no se inhibió la actividad caspasa, y en la tercera no se añadió a la incubación el sustrato de la enzima. Las muestras se analizaron con un fluorómetro a una excitación de 400nm y filtros emisores 505nm.

Estudio inmunohistoquímico.- La técnica general utilizada para el estudio inmunohistoquímico se basa en la peroxidasa-antiperoxidasa indirecta y se realizó siguiendo el protocolo del test de detección EnVision antibody complex kit (Dako, Copenhagen, Denmark). El tampón de lavado utilizado durante toda la experimentación fue TBST (0.05M Tris, 0.3M NaCl que contiene Tween 20 al 0,1%, pH 7.5) y todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, si no se especifica lo contrario. Tras 5 minutos de incubación con el reactivo bloqueante de la peroxidasa, las secciones se lavaron y se previno la formación de uniones no-específicas incubando las secciones durante 30 minutos con suero albúmina sérica bovina al 1% (BSA) en TBS que contiene Tween 20 al 0.05%. A continuación se incubaron las secciones con los anticuerpos primarios, a diluciones previamente establecidas, durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron las secciones y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente ligado a peroxidasa (o aun fluorógeno) conjugado con polímero durante otros 30 minutos. Finalmente, después de 2 lavados de 5 minutos se visualice

la reacción final con una solución de diaminobencidina. En los casos en que el anticuerpo secundario estaba ligado a un fluorógeno se observaron directamente en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros correspondientes.

Los controles negativos se realizaron por exclusión del anticuerpo primario en la incubación o sustituyendo el anticuerpo primario por suero preinmune de conejo o de ratón. En ambos casos no se detectó inmunorreacción específica, pero sí un ligero marcaje inespecífico debido a la especie-especificidad de algunos de los anticuerpos utilizados.

Los anticuerpos fueron utilizados para marcar los siguientes tipos celulares:

- 1.- anti-PGP 9.5: es un marcador específico de las neuronas y de algunas poblaciones de células endocrinas. En el presente estudio se ha utilizado para marcar las neuronas bipolares y ganglionares.
- 2.- anti-NFPp: las proteínas de los neurofilamentos se encuentran de forma específica en los somas neuronales y en sus prolongaciones. El anticuerpo utilizado en este trabajo está dirigido contra la subunidad de 200 kDa de los neurofilamentos que se localiza principalmente en los axones. Ha sido utilizado para poner en evidencias las plexiformes interna y externa, así como axones del fascículo óptico.
- 3.- anti-MAC: se ha utilizado un clon (MAC387) para detectar macrófagos activos en la retina, especialmente en la zona del epitelio pigmentario.
- 4.- anti-GFAP: marca el filamento intermedio propio de las células gliales (proteína glifibrilar ácida) y se ha utilizado para evidenciar la posible reacción glial subsecuente a la exposición a la luz.
- 5.- anti-CP3: para detectar mediante inmunohistoquímica la actividad caspasa-3. Se ha realizado este test para confirmar los resultados del ensayo de caspasa-3 (ya que el tejido utilizado estaba fijado).
- 6.- anti-CR, anti-S100, anti-CB D28k y anti-PV: se trata de cuatro proteínas ligantes del calcio.
- 7.- anti-Trk-A, anti-Trk-B y anti-Trk-C: para marcar los receptores de las neurotrofinas de la familia de factor de crecimiento nervioso, ya que pueden estar implicados tanto en los procesos degenerativos como regenerativos.
- 8.- anti-opsin: como marcador específico de los bastones
- 9.- anti-RPE 65: como marcador específico de los conos
- 10.- anti-Bcl2
- 11.- Otros (expuestos en la tabla correspondiente)

4.3.2.- Método de Análisis de Expresión Génica

Las hemirretinas de los ojos de los animales sometidos a la misma iluminación ambiental se procesaron conjuntamente. El mRNA total se extrajo de las retinas de los diferentes grupos experimentales utilizando el TRI reagent (Sigma; St. Louis, MO) y la integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. El RNA extraído se procesó para transcripción inversa en un volumen final de 20µl usando 20U de Superscript RNA-ase H- Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) en el tampón facilitado por la casa comercial, que contiene 2µg de RNA, 5µM de oligo (dT) 12-18, mM dNTPS, 40U de inhibidor de RNA-ase (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), 0.1µg/µl de BSA y 10mM de DTT. La reacción se desarrolló a 42° C durante 90 minutos. Las secuencias de los oligonucleótidos primers utilizados se basan en las secuencias publicadas para el ratón (GenBank accesión).

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: 2U de Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 1 µM de los primers, 10 ng de cDNA de retina de conejo, 0,2 mM cada uno dNTP en 15µl de Taq DNA Polymerase buffer. La reacción se realizó en un ciclador (Hyband Th. Cycler) con el siguiente programa: 1 minuto a 94 °C para la desnaturalización inicial, seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, seguido de 20 ciclos de 1 minuto a 94°C, 61°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto final de la PCR se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta seguido de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los productos se cuantificaron en un PhosphorImager (Fuji).

Estos análisis se realizaron bajo la dirección del Profesor Vega Álvarez, Catedrático de Embriología y Anatomía de la Universidad de Oviedo, eminente experto en este tipo de metodología.

El análisis estadístico de los resultados fue supervisado, en diferentes fases, por la Universidad de Oviedo y por la Universidad Complutense de Madrid. Se aplicaron los análisis estadísticos útiles en este tipo de estudio mediante el programa informático SPSS, en diferentes versiones según el centro.

5.- Resultados

5.1.- Análisis estructural de la retina

Estructura de la retina.- La estructura de la retina en los diferentes grupos de animales experimentales permite observar las diferentes capas que la constituyen. En ningún caso pudo observarse con claridad el epitelio pigmentario. No se observaron diferencias aparentes en los segmentos de la retina analizados.

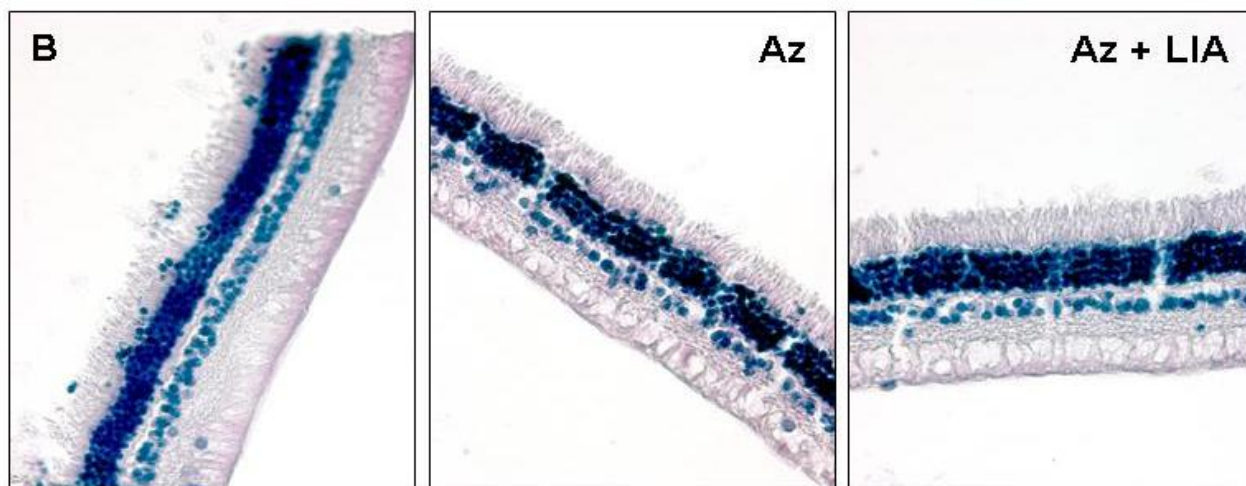


Figura 105. Secciones de retina de conejo expuesto a luz blanca (izquierda), azul (centro) y a luz azul con una lente intraocular amarilla (derecha)

Estudio cuantitativo.- El análisis cuantitativo se llevo a cabo siguiendo la metodología comentada en el apartado de Material y Técnicas. Los resultados del análisis cuantitativo expresan la media de los campos estudiados y de forma separada, a nivel de las diferentes estructuras retinianas:

Capas nucleares interna y externa

Los núcleos de la **capa nuclear externa** corresponden, casi en su totalidad a los **fotorreceptores**, y en nuestro estudio las variaciones cuantitativas en ella se consideraran como evidencia de cambios en el número de dichas células.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio se refiere a la cuantificación del número de núcleos en las capas retinianas. Se analizó pormenorizadamente las consecuencias de la exposición a diferentes tipos de luz (tal y como se ha comentado en metodología) con ausencia o presencia de implante de lente intraocular, transparente o amarilla en según qué caso.

Los animales control expuestos a luz blanca, son los que mantienen el mayor número de núcleos de fotorreceptores, concretamente 470 núcleos (figura 106a) Si se compara con las retinas expuestas a luz azul se cuantifican hasta 325 núcleos de células supervivientes, lo que significa una supervivencia al 25% de núcleos celulares perdidos por la exposición a longitudes de onda corta. Sin embargo, en los animales expuestos a luz exenta de azul, el número de células que sobrevive a la exposición ha sido de 400, representando por tanto una disminución de los núcleos celulares en torno al 10%.

Este hecho indica, tal y como se ratifica en posteriores epígrafes, que las longitudes de onda corta producen mayor pérdida de fotorreceptores que si esta radiación deja de ser emitida o es eliminada mediante filtros ópticos interpuestos, el proceso se ve paralizado y las pérdidas de núcleos disminuyen.

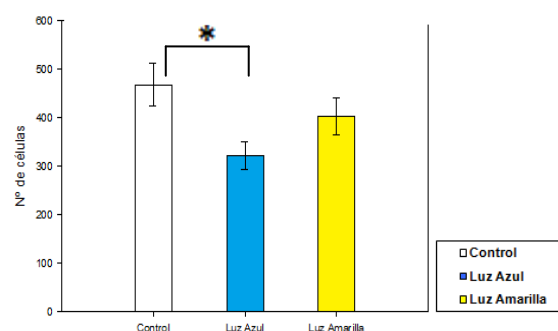


Figura 106a. Resultados del análisis cuantitativo en la capa nuclear externa

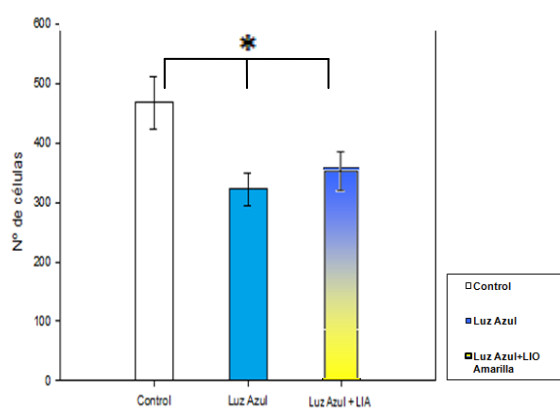


Figura 106b. Resultados del análisis cuantitativo en la capa nuclear externa

En la figura 106b se representa el número de núcleos sobrevivientes después de la exposición a luz azul y luz exenta de azul comparado con animales expuestos a luz blanca. En la figura también se demuestra que la pérdida de núcleos es inferior cuando la luz azul es eliminada en parte por una lente intraocular amarilla. Los datos concretos son de 470 células sobrevivientes con en expuestos a luz blanca, 325 con luz

azul, tal y como se ha dicho en la gráfica anterior, pero en este caso se comprueba que en los animales con implante de lente intraocular amarilla y expuestos a luz azul, la supervivencia aumenta hasta 360 células, lo que supone un 10% de beneficio.

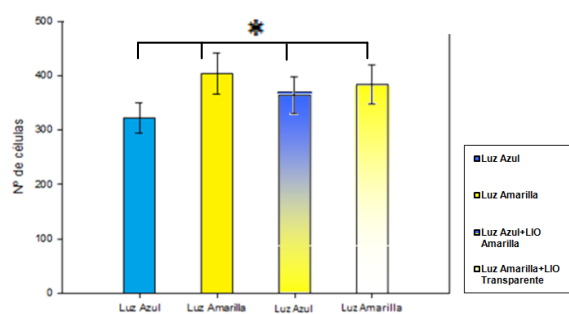


Figura 106c. Resultados del análisis cuantitativo en la capa nuclear externa

Con estos resultados se demuestra la evidente acción nociva de las longitudes de onda corta del espectro de luz “visible” en los fotorreceptores. Además, como se puede comprobar en los datos presentados la interposición de filtros ópticos de absorbancia selectiva que eliminan en parte las longitudes de onda corta, ya sea mediante el filtro implantado en el interior del ojo, o ya sea mediante un dispositivo filtrante en el exterior de la fuente de luz. (Los resultados anteriores expresan los valores medios obtenidos del análisis estadístico).

Por lo que se refiere a la **capa nuclear interna**, las células predominantes son las neuronas bipolares, pero en ella también se encuentran **células horizontales**, **células de Müller** y **células amacrinas**. La densidad de los núcleos de esta capa tiene una evolución paralela a la de la nuclear externa.

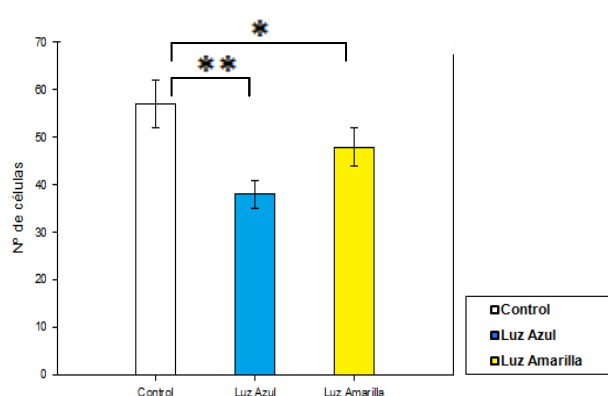


Figura 107a. Resultados del análisis cuantitativo en la capa nuclear interna

En esta figura se añade, respecto a la anterior, los resultados obtenidos cuando el implante es lente transparente y el filtrado de las longitudes de onda corta se realiza en la propia fuente de luz. En este caso, el número de núcleos celulares supervivientes es de 385 unidades.

Respecto a los resultados concretos, el número de células cuantificadas en las retinas expuestas a luz blanca fue de 57. Este dato disminuyó hasta 38 cuando la exposición fue exclusivamente a luz azul. Es decir, la pérdida de la densidad nuclear de la capa nuclear interna, producida por la exposición a luz azul ha sido del 21%.

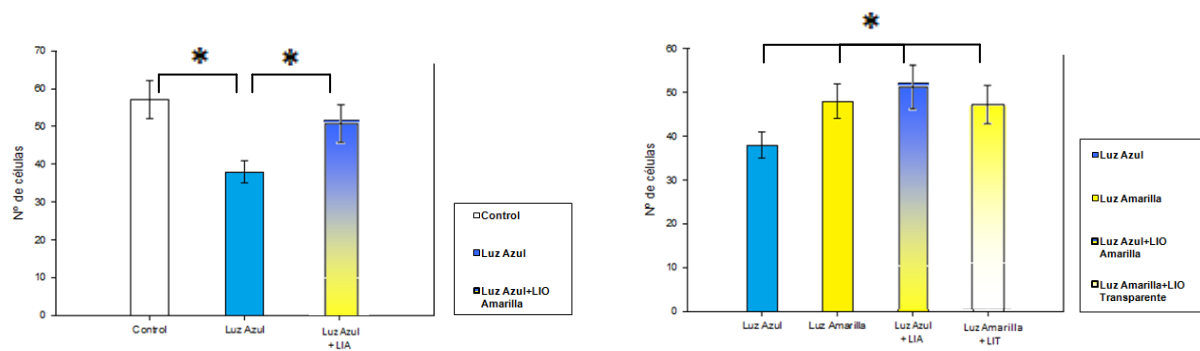


Figura 107 b y c. Resultados del análisis cuantitativo en la capa nuclear interna

El filtrado de la luz de longitudes de onda corta, mediante lente de contacto amarilla (figura 107b) o mediante filtrado de la fuente de iluminación (figura 107c) permiten una densidad celular de 53 neuronas en el primer caso y de 49 neuronas en el segundo caso. En ambos casos, una mejora entre el 18 y el 25%. (Los resultados anteriores expresan los valores medios obtenidos del análisis estadístico).

Análisis de la muerte celular determinada por la luz.- En base a los datos del estudio cuantitativo, es evidente que la exposición a la luz, especialmente a la luz azul, determina la pérdida de un porcentaje variable de células de la retina. Además, presumiblemente la muerte celular se produce por apoptosis.

Los resultados obtenidos con la técnica de ensayo de la caspasa-3 no mostraron ninguna diferencia entre los grupos de animales estudiados. Ello es posiblemente debido al hecho de que las muestras de tejido utilizadas estaban previamente fijadas y la actividad detectada es, por tanto, un artefacto.

Sin embargo, en las preparaciones procesadas para la detección del DNA fragmentado, considerado como una evidencia indirecta de muerte celular por apoptosis, el efecto fototóxico de la luz fue evidente, especialmente a nivel de la **capa nuclear externa**.

En las retinas de los animales sometidos a luz blanca existe un pequeño número de células TUNEL-positivas, que se incrementa de manera muy significativa en los animales sometidos a luz azul. En el resto de los grupos experimentales, si bien se produce un aumento del número de perfiles nucleares TUNEL-positivos, los valores son muy próximos a los normales.

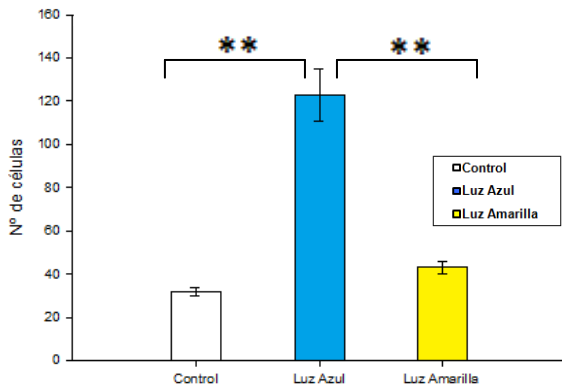


Figura 108 a. Número de perfiles de núcleos TUNEL-positivos en la capa nuclear externa

En la figura 108a se muestra con claridad que el número de perfiles de núcleos TUNEL-positivo, cuando los animales fueron expuestos a luz azul, fue de 120 perfiles, los expuestos a luz blanca fue de 30 perfiles, y por último, en los animales expuestos a luz exenta de azul el número de perfiles disminuyó hasta 41 perfiles de núcleos. Es decir, una disminución debida a la eliminación de la luz azul superior al 60%.

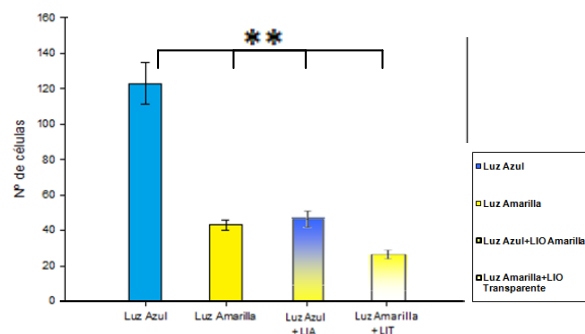
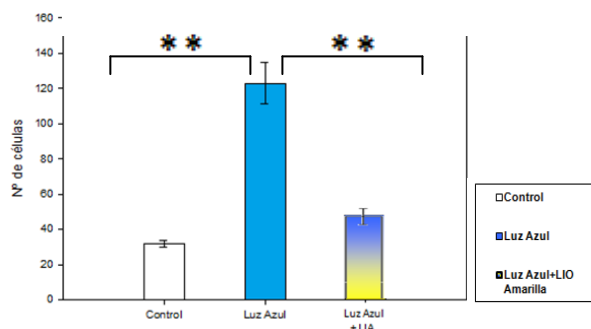


Figura 108 b y c. Número de perfiles de núcleos TUNEL-positivos en la capa nuclear externa

En el análisis de los perfiles de núcleos TUNEL-positivos los resultados muestran la misma tendencia que en el resto de los resultados. Cuando la exposición a luz azul es neutralizada por la absorción a esas longitudes de onda, ya sea en el interior del ojo con lente intraocular amarilla o en el exterior de la jaula mediante dispositivos de filtrado, la muerte por apoptosis disminuye hasta un 60%. Este dato se ve reforzado con los estudios de los ojos con implante de lente intraocular transparente y exposición exenta de luz azul, donde los perfiles de núcleos TUNEL-positivos disminuyen hasta 25 unidades, lo que supone una mejoría del 80%.

En la capa nuclear interna sólo se encuentran núcleos TUNEL-positivos en un número muy bajo de células y éste no se modifica significativamente en ninguna de las situaciones experimentales analizadas (datos no mostrados). (Los resultados anteriores expresan los valores medios obtenidos del análisis estadístico).

Otro de los indicadores utilizados para la determinación de la muerte celular por apoptosis fue la **localización inmunohistoquímica de la caspasa-3**. El patrón de distribución de la enzima es citoplasmático y se localiza principalmente en la capa de

los fotorreceptores. Aparentemente, no se observan variaciones en el nivel de expresión inducidas por las situaciones experimentales.

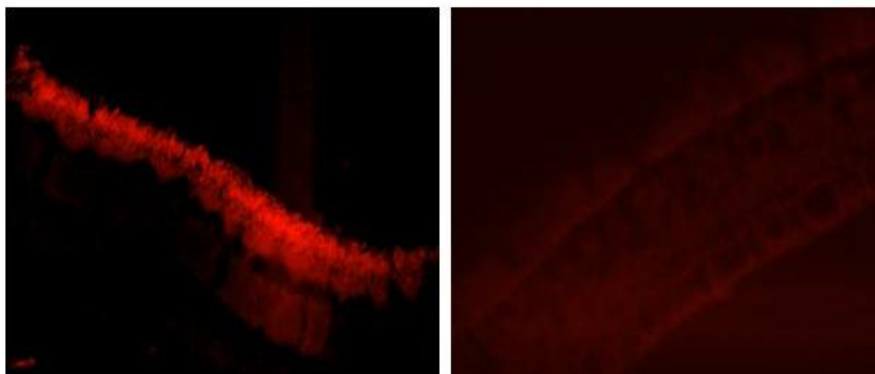


Figura 109.
Detección
inmunohistoquímica del
Bcl-2 en la retina de
conejos cometidos a luz
blanca (izquierda) y a luz
azul (derecha)

Otras técnicas realizadas para confirmar los resultados anteriores y estrechamente relacionadas con los mecanismos celulares de la muerte-vida celular se encuentran los productos de los genes de la familia Bcl-2. En condiciones de normalidad los receptores expresan inmunorreacción para Bcl-2. En las exposiciones a luz azul se produce una marcada disminución en la inmunorreacción para el Bcl-2, que es revertida parcialmente, sin llegar a los valores propios de los controles en los animales portadores de lentes amarillas intraoculares; las lentes transparentes no tuvieron ningún efecto en la prevención de la disminución de inmunorreacción.

Por tanto, puede concluirse que la exposición circadiana a luz, especialmente a la luz de longitud de onda corta, produce fragmentación del ADN (reacción de TUNEL) en algunos fotorreceptores y en menor medida otras células de la retina, que presumiblemente les lleva a un proceso de muerte celular por apoptosis. En las vías intracelulares implicadas en el proceso se encontrarían implicados los productos de la familia Bcl-2; los resultados no son concluyentes respecto a la participación de la caspasa-3. Por otro lado, todos los procesos relacionados con la muerte celular se ven atenuados por la implantación de lentes intraoculares amarillas.

Para profundizar en el estudio de la pérdida de fotorreceptores se analiza el efecto de la luz azul en los cambios en la expresión de las proteínas marcadoras de conos (RPE 65) y bastones (opsina). Una vez establecido, en los epígrafes anteriores, que la exposición a la luz induce pérdida celular, posiblemente causada por muerte celular por apoptosis, el paso siguiente fue determinar qué población de fotorreceptores se encuentra más afectada, o si las dos poblaciones se modifican por igual.

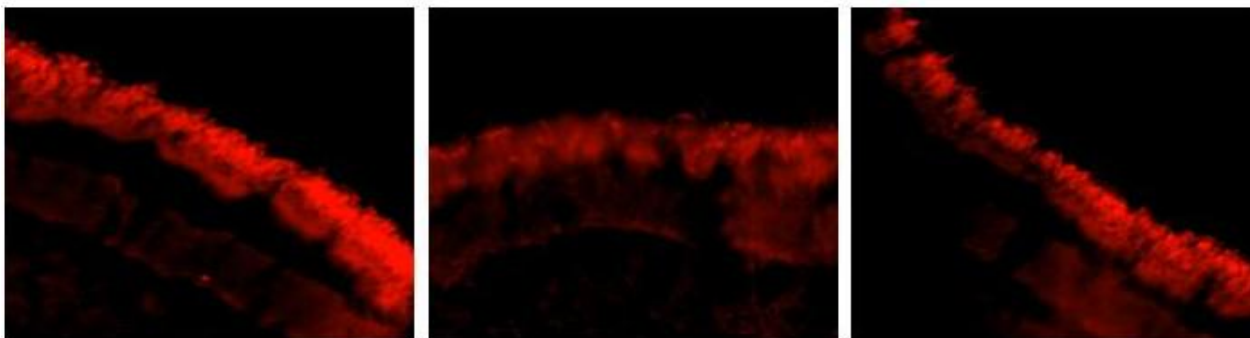


Figura 110. Localización inmunohistoquímica de la opsina para bastones en la retina de conejos cometidos a luz blanca (izquierda) y a luz azul (centro) y a luz azul y portadores de una lente intraocular amarilla (derecha)

Los resultados en este apartado han sido particularmente complejos ya que la inmunorreacción para la opsina ha sido más sensible a la exposición a unos tipos de luz que a otros. En todos los casos se produce una reducción de la expresión de la opsina, pero ésta es particularmente marcada en las exposiciones a la luz azul.

Por otro lado, las lentes amarillas intraoculares son capaces de prevenir parcialmente la pérdida de expresión de inmunorreacción a la opsina, pero nunca se alcanzan los niveles propios de los animales expuestos a luz blanca.

Sorprendentemente la expresión de la proteína REP 65 no sufre ninguna variación en ninguna de las situaciones experimentales creadas.

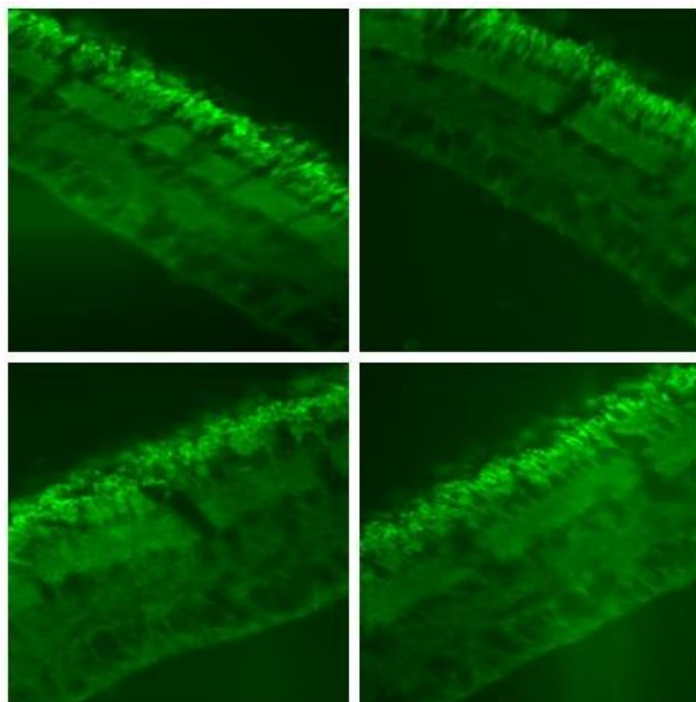


Figura 111. Localización inmunohistoquímica de la proteína REP 65 (conos) para bastones en la retina de conejos sometidos a luz blanca (superior izquierda), luz azul (superior derecha), luz amarilla (inferior izquierda) y luz azul y portadores de una lente intraocular amarilla (inferior derecha).

En términos generales, resulta que la exposición a los diferentes tipos de luz produce una reducción en la expresión de opsina, pero no de RPE 65, es decir afecta más a los bastones que a los conos. Se vuelve a ratificar que las longitudes de onda corta del espectro luminoso son las más lesivas para los fotorreceptores y su efecto puede ser contrastado parcialmente por la supresión de las longitudes de onda corta.

Por otro lado, y con el fin de analizar si las neuronas bipolares y ganglionares sufren alguna modificación se ha estudiado la expresión de la proteína PGP 9.5 y de la subunidad mayor de los neurofilamentos fosforilados. La primera para marcar los somas neuronales y la segunda las **plexiformes interna y externa**. En el estudio cuantitativo ya se ha detectado despoblación celular en la capa nuclear interna que debe de implicar a las neuronas bipolares y probablemente a otros tipos celulares.

La proteína PGP 9.5 marca una subpoblación celular situada en la nuclear interna, pero no a todas las células situadas en ella. Por otro lado, el número de celular marcadas no sufrió ninguna variación significativa en ninguna de las situaciones experimentales creadas.

Por lo que se refiere al estudio de las neuronas ganglionares, se marcó una subpoblación, y el número de células PGP 9.5 positivas fue menor (en torno al 20%) en los animales sometidos a iluminación con luz azul que en el resto de los grupos experimentales.

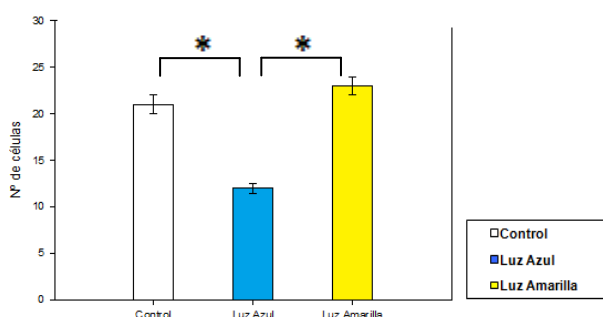


Figura 112 a. Densidad de células PGP positivas en el estrato de las células ganglionares

El número de neuronas ganglionares existentes tras la exposición a luz azul fue de 12 unidades, sin embargo cuando se eliminó de la fuente de luz las longitudes de onda corta, las neuronas contabilizadas fueron de 23 unidades, lo que supone un 50% de supervivencia, al eliminar la luz nociva. (Los resultados anteriores expresan los valores medios obtenidos del análisis estadístico).

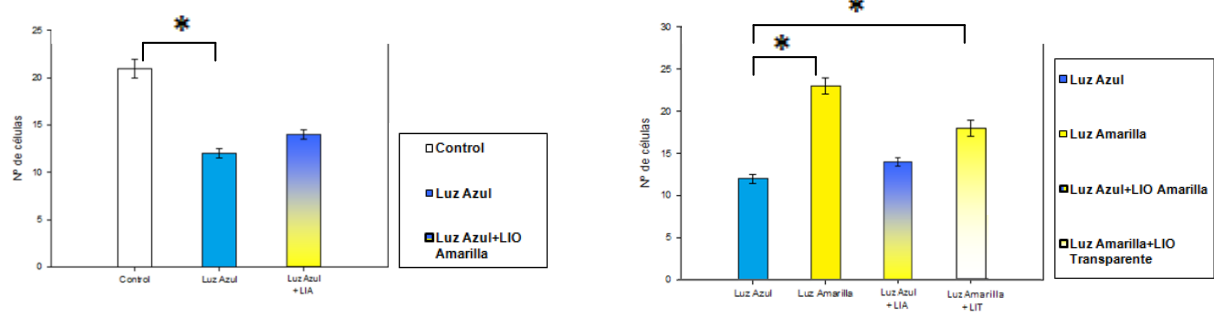


Figura 112 b y c. Densidad de células PGP positivas en el estrato de las células ganglionares

De la misma manera que ha ocurrido en el resto de los análisis estructurales de la retina, en las figuras 112 b y c, se observa como la densidad de células ganglionares cuando se elimina la luz azul, aumenta de forma importante. En este caso se duplica o triplica la densidad de células ganglionares, según sea el filtrado con lente intraocular amarilla o con dispositivo en la propia fuente de luz, respectivamente.

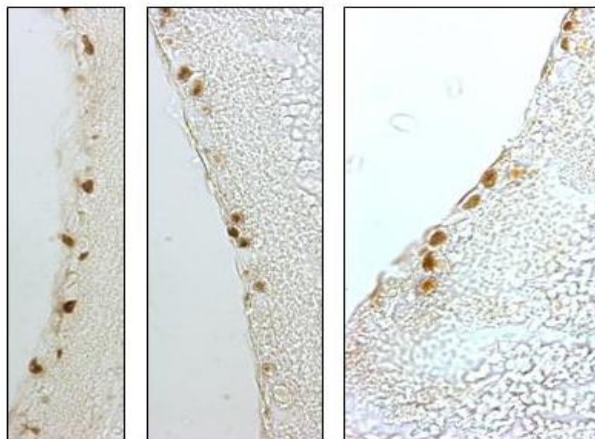


Figura 113. Detección inmunohistoquímica de la PGP 9.5 en una subpoblación de neuronas ganglionares de animales sometidos a luz blanca (izquierda), a luz azul (centro) y a luz con una lente intraocular (derecha)

A diferencia de lo que sucede con las neuronas, los axones de las capas plexiformes interna y externa, marcados con un anticuerpo contra la subunidad mayor de los neurofilamentos, muestran diferencias de densidad en los distintos grupos experimentales. En los animales sometidos a iluminación luz azul hay una disminución en el marcaje de la plexiforme interna y ausencia de marcaje en la externa; en el caso de la iluminación amarilla la situación fue muy semejante a la de los animales expuestos a luz blanca. Por otro lado la implantación de lentes amarillas intraoculares no modificó el patrón de distribución de la inmunorreacción en los animales sometidos a luz amarilla, pero mejoró notablemente el de los animales con lentes intraoculares amarillos expuestos a luz azul.



Figura 114. Detección inmunohistoquímica de la subunidad fosforilada de 200 kDa de los neurofilamentos en la retina de conejos expuestos a luz blanca (izquierda), a luz azul (centro) y a luz azul con una lente intraocular amarilla (derecha).

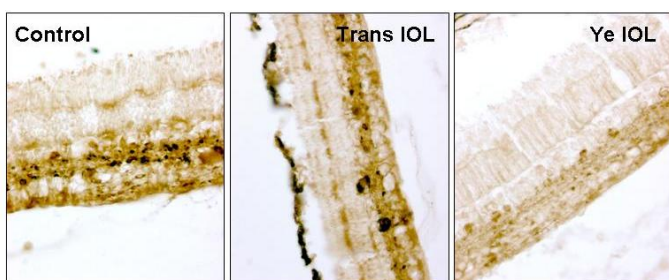


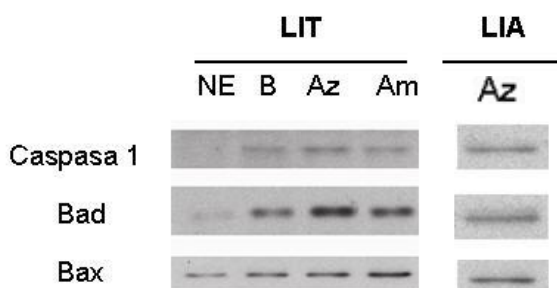
Figura 115. Detección inmunohistoquímica de la calretinina en la retina de conejos expuestos a luz blanca (izquierda), a luz azul (centro) y a luz azul con una lente intraocular amarilla (derecha).

En cuanto a la posible reacción de las células gliales a la exposición a la luz, los resultados del estudio inmunohistoquímico fueron siempre negativos.

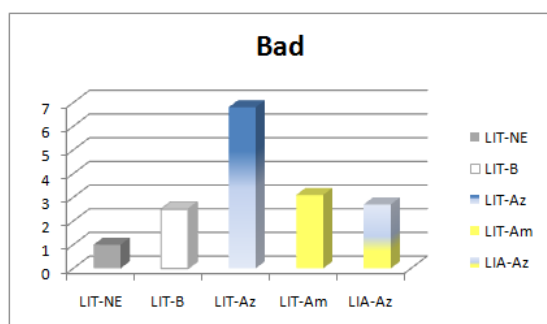
Alteraciones en la homeostasis del Ca^{++} mediadas por las proteínas ligantes del calcio pueden estar implicadas en la fototoxicidad.- En esta tesis se ha investigado la distribución de la proteína S100, la calbindina D28k, la calretinina y la parvalbumina. El patrón de distribución de estas proteínas es muy complejo. Algunas de ellas se localizan preferentemente en las neuronas y capas plexiformes mientras que otras (neurocalcina y proteína S100) están presentes preferentemente en los fotorreceptores. Los datos preliminares sugieren que la exposición a la luz produce disminución en la expresión de todas las proteínas ligantes del Ca^{++} investigadas y que este efecto no es revertido por el filtrado de la luz.

5.2.- Análisis de la expresión génica

Expresión de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos

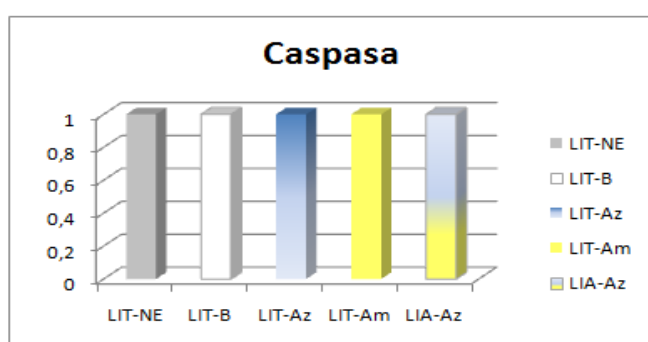


La exposición a diferentes tipos de luz, en ciclos circadianos, durante largos periodos de tiempo, no modula básicamente la expresión de los genes relacionados con los procesos de muerte celular por apoptosis.



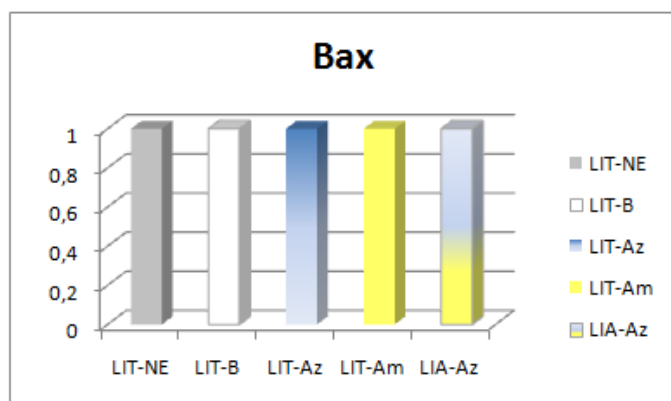
En cuanto a Bad (pro-apoptótico), la exposición continua a luz blanca aumenta su expresión 2.5 veces, a luz azul 6.8 veces y a luz amarilla 3.1 veces. Las lentes intraoculares son capaces de llevar la expresión del gen a niveles próximos a los de la luz blanca.

Figura 116 a y b. Expresión del gen Bad en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.



Los niveles de expresión de la caspasa-1 no se modifican en ninguno de los grupos experimentales ni se modifican por la implantación de lentes amarillas intraoculares.

Figura 116 c. Expresión del gen de la caspasa-1 en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.



Por su parte el gen Bax (pro-apoptótico) no sufre ninguna variación en las condiciones experimentales analizadas.

Figura 116 d. Expresión del gen Bax en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla

De estos datos se desprende que en los mecanismos de muerte celular por apoptosis inducidos por la exposición a luz a largo plazo en ciclo circadiano, la vía principal de señalización incluye a Bad.

En cuanto a los genes antiapoptóticos nuestros resultados demuestran que no se producen cambios en la expresión de Bcl-2 en ninguna de las situaciones experimentales creadas, mientras que los niveles de Bcl-XL (anti-apoptótico) están incrementados en los animales con una lente intraocular amarilla implantada.

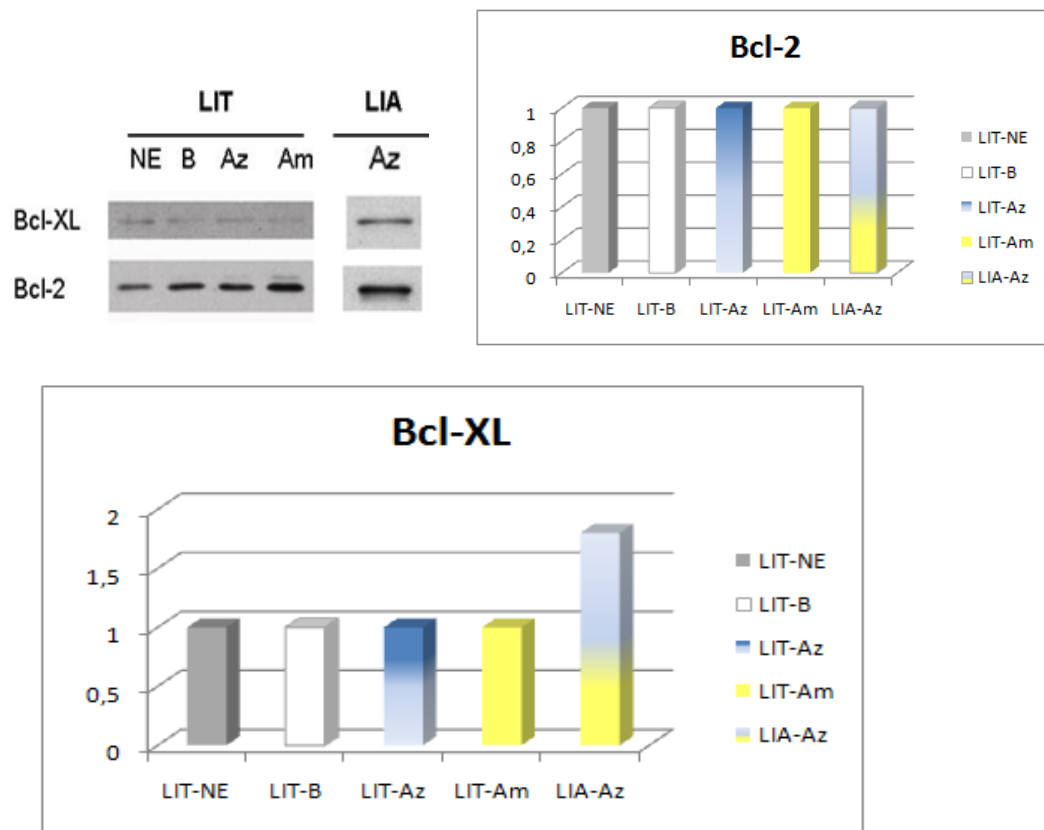


Figura 117 a, b y c. Expresión de los genes. Bcl_XL y Bcl-2 en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla

En los animales de experimentación utilizados, la expresión de c-Fos se incrementa 3.3 veces en los animales expuestos a luz azul y 2.7 veces en los animales a luz blanca exenta de azul; sin embargo los niveles de expresión se reducen a 1.6 veces en los animales portadores de una lente intraocular amarilla.

Por lo que respecta a la expresión de d-Jun, su expresión no se ve modificada por los diferentes tipos luz, pero sin embargo está muy disminuida (- 2.2 veces) en los animales con la lente intraocular amarilla.

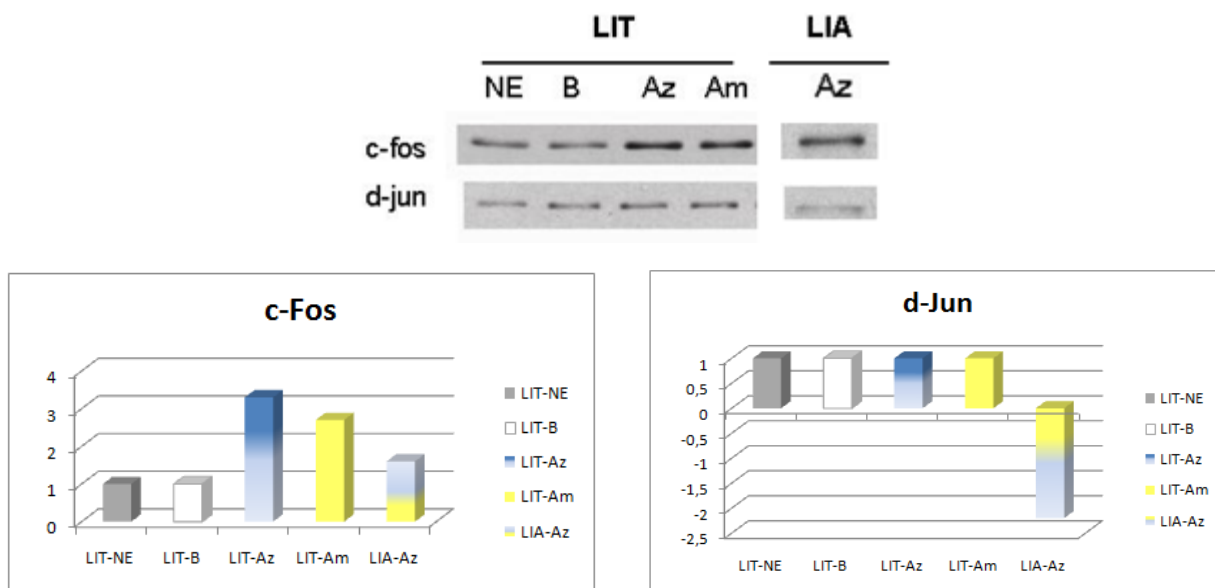


Figura 118 a, b y c. Expresión de los genes c-Fos y d-Jun en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca exenta de azul. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.

Expresión de genes relacionados con las proteínas ligantes del Ca^{2+}

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la expresión de la calbindina no se modifica como consecuencia de la exposición a la luz ni por la implantación de lentes intraoculares amarillas; la proteína S100a6 se mantiene a niveles basales sin modificaciones en ninguna de las situaciones experimentales creadas.

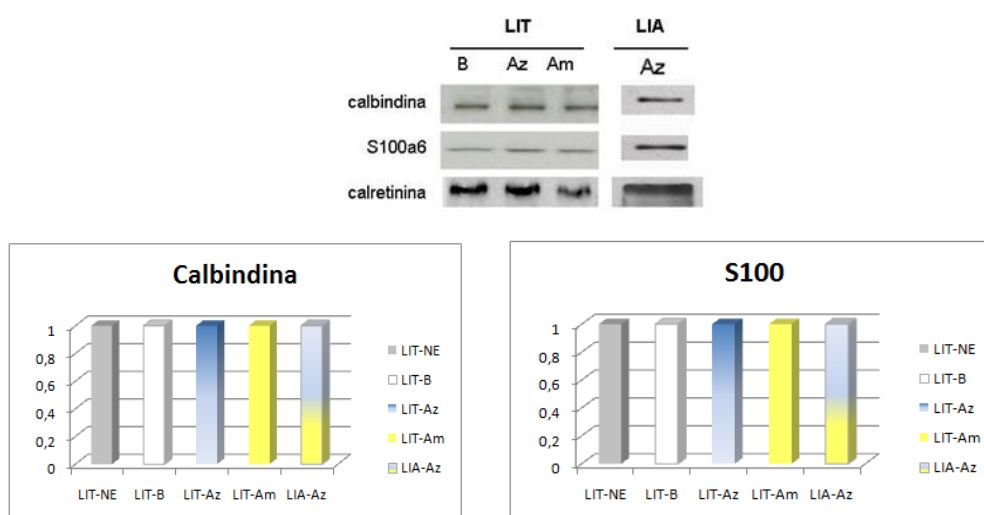


Figura 119 a, b, c. Expresión de los genes calbindina, S100a6 en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.

Finalmente, la calretinina tiene unos niveles de expresión inferiores en los animales sometidos a luz blanca exenta de azul (-1,3 veces) y en los animales portadores de una lente intraocular amarilla.

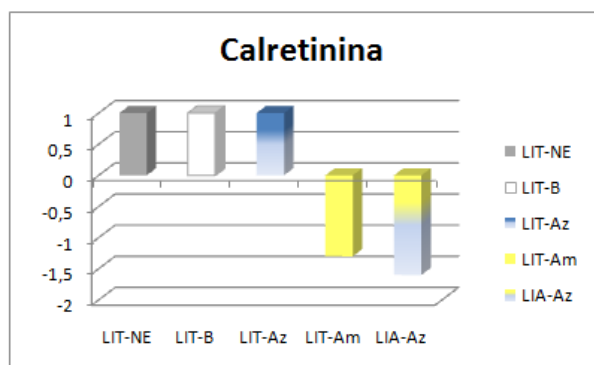


Figura 119 d. Expresión del gen de la calretinina en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.

La hipótesis del calcio en los mecanismos degenerativos celulares, especialmente en las neuronas, es muy atractiva, pero dada la complejidad de los mecanismos reguladores los datos disponibles no permiten conclusiones en ningún sentido.

Expresión del gen para el receptor de neurotrofinas Trk-B

En este estudio se ha observado que la exposición a la luz a largo plazo regula al alza la expresión de Trk-B 1,8 veces la luz blanca, 2,3 la luz azul, 3,9 la luz amarilla; en los animales portadores de una lente intraocular el incremento en la expresión de Trk-B fue de 4.2 veces respecto a los valores basales.

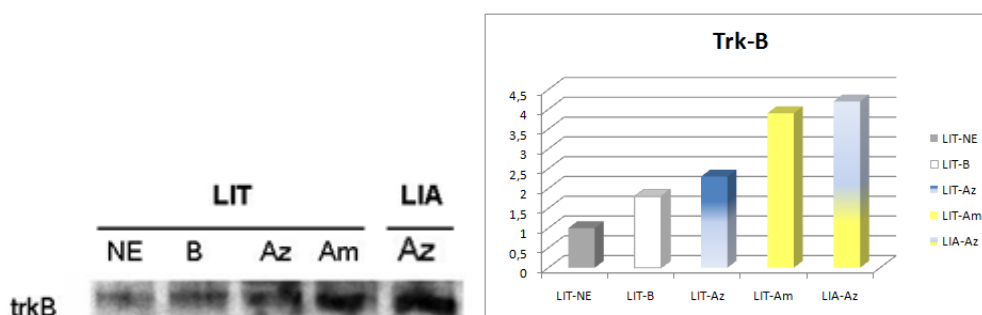


Figura 120 a y b. Expresión del gen Trk-B en la retina de conejos expuestos a iluminación permanente durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca exenta de azul. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla

Expresión de genes relacionados con las algunas metaloproteasas

Los resultados de este trabajo indican que la luz, o la implantación intraocular de una lente amarilla, no modifican la expresión de MMP-2.

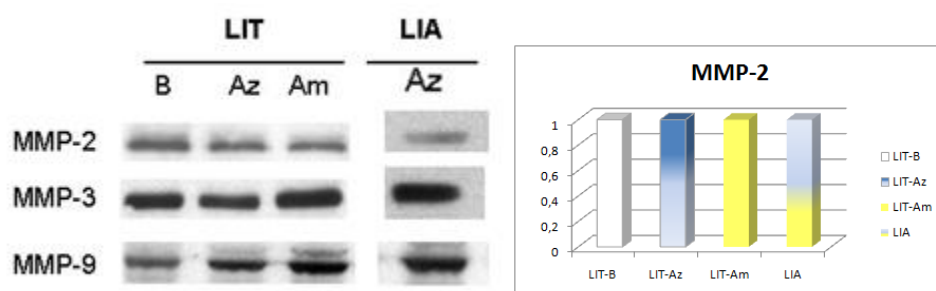


Figura 121 a y b. Expresión de los genes MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla

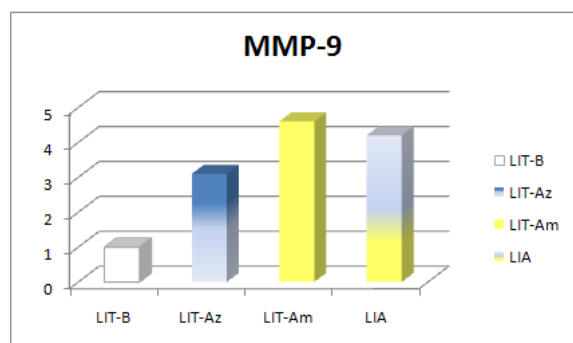
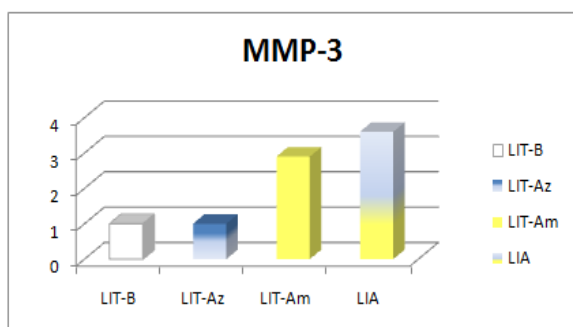


Figura 121 c y d. Expresión de los genes MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en la retina de conejos expuestos a iluminación durante 2 años. NE: no expuestos; B: luz blanca; Az: luz azul; Am: luz blanca sin la parte azul del espectro. LIT: lente intraocular transparente; LIA: lente intraocular amarilla.

Expresión de genes de los TIMPs

Los genes que codifican para los inhibidores tisulares específicos de las MMPs, TIMP1 y TIMP2 se expresan en condiciones de normalidad en la retina del conejo y su expresión no se altera en ambientes de luz blanca al implantar la lente intraocular. Sin

embargo, el ambiente de luz amarilla tiene como consecuencia una caída muy marcada en la expresión de TIMP1, que es evidente pero no ha sido cuantificada en comparación al ambiente de luz blanca. La lente intraocular en ambiente de luz amarilla no altera el patrón de expresión de TIMP1. Por el contrario, la exposición a luz azul produce un aumento en la expresión de TIMP1, que en los animales portadores de una lentilla intraocular amarilla fue semejante al observado con la exposición a luz blanca pero que se eleva 3 veces cuando no existe tal protección. Es decir, la lente intraocular amarilla, en ambientes de luz azul evita la elevación en los niveles de expresión de TIMP1.

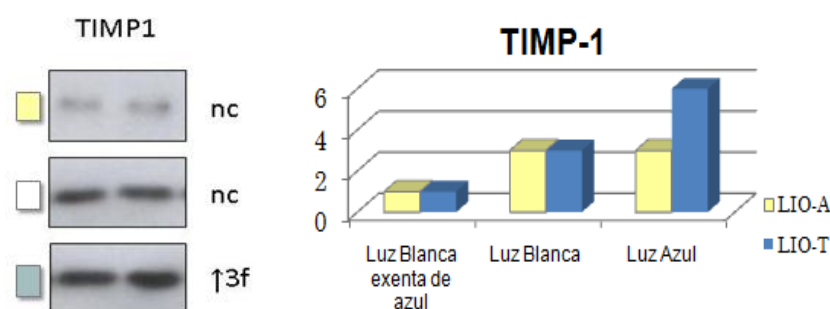


Figura 123 a y b. Resultados de la expresión génica de TIMP-1

En cuando al TIMP2, los niveles de expresión fueron muy similares en los grupos de animales expuestos a ambientes de luz blanca y de luz amarilla, y la implantación de una lente intraocular amarilla no modifica la expresión de este gen. Sin embargo la exposición a luz azul incrementa la expresión de este gen y tal elevación es frenada por la lente amarilla intraocular; en este grupo de animales, los animales sin lente presentaron niveles de expresión 6 veces superiores.

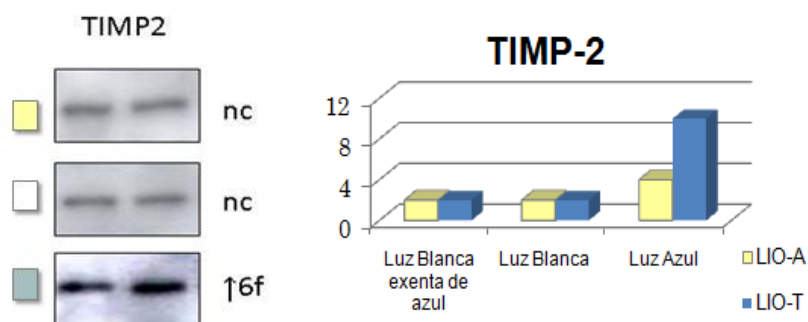


Figura 123 c y d. Resultados de la expresión génica de TIMP-2

6.- Discusión

Los resultados obtenidos en el análisis estructural realizado para esta investigación, que incide en el estudio de la muerte celular determinada por la luz de longitudes de onda corta, son coincidentes con estudios clásicos previos que analizan este mismo aspecto e indican el daño inducido por la luz en los fotorreceptores y otros tipos neuronales de la retina. La exposición a luz permanente (Noell y Cols., 1966; Lawill, 1973; Tso, 1973; Tso y Woodford, 1983; Dureau y Cols., 1999) produce un adelgazamiento de la capa nuclear externa, indicativo de la disminución de los fotorreceptores. El mecanismo exacto por el que se producen estos cambios no se conoce aunque es probable que la lesión inicial se localice en los segmentos externos de los fotorreceptores (Organisciak y Cols., 1994). Pero por otro lado, parece innegable que a largo plazo también está implicada en el proceso la retina nerviosa.

El tipo de homeostasis por pérdida neuronal mediante el proceso de apoptosis ha sido estudiado por Portera-Cailliau et al., en 1994, siendo la exposición lumínica aguda, es decir, 72 horas ininterrumpidas con dilatación pupilar en el ojo a estudio. Esta tesis aporta datos, hasta ahora inéditos, relativos al efecto de las luces de longitudes de onda corta en las retinas de animales con exposición de los mismos tipos de iluminación, con una particular condición: intensidad lumínica semejante a la luz ambiental y, además, considerando el ciclo circadiano de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Hao et al., en 2002, demuestra que la exposición aguda e intensa produce daño tisular por mecanismos transducina-independiente mientras que el daño por luz por exposiciones de menor intensidad es transducina-dependiente. En este estudio de investigación se muestran resultados de pérdida de neuronas en la capa nuclear interna, en la capa nuclear externa y de células ganglionares, por exposición de longitudes de onda corta con intensidad moderada y en ciclo circadiano, semejantes a los obtenidos en exposiciones agudas, con independencia de cuales sean los mecanismos de acción.

Con relación a la expresión génica de los genes pro y anti-apoptóticos, los resultados de esta tesis son coincidentes, en líneas generales, con los de Grimm et al. (2000) y de Chen et al (2004) que indican que Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad y Caspasa-3 se

expresan a niveles similares con independencia de la intensidad y duración de la iluminación. Sin embargo, en este trabajo se ha observado un aumento notable de Bad en la exposición a luz azul, que revierte parcialmente con la implantación de lentes intraoculares amarillas. Hay que hacer constar que los resultados de dichos autores se obtienen como máximo a las 24 horas de exposición a la luz. Los hallazgos de esta tesis sugieren que en la exposición a la luz a largo plazo, existe modulación de la expresión génica, estando fuertemente incrementada la expresión de Bad, que podría relacionarse con una muerte celular mantenida a lo largo de todo el tiempo de la exposición y que, necesariamente, debe de implicar a las células que los fotorreceptores (neuronas, células de Müller, amacrinas, etc...). Por otro lado, aunque se sabe que Bcl-2 se sobre-expresa para inhibir la apoptosis en la retina (Chen et al., 2004), esto no ha podido demostrarse en el caso de la luz. Estos hallazgos son plenamente coincidentes con los presentados en este estudio.

Con relación a los iniciadores de la apoptosis existen datos experimentales de que la exposición a niveles no fisiológicos de luz blanca produce muerte celular por activación, entre otros, de los protooncogenes c-Fos y d-Jun, especialmente el primero ya que los animales carentes de dicho gen son resistentes a los efectos fototóxicos de la luz y no presentan degeneración retiniana (Wenzel et al., 2000, 2005). En este estudio hemos analizado, si este efecto se mantiene a lo largo del tiempo, ya que ambos genes son de los considerados de expresión inmediata. No podemos comparar los resultados de esta investigación con los datos obtenidos en otros previos de otros autores, porque no existen en la literatura modelos semejantes al presentado en esta tesis. Se sabe que la exposición a la luz induce la expresión de c-Fos, pero sus niveles caen a partir de las 2 horas; sin embargo, para experimentos agudos, el c-Fos suele mantenerse elevado mientras dura el tiempo de exposición y se mantienen al menos 2 horas tras el cese de la misma. Los datos relativos a d-Jun son paralelos a los de c-Fos (Chen et al., 2004).

Respecto a los efectos de la iluminación circadiana, durante un periodo largo de tiempo, sobre el BDNF o el Trk-B son poco abundantes. El BDNF se produce en las células ganglionares, células amacrinas, y se incrementa en las células ganglionares tras exposición a la luz constante (Fujieda y Sasaki, 2008). Por otro lado se ha observado que la exposición a luz aumenta la expresión de Trk-B en la nuclear externa,

interna, plexiforme externa y células de Müller (Asai et al., 2007). En otros modelos de regeneración retiniana se ha observado que el único receptor para las neurotrofinas que se expresa en la retina es p75NTR mientras que Trk-B desaparece (Llamosas y Cols., 1997). Este dato es interesante porque p75 está relacionada con los procesos de muerte celular por apoptosis. Como ya se ha referido en el análisis estructural de esta tesis se ha observado que el tipo de exposición utilizado afecta a las neuronas bipolares y ganglionares de la retina, que disminuyen en densidad y alteran algunas de sus características. Teniendo en cuenta que estas células expresan Trk-B (Llamosas y Cols., 1997) y los efectos benéficos BDNF, los resultados de este trabajo demuestran una mayor expresión con implantación de lente intraocular amarilla o mediante el filtrado de longitudes de onda corta mediante dispositivos dispuestos sobre la fuente de iluminación. Estos datos son difíciles de interpretar sobre todo si se tiene en cuenta que Trk-B se localiza en las capas nerviosas de la retina y no en los fotorreceptores. De cualquier forma es evidente que la exposición a la luz de cualquier tipo incrementa la expresión de este receptor y que la luz privada de la parte azul del espectro es la que más regula al alza su expresión y por tanto las células que lo expresen (por determinar) pueden responder a los estímulos neuroprotectores mediados por esta molécula. En general estos resultados están en línea con los Asai et al (2007) y Fujieda y Sasaki (2008) que han observado que Trk-B se incrementa tras exposición a luz. Los estudios de Thanos y Emerich, en 2005, indican que la utilización de esta neurotrofina en el tratamiento de las lesiones retinianas producidas por la luz, puede ser un tratamiento para la retinitis pigmentosa y la degeneración macular; por tanto los resultados de las expresiones al alza del Trk-B y del BDNF, obtenidos en este estudio, permiten considerar que el filtrado de las longitudes de onda corta mediante filtros interpuestos colabora en el tratamiento de retinopatías.

Por otro lado, y con relación a los resultados obtenidos en este estudio, conviene reseñar que se acepta con carácter general que, en cualquier proceso biológico que conlleve remodelación de la matriz extracelular, de las membranas basales y neoangiogénesis, intervienen proteasas de la familia de las metaloproteasas. Una de las características patognomónicas de las patologías inducidas por la luz en humanos, y también en modelos experimentales, es la aparición de depósitos de material no bien caracterizado, que constituyen las drusas. Por tanto, cabe pensar que tales depósitos serían debidos a una disminución en la expresión de metaloproteasas. Pero también es

plausible la hipótesis de que el material depositado sea no degradable por estas proteasas.

Estos resultados coinciden parcialmente con los datos publicados en otros modelos animales. En este trabajo no se han encontrado modificaciones en la expresión de MMP-2 mientras que Plantner et al. (1998) la encontró aumentada en los animales expuestos a la luz. Por el contrario los hallazgos respecto a la MMP-9 están en la línea de las observaciones de la Papp et al. (2007). Pero en general, no podemos apoyar la hipótesis de que la formación de las drusas sea debido a una disminución en la producción de MMPs por el epitelio pigmentario, tal como sugieren Elliot et al. (2006). La interpretación de nuestros resultados puede ser, en principio, doble. Por un lado se obtiene la impresión de que la exposición a largos periodos de luz, con independencia de las características de la misma, aumenta la expresión de algunas MMPs y ello podría ser lesivo para la retina ya que indicaría lesiones de la matriz extracelular. Sin embargo, también pueden interpretarse en el sentido de que la expresión aumentada de las MMPs estaría en relación con un turn-over acelerado de la matriz para impedir la formación de los depósitos de material que dan origen a las drusas.

7.- Conclusiones

1.- La exposición crónica a iluminación circadiana, con diferentes tipos de luz, da lugar a una disminución en la densidad celular de las capas nucleares externa e interna y ganglionares.

2.- La mayor pérdida de células retinianas se observa en los animales sometidos a luz azul y este déficit se evita parcialmente con el filtrado de las longitudes de onda corta.

3.- Las pérdidas celulares de las capas nucleares externa e interna se producen por apoptosis.

4.- Los fotorreceptores más afectados por la exposición a longitudes de onda corta fueron los bastones, y este efecto nocivo es corregido parcialmente con el filtrado de estas bandas.

5.- La conectividad entre las células retinianas se encuentra disminuida en los animales sometidos a iluminación circadiana siendo mayor el defecto en los animales sometidos a luz azul. Los efectos son corregidos en parte por los filtros ópticos amarillos.

6.- La exposición a luz de longitud de onda corta favorece la apoptosis por incremento en la expresión del gen pro-apoptótico Bad y una disminución en la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-XL. Los efectos nocivos de la luz azul son prevenidos por absorción de estas longitudes de onda corta con filtros ópticos selectivos.

7.- El filtrado de las longitudes de onda corta inhibe la señal de inicio de la apoptosis por modificación de la expresión de los protooncogenes c-Fos y d-Jun.

8.- El filtrado de las longitudes de onda corta produce una expresión al alza del gen Trk-B, que puede ser una respuesta a los estímulos neuroprotectores mediados por esta molécula.

9.- La exposición crónica a iluminación circadiana aumenta la expresión de algunas MMPs implicadas en la aparición de drusas. Se desconoce si este aumento favorece su formación o impide el acumulo de éstos depósitos.

10.- La exposición a luz azul produce un aumento en la expresión del TIMP-1 y del TIMP-2 que revierte con la interposición de filtros ópticos selectivos de longitudes de onda corta.

11.- La absorción de las longitudes de onda corta mediante la interposición de un filtro óptico selectivo es beneficiosa y produce los mismos resultados tanto si éste es aplicado sobre la propia fuente de luz, como si es incluido en la lente intraocular implantada. Es decir, los efectos del filtrado de las longitudes de onda corta se producen con independencia de la posición del filtro respecto a la retina.

8. - Bibliografía

1. Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin M. Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol* 1999;44(1):1-29.
2. Adler P, Kaufman, P., Alm, A.,. Fisiología del ojo. Elsevier 2005;10.
3. Adrian W. Spectral sensitivity of the pupillary system. *Clin Exp Optom* 2003;86(4):235-8.
4. Aguilar M, Mateos, F. Optica fisiológica. Universidad Politécnica de Valencia 1993.
5. Ahir A, Guo L, Hussain A, Marshall J. Expression of metalloproteinases from human retinal pigment epithelial cells and their effects on the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):458-65.
6. Ahnelt P, Kolb H. Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 1994;343(3):406-27.
7. Ahnelt P, Kolb H. Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 1994;343(3):387-405.
8. Akira Y. TH, Tomoaki, K. Variations in the light-induced and suppression of nocturnal melatonin with special reference to variations in the pupillary light reflex in humans. *Journal of physiological anthropology*. 2007;26.
9. Alañón Fernández F, Cardenas Lara, M. Anatomía y fisiología del aparato ocular. *Oftalmología en Atención primaria*. 2003;9.
10. Albright C, Salganik R, Van Dyke T. Dietary depletion of vitamin E and vitamin A inhibits mammary tumor growth and metastasis in transgenic mice. *J Nutr* 2004;134(5):1139-44.
11. Aleman T, Duncan J, Bieber M, et al. Macular pigment and lutein supplementation in retinitis pigmentosa and Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1873-81.
12. Alexander K, Kilbride P, Fishman G, Fishman M. Macular pigment and reduced foveal short-wavelength sensitivity in retinitis pigmentosa. *Vision Res* 1987;27(7):1077-83.
13. Algvere P, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(1):4-15.
14. Altimus C, Güler A, Villa K, et al. Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(50):19998-20003.
15. Annis M, Yethon J, Leber B, Andrews D. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):115-23.
16. Arango M LL, Días T, Faxas, M. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol* 1997;13 (2)::126-34.
17. Arnheim G. Coagulationsnekrose und Kernschwund. *Virchows Arch.Pathol. Anat.* 1890;120:255-383.
18. Artigas J, Capilla P, Felipe A, Pujol J. Optica Fisiológica. Psicofísica de la visión.: Interamericana McGraw- Hill, 1995.
19. Asai N, Abe T, Saito T, et al. Temporal and spatial differences in expression of TrkB isoforms in rat retina during constant light exposure. *Exp Eye Res* 2007;85(3):346-55.

20. Ashkenazi A, Dixit V. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-8.
21. Bahrami H, Melia M, Dagnelie G. Lutein supplementation in retinitis pigmentosa: PC-based vision assessment in a randomized double-masked placebo-controlled clinical trial [NCT00029289]. *BMC Ophthalmol* 2006;6:23.
22. Balse E, Tessier L, Fuchs C, et al. Purification of mammalian cone photoreceptors by lectin panning and the enhancement of their survival in glia-conditioned medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(1):367-74.
23. Barker F BG. The direct spectral transmittance of excised human lens as a function of age, US Food and Drug Administration Report. 1991.
24. Barlow H, FITZHUGH R, KUFFLER S. Resting discharge and dark adaptation in the cat. *J Physiol* 1954;125(1):28-9P.
25. Barlow H, FITZHUGH R, KUFFLER S. Change of organization in the receptive fields of the cat's retina during dark adaptation. *J Physiol* 1957;137(3):338-54.
26. Barlow H, FITZHUGH R, KUFFLER S. Dark adaptation, absolute threshold and Purkinje shift in single units of the cat's retina. *J Physiol* 1957;137(3):327-37.
27. Barraquer D. [Investigations on the muscle dilatating the pupil.]. *Medicina (Madr)* 1952;20(1(2)):39-45.
28. Barry Schanzer PJS. La pupila, México: Manual Moderno. 2004.
29. Baver S, Pickard G, Sollars P. Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci* 2008;27(7):1763-70.
30. Bear M, Connors, B., Paradiso, M., ed. *Neurociencia, explorando el cerebro.*: Masson-Williams & Wilkins, 1998.
31. Beatty S, Boulton M, Henson D, et al. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 1999;83(7):867-77.
32. Beatty S, Koh H, Carden D, Murray I. Macular pigment optical density measurement: a novel compact instrument. *Ophthalmic Physiol Opt* 2000;20(2):105-11.
33. Beatty S, Koh H, Phil M, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45(2):115-34.
34. Beatty S, Murray I, Henson D, et al. Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(2):439-46.
35. Beatty S, Nolan J, Kavanagh H, O'Donovan O. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch Biochem Biophys* 2004;430(1):70-6.
36. Beatty S SM, Nolan JM, Woodside J, The CSG & Chakravarthy U. Longitudinal relationships between macular pigment and serum lutein in patients enrolled in the CARMA clinical trial (carotenoids and co-antioxidants in age-related maculopathy). *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2009;50.

37. Belenky M, Smeraski C, Provencio I, et al. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol* 2003;460(3):380-93.
38. Ben-Shabat S, Itagaki Y, Jockusch S, et al. Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002;41(5):814-7.
39. Ben-Shabat S, Parish C, Vollmer H, et al. Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin. *J Biol Chem* 2002;277(9):7183-90.
40. Berendschot T, Goldbohm R, Klöpping W, et al. Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11):3322-6.
41. Berendschot T, van Norren D. On the age dependency of the macular pigment optical density. *Exp Eye Res* 2005;81(5):602-9.
42. Berendschot T, van Norren D. Macular pigment shows ringlike structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):709-14.
43. Berendschot T, Willemse-Assink J, Bastiaanse M, et al. Macular pigment and melanin in age-related maculopathy in a general population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):1928-32.
44. Berglund RK, Stephenson AJ, Cronin AM, et al. Comparison of observed biochemical recurrence-free survival in patients with low PSA values undergoing radical prostatectomy and predictions of preoperative nomogram. *Urology* 2009;73(5):1098-103.
45. Bernardos R, Barthel L, Meyers J, Raymond P. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 2007;27(26):7028-40.
46. Bernstein P, Balashov N, Tsong E, Rando R. Retinal tubulin binds macular carotenoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(1):167-75.
47. Bernstein P, Yoshida M, Katz N, et al. Raman detection of macular carotenoid pigments in intact human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(11):2003-11.
48. Bernstein P, Zhao D, Wintch S, et al. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. *Ophthalmology* 2002;109(10):1780-7.
49. Bernstein PS AF, Liu A, Sharifzadeh M, Ermakov I, Gellermann W. Macular pigment imaging in AREDS II participants: Baseline studies from an ancillary study of AREDS II subjects enrolled at the Moran Eye Center. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2009;43.
50. Berson D. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 2003;26(6):314-20.
51. Berson D, Dunn F, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002;295(5557):1070-3.
52. Bhosale P, Larson A, Frederick J, et al. Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. *J Biol Chem* 2004;279(47):49447-54.
53. Bhosale P, Li B, Sharifzadeh M, et al. Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry* 2009;48(22):4798-807.
54. Bhosale P, Serban B, Zhao dY, Bernstein P. Identification and metabolic transformations of carotenoids in ocular tissues of the Japanese quail *Coturnix japonica*. *Biochemistry* 2007;46(31):9050-7.

55. Bhosale P, Zhao dY, Bernstein P. HPLC measurement of ocular carotenoid levels in human donor eyes in the lutein supplementation era. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):543-9.
56. Boettner EA WJ. Transmission of the ocular media. *Invest. Ophthalmol.* 1962;1:776-83.
57. Bok D. New insights and new approaches toward the study of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14619-21.
58. Bone R, Brener B, Gibert J. Macular pigment, photopigments, and melanin: distributions in young subjects determined by four-wavelength reflectometry. *Vision Res* 2007;47(26):3259-68.
59. Bone R, Landrum J. Distribution of macular pigment components, zeaxanthin and lutein, in human retina. *Methods Enzymol* 1992;213:360-6.
60. Bone R, Landrum J, Cains A. Optical density spectra of the macular pigment in vivo and in vitro. *Vision Res* 1992;32(1):105-10.
61. Bone R, Landrum J, Cao Y, et al. Macular pigment response to a supplement containing meso-zeaxanthin, lutein and zeaxanthin. *Nutr Metab (Lond)* 2007;4:12.
62. Bone R, Landrum J, Dixon Z, et al. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Exp Eye Res* 2000;71(3):239-45.
63. Bone R, Landrum J, Fernandez L, Tarsis S. Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(6):843-9.
64. Bone R, Landrum J, Friedes L, et al. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp Eye Res* 1997;64(2):211-8.
65. Bone R, Landrum J, Guerra L, Ruiz C. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. *J Nutr* 2003;133(4):992-8.
66. Bone R, Landrum J, Hime G, et al. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(6):2033-40.
67. Bone R, Landrum J, Mayne S, et al. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):235-40.
68. Bone R, Sparrock J. Comparison of macular pigment densities in human eyes. *Vision Res* 1971;11(10):1057-64.
69. Bonfanti L, Candeo P, Piccinini M, et al. Distribution of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the vertebrate retina: evidence that immunoreactivity is restricted to mammalian horizontal and ganglion cells. *J Comp Neurol* 1992;322(1):35-44.
70. Boycott B, Peichl L, Wässle H. Morphological types of horizontal cell in the retina of the domestic cat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1978;203(1152):229-45.
71. Brindley G, WILLMER E. The reflexion of light from the macular and peripheral fundus oculi in man. *J Physiol* 1952;116(3):350-6.
72. Britton G. General carotenoid methods. *Methods Enzymol* 1985;111:113-49.
73. Brody J. Envejecimiento y adaptación a la oscuridad. *The New York Times News Service.* 2007.
74. Bruce A, Dain S, Holden B. Spectral transmittance of tinted hydrogel contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt* 1986;63(12):941-7.
75. Bush R, Remé C, Malnoë A. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp Eye Res* 1991;53(6):741-52.

76. Caffé A, Söderpalm A, Holmqvist I, van Veen T. A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in the presence of RPE in retinal explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):275-82.
77. Cameron D, Gentile K, Middleton F, Yurco P. Gene expression profiles of intact and regenerating zebrafish retina. *Mol Vis* 2005;11:775-91.
78. Campbell T, Choy F. RNA interference: past, present and future. *Curr Issues Mol Biol* 2005;7(1):1-6.
79. Cangemi F. TOZAL Study: an open case control study of an oral antioxidant and omega-3 supplement for dry AMD. *BMC Ophthalmol* 2007;7:3.
80. Canovas R, Lima V, Garcia P, et al. COMPARISON BETWEEN MACULAR PIGMENT OPTICAL DENSITY MEASUREMENTS USING TWO-WAVELENGTH AUTOFLUORESCENCE AND HETEROCHROMATIC FLICKER PHOTOMETRY TECHNIQUES. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009.
81. Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, et al. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1646-52.
82. Cardinault N, Gorrand J, Tyssandier V, et al. Short-term supplementation with lutein affects biomarkers of lutein status similarly in young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 2003;38(5):573-82.
83. Casson R, Chidlow G, Wood J, et al. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):685-93.
84. Chaidaron W, Juwattanasomram, W. Colvard pupillometer measurement of scotopic pupil diameter in emmetropes and myopes. *Jpn J Ophthalmol*. 2002;46.
85. Chao C, Jamshidi-Parsian A, Wang W, McMasters K. Colorectal cancer cell adhesion attenuates Ad-E2F-1 mediated apoptosis. *J Surg Res* 2003;113(1):81-7.
86. Chao M. Dependence receptors: what is the mechanism? *Sci STKE* 2003;2003(200):PE38.
87. Chappelow A, Kaiser P. Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs* 2008;68(8):1029-36.
88. Charbel Issa P, Berendschot T, Staurengi G, et al. Confocal blue reflectance imaging in type 2 idiopathic macular telangiectasia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(3):1172-7.
89. Charbel Issa P, van der Veen R, Stijfs A, et al. Quantification of reduced macular pigment optical density in the central retina in macular telangiectasia type 2. *Exp Eye Res* 2009;89(1):25-31.
90. Chen E. Inhibición de citochrome oxidase y los daños de la luz azul en la retina de ratones. *Graefe's Archive for Clínica and Experimental Ophthalmology* 1983(132):416-23.
91. Chen J, Flannery J, LaVail M, et al. bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(14):7042-7.
92. Chen L, Wu W, Dentchev T, et al. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res* 2004;79(2):239-47.
93. Chirilia T. Melanized polyHEMA hydrogels: basic research and potential use. *J Biomaterials Appl* 1993;8:106-45.
94. Choi H, Choi Y, Yee S, et al. Ircin-1 induces cell cycle arrest and apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Mol Carcinog* 2005;44(3):162-73.

95. Chou B, Boxer, B.S,. The role of pupil size in refractive surgery. Textbook of ophthalmology. Jaypee Brothers 2001;4.
96. Chung S, Pease P. Effect of yellow filters on pupil size. *Optom Vis Sci* 1999;76(1):59-62.
97. Cideciyan A, Jacobson S, Aleman T, et al. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(14):5233-8.
98. Ciulla T, Curran-Celantano J, Cooper D, et al. Macular pigment optical density in a midwestern sample. *Ophthalmology* 2001;108(4):730-7.
99. Clark A, Clarke T, Gregson B, et al. Variability in pupil size estimation. *Emerg Med J* 2006;23(6):440-1.
100. Clemons T, Kurinij N, Sperduto R. Associations of mortality with ocular disorders and an intervention of high-dose antioxidants and zinc in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS Report No. 13. *Arch Ophthalmol* 2004;122(5):716-26.
101. Codenotti M, Patelli F, Brancato R. OCT findings in patients with retinopathy after watching a solar eclipse. *Ophthalmologica* 2002;216(6):463-6.
102. Congdon N, O'Colmain B, Klaver C, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):477-85.
103. Corcoran M, Hewitt R, Kleiner DJ, Stetler-Stevenson W. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996;49(1-3):7-19.
104. Cousins S, Espinosa-Heidmann D, Alexandridou A, et al. The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Exp Eye Res* 2002;75(5):543-53.
105. Curcio C, Owsley C, Jackson G. Spare the rods, save the cones in aging and age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2015-8.
106. Curran T, Franza BJ. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 1988;55(3):395-7.
107. Dacey D, Liao H, Peterson B, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005;433(7027):749-54.
108. D'Amico D, Goldberg M, Hudson H, et al. Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 2003;110(12):2372-83; discussin 84-5.
109. Das A, Mallya K, Zhao X, et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 2006;299(1):283-302.
110. Davis H SM. Biohazards of ultraviolet, visible and infrared radiation. *J Occupational Med* 1983;25:203-6.
111. De La Paz M, Anderson R. Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(13):3497-9.
112. Delcourt C, Carrière I, Delage M, et al. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(6):2329-35.

113. Delori F, Dorey C, Staurenghi G, et al. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(3):718-29.
114. Delori F, Goger D, Dorey C. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1855-66.
115. Delori F, Goger D, Hammond B, et al. Macular pigment density measured by autofluorescence spectrometry: comparison with reflectometry and heterochromatic flicker photometry. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2001;18(6):1212-30.
116. Delori F, Goger D, Keilhauer C, et al. Bimodal spatial distribution of macular pigment: evidence of a gender relationship. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2006;23(3):521-38.
117. Delori FC. Spectrophotometer for noninvasive measurement of intrinsic fluorescence and reflectance of the ocular fundus. *Applied Optics* 1994;33:7439-52.
118. Delori FC KC, Sparrow JR, Staurenghi G, ed. Origin of fundus autofluorescence. In F. G. Holz S, Schmitz-Valckenberg RF, Spaide, Bird AC. Heidelberg, Berlin, 2007; 17-29.
119. Detrich Hr, Westerfield M, Overview of the Zebrafish system. *Methods Cell Biol* 1999;59:3-10.
120. Distelhorst C, Shore G. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 2004;23(16):2875-80.
121. Ditchburn R, Drysdale A. Perception of structure in flashes and in afterimages. *Vision Res* 1973;13(12):2423-33.
122. Ditchburn R, Drysdale A. Visual information obtained from flashes and from afterimages. *Vision Res* 1973;13(12):2435-47.
123. Dowling J, Boycott B. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1966;166(2):80-111.
124. Duncan J, Aleman T, Gardner L, et al. Macular pigment and lutein supplementation in choroideremia. *Exp Eye Res* 2002;74(3):371-81.
125. Dureau P, Jeanny J, Clerc B, et al. Long term light-induced retinal degeneration in the miniature pig. *Mol Vis* 1996;2:7.
126. Efron N BN. Simple measurement of oxygen transmissibility. *J Occupational Med* 1985;68:27-35.
127. Egan CA RA, & Moreland JD,. Comparision of motion photometry and 2-wavelength fundus autofluorescence assessments of macular pigment spatial profiles in healthy subjects. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2009;50.
128. Eichler W, Friedrichs U, Thies A, et al. Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(8):2767-73.
129. Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Fengler D. Antineovascular agents in the treatment of eye diseases. *Curr Pharm Des* 2006;12(21):2645-60.
130. Eldred G, Katz M. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp Eye Res* 1988;47(1):71-86.
131. Eldred G, Lasky M. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature* 1993;361(6414):724-6.

132. Elliot S, Catanuto P, Stetler-Stevenson W, Cousins S. Retinal pigment epithelium protection from oxidant-mediated loss of MMP-2 activation requires both MMP-14 and TIMP-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(4):1696-702.
133. Elliott M, Stilwell A, Dong Y, et al. C-terminal deletion mutant p21(WAF1/CIP1) enhances E2F-1-mediated apoptosis in colon adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2002;9(5):453-63.
134. Elsner A, Burns S, Beausencourt E. Foveal cone photopigment distribution: small alterations associated with macular pigment distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(12):2394-404.
135. EM H. Estrabismo, Atlas de cirugía. Panamericana, Buenos Aires 1986;3:308.
136. Ermakov I, Ermakova M, Gellermann W, Bernstein P. Macular pigment Raman detector for clinical applications. *J Biomed Opt* 2004;9(1):139-48.
137. Ermakov I, McClane R, Gellermann W, Bernstein P. Resonant Raman detection of macular pigment levels in the living human retina. *Opt Lett* 2001;26(4):202-4.
138. Eutis Hs CD. Treatment for amblyopia: Results using occlusive contact lens. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1996;33:319-22.
139. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281(5381):1317-22.
140. Evan G, Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8.
141. Evans M, Jones D, Ziegler T. Glutamine inhibits cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells via the pyrimidine pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(3):G388-96.
142. Fariñas I. Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* 1999;45(4-5):233-42.
143. Fausett B, Goldman D. A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 2006;26(23):6303-13.
144. Fedorovich IB ZP, Ostrovskii MA,. Transmisión de los rayos UV por el cristalino del ojo humano en la infancia y amarillo del ojo debido a la edad. *Doklady Biological Sciences* 1994(336(1)):204-6.
145. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17(7):583-600.
146. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005(94):209-31.
147. Ferrara N, Gerber H. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106(4):148-56.
148. Fimbel S, Montgomery J, Burket C, Hyde D. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* 2007;27(7):1712-24.
149. Fischer A, Reh T. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 2001;4(3):247-52.
150. Fishkin N, Pescitelli G, Sparrow J, et al. Absolute configurational determination of an all-trans-retinal dimer isolated from photoreceptor outer segments. *Chirality* 2004;16(9):637-41.
151. Fishkin N, Sparrow J, Allikmets R, Nakanishi K. Isolation and characterization of a retinal pigment epithelial cell fluorophore: an all-trans-retinal dimer conjugate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(20):7091-6.

152. Flaxel C, Bradle J, Acott T, Samples J. Retinal pigment epithelium produces matrix metalloproteinases after laser treatment. *Retina* 2007;27(5):629-34.
153. Flemming W. CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESSES. *J Cell Biol* 1965;25(1):3-69.
154. Flemming W. HISTORICAL PAPER. CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESSES. *J Cell Biol* 1965;25:SUPPL:1-69.
155. Fox D, Poblentz A, He L. Calcium overload triggers rod photoreceptor apoptotic cell death in chemical-induced and inherited retinal degenerations. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:282-5.
156. Fraker P, Lill-Elghanian D. The many roles of apoptosis in immunity as modified by aging and nutritional status. *J Nutr Health Aging* 2004;8(1):56-63.
157. Francoise J, Askew, EW, Lang, LC, Bernstein, PS. Serum and macular responses to antioxidant supplementation versus a carotenoid-rich dietary intervention in the elderly. *Current Topics in Nutraceutical Research* 2006;4:69-78.
158. Frasson M, Sahel J, Fabre M, et al. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med* 1999;5(10):1183-7.
159. Freedman M, Lucas R, Soni B, et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999;284(5413):502-4.
160. Freeman E, Munoz B, West S, et al. Is there an association between cataract surgery and age-related macular degeneration? Data from three population-based studies. *Am J Ophthalmol* 2003;135(6):849-56.
161. Freney L EM. Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. *Am J Ophthalmol* 1985;100:686.
162. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J Biol Chem* 1998;273(44):28603-9.
163. Fu Y, Zhong H, Wang M, et al. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(29):10339-44.
164. Fujieda H, Sasaki H. Expression of brain-derived neurotrophic factor in cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina and the effects of constant light rearing. *Exp Eye Res* 2008;86(2):335-43.
165. Gale C, Hall N, Phillips D, Martyn C. Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2461-5.
166. Gallego A. Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Res* 1971;Suppl 3:33-50.
167. Gareis OL, G. La pupila. Editorial Masson. 2006.
168. Garg S, Martidis A, Nelson M, Sivalingam A. Optical coherence tomography of chronic solar retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2004;137(2):351-4.
169. Garnett K, Guerra, LH, Lamb, JD, Epperson, JL, Greenbury, DL, Dorey, K., Serum and macular pigment responses to supplementation with lutein or zeaxanthin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2002;43 (12).
170. Gartner S, Henkind P. Aging and degeneration of the human macula. 1. Outer nuclear layer and photoreceptors. *Br J Ophthalmol* 1981;65(1):23-8.

171. Gauthier C, Grant T, Holden B. Clinical performance of two opaque, tinted soft contact lenses. *J Am Optom Assoc* 1992;63(5):344-9.
172. Gauthier R, Joly S, Pernet V, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(9):3383-92.
173. Gaylord NG. Oxygen-permeable contact lenses: composition, methods and article of manufacture. 1974.
174. Gehen S, Vitiello P, Bambara R, et al. Downregulation of PCNA potentiates p21-mediated growth inhibition in response to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(3):L716-24.
175. Gellermann W, Ermakov I, Ermakova M, et al. In vivo resonant Raman measurement of macular carotenoid pigments in the young and the aging human retina. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2002;19(6):1172-86.
176. Gerster H. Review: antioxidant protection of the ageing macula. *Age Ageing* 1991;20(1):60-9.
177. Gil del Río E BP. Lentes de contacto. *Jims. Barcelona*. 1981:493-6.
178. Go V, Butrum R, Wong D. Diet, nutrition, and cancer prevention: the postgenomic era. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 1):3830S-6S.
179. Golstein P, Aubry L, Levraud J. Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(10):798-807.
180. Gomez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-22.
181. Gómez González E. Guía Básica de Conceptos de Radiometría y Fotometría. ESI-Universidad de Sevilla 2006.
182. Gonzalez F, Perez R, Justo M, Bermudez M. Response latencies to visual stimulation and disparity sensitivity in single cells of the awake *Macaca mulatta* visual cortex. *Neurosci Lett* 2001;299(1-2):41-4.
183. Gooley J, Lu J, Chou T, et al. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 2001;4(12):1165.
184. Gooley J, Lu J, Fischer D, Saper C. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 2003;23(18):7093-106.
185. Gorgels T, van Norren D. Ultraviolet and green light cause different types of damage in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(5):851-63.
186. Gragoudas E, Adamis A, Cunningham EJ, et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351(27):2805-16.
187. Gräper L. Eine neue Anschauung iiber physiologische Zellausschaltung. *Arch. exp. Zellforsch* 1914;12:373 - 94.
188. Grimm C, Remé C, Rol P, Williams T. Blue light's effects on rhodopsin: photoreversal of bleaching in living rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3984-90.
189. Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Remé C. Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Mol Vis* 2000;6:252-60.

190. Grimm C, Wenzel A, Williams T, et al. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(2):497-505.
191. Grosche J, Grimm D, Clemens N, Reichenbach A. Retinal light damage vs. normal aging of rats: altered morphology, intermediate filament expression, and nuclear organization of Müller (glial) cells. *J Hirnforsch* 1997;38(4):459-70.
192. Gruszecki W, Siewewiesiuk J. Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers. *Biochim Biophys Acta* 1990;1023(3):405-12.
193. Guirao Piñera A. *Optica Visual*. Madrid. ICE 2004.
194. Guo L, Hussain A, Limb G, Marshall J. Age-dependent variation in metalloproteinase activity of isolated human Bruch's membrane and choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2676-82.
195. Haber D. Roads leading to breast cancer. *N Engl J Med* 2000;343(21):1566-8.
196. Haegerstrom-Portnoy G. Short-wavelength-sensitive-cone sensitivity loss with aging: A protective role for macular pigment? *Journal of the Optical Society of America A. Optics and Image Science* 1988;5(12):2140-4.
197. Haeseleer F, Palczewski K. Calmodulin and Ca²⁺-binding proteins (CaBPs): variations on a theme. *Adv Exp Med Biol* 2002;514:303-17.
198. Hafezi F, Marti A, Grimm C, et al. Differential DNA binding activities of the transcription factors AP-1 and Oct-1 during light-induced apoptosis of photoreceptors. *Vision Res* 1999;39(15):2511-8.
199. Hagedorn M, Fernald R. Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol* 1992;321(2):193-208.
200. Hague J, Ta CT, Biggs MJ, Sattary JA. Small scale model for CFD validation in DAF application. *Water Sci Technol* 2001;43(8):167-73.
201. Haidinger W. El DES de Erkenne del directe de los das Ueber Polarisirten el der Polarisationsebene de Lage del der und de Lichts. *Der Physik* 1844;139:29-39.
202. Ham WJ, Mueller H, Ruffolo JJ, et al. Action spectrum for retinal injury from near-ultraviolet radiation in the aphakic monkey. *Am J Ophthalmol* 1982;93(3):299-306.
203. Ham WJ, Ruffolo JJ, Mueller H, et al. Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17(10):1029-35.
204. Ham WJ, Ruffolo JJ, Mueller H, Guerry Dr. The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time. *Vision Res* 1980;20(12):1105-11.
205. Hammond BJ, Caruso-Avery M. Macular pigment optical density in a Southwestern sample. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1492-7.
206. Hammond BJ, Ciulla T, Snodderly D. Macular pigment density is reduced in obese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(1):47-50.
207. Hammond BJ, Curran-Celentano J, Judd S. Sex differences in macular pigment optical density: relation to plasma carotenoid concentrations and dietary patterns. *Vision Res* 1996;36(13):2001-12.
208. Hammond BJ, Fuld K. Interocular differences in macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(2):350-5.
209. Hammond BJ, Fuld K, Curran-Celentano J. Macular pigment density in monozygotic twins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(12):2531-41.

210. Hammond BJ, Fuld K, Snodderly D. Iris color and macular pigment optical density. *Exp Eye Res* 1996;62(3):293-7.
211. Hammond BJ, Johnson E, Russell R, et al. Dietary modification of human macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(9):1795-801.
212. Hammond BJ, Wooten B, Snodderly D. Cigarette smoking and retinal carotenoids: implications for age-related macular degeneration. *Vision Res* 1996;36(18):3003-9.
213. Hammond BJ, Wooten B, Snodderly D. Individual variations in the spatial profile of human macular pigment. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 1997;14(6):1187-96.
214. Hammond BJ, Wooten B, Snodderly D. Preservation of visual sensitivity of older subjects: association with macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):397-406.
215. Handelman G, Dratz E, Reay C, van Kuijk J. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(6):850-5.
216. Handelman G, Nightingale Z, Lichtenstein A, et al. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *Am J Clin Nutr* 1999;70(2):247-51.
217. Handelman G, Snodderly D, Krinsky N, et al. Biological control of primate macular pigment. Biochemical and densitometric studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(2):257-67.
218. Hannibal J. Neurotransmitters of the retinohypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2002;309(1):73-88.
219. Hannibal J, Fahrenkrug J. Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Ann Med* 2002;34(5):401-7.
220. Hannibal J, Fahrenkrug J. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res* 2004;316(1):99-113.
221. Hannibal J, Hindersson P, Knudsen S, et al. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 2002;22(1):RC191.
222. Hao W, Wenzel A, Obin M, et al. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 2002;32(2):254-60.
223. Harris B. Commentary: 'the child is father of the man.' The relationship between child health and adult mortality in the 19th and 20th centuries. *Int J Epidemiol* 2001;30(4):688-96.
224. Hattar S, Kumar M, Park A, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 2006;497(3):326-49.
225. Hattar S, Liao H, Takao M, et al. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002;295(5557):1065-70.
226. Hattar S, Lucas R, Mrosovsky N, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003;424(6944):76-81.
227. Hawse P. Blocking the blue. *Br J Ophthalmol* 2006;90(8):939-40.
228. Hecht S. The Nature of the Visual Process: Harvey Lecture, October 21, 1937. *Bull N Y Acad Med* 1938;14(1):21-45.
229. Hecht S, Mandelbaum J. ROD-CONE DARK ADAPTATION AND VITAMIN A. *Science* 1938;88(2279):219-21.

230. Hecht S, Peskin J, Patt M. Intensity discrimination in the human eye: ii. The relation between $\Delta I/I$ and intensity for different parts of the spectrum. *J Gen Physiol* 1938;22(1):7-19.
231. Hecht S, Pickels E. The Sedimentation Constant of Visual Purple. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1938;24(4):172-6.
232. Helb H, Charbel Issa P, VAN DER Veen R, et al. Abnormal macular pigment distribution in type 2 idiopathic macular telangiectasia. *Retina* 2008;28(6):808-16.
233. Henkin R, Hoetker J. Deficient dietary intake of vitamin E in patients with taste and smell dysfunctions: is vitamin E a cofactor in taste bud and olfactory epithelium apoptosis and in stem cell maturation and development? *Nutrition* 2003;19(11-12):1013-21.
234. Herdenson G TB, Gibson PH. Cell counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using an image analysing computer. *J Neurol Sci* 1980;46:113.
235. Heriot K, Gambetti P, Lasek R. Proteins transported in slow components a and b of axonal transport are distributed differently in the transverse plane of the axon. *J Cell Biol* 1985;100(4):1167-72.
236. Heron G, McQuaid M, Morrice E. The Pulfrich effect in optometric practice. *Ophthalmic Physiol Opt* 1995;15(5):425-9.
237. Heys K, Friedrich M, Truscott R. Presbyopia and heat: changes associated with aging of the human lens suggest a functional role for the small heat shock protein, alpha-crystallin, in maintaining lens flexibility. *Aging Cell* 2007;6(6):807-15.
238. Hitchcock P, Kakuk-Atkins L. The basic helix-loop-helix transcription factor neuroD is expressed in the rod lineage of the teleost retina. *J Comp Neurol* 2004;477(1):108-17.
239. Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otteson D. Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(2):183-94.
240. Hofer H, Carroll J, Neitz J, et al. Organization of the human trichromatic cone mosaic. *J Neurosci* 2005;25(42):9669-79.
241. Hogan M, Moschini G, Zardi O. Effects of *Toxoplasma gondii* toxin on the rabbit eye. *Am J Ophthalmol* 1971;72(4):733-42.
242. Hogan M, Wood I. Reis-Bucklers' corneal dystrophy. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1971;91:41-57.
243. Holz F, Bellman C, Staudt S, et al. Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(5):1051-6.
244. Holz F, Bellmann C, Margaritis M, et al. Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237(2):145-52.
245. Hood B, Garner B, Truscott R. Human lens coloration and aging. Evidence for crystallin modification by the major ultraviolet filter, 3-hydroxy-kynurenine O-beta-D-glucoside. *J Biol Chem* 1999;274(46):32547-50.
246. Huang E, Reichardt L. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-42.
247. Hubel D. Single unit activity in lateral geniculate body and optic tract of unrestrained cats. *J Physiol* 1960;150:91-104.

248. Hubel D, WIESEL T. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* 1959;148:574-91.
249. Hubel D, WIESEL T. Integrative action in the cat's lateral geniculate body. *J Physiol* 1961;155:385-98.
250. Hyman L. Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye (Lond)* 1987;1 (Pt 2):330-41.
251. Ip C, Ip M, Loftus T, et al. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(7):689-96.
252. Isler O, ed. Carotenoids.: Birkhäuser Verlag Basel, 1971.
253. Jahn C, Wüstemeyer H, Brinkmann C, et al. Macular pigment density in age-related maculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(3):222-7.
254. Jang J, Surh Y. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1371-9.
255. Jinghua F, Ta-Chung M, Rittel R, Tabelow K. Criticality in quark-gluon systems far beyond thermal and chemical equilibrium. *Phys Rev Lett* 2001;86(10):1961-4.
256. Johns P, Easter SJ. Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J Comp Neurol* 1977;176(3):331-41.
257. Johnson E, Chung H, Caldarella S, Snodderly D. The influence of supplemental lutein and docosahexaenoic acid on serum, lipoproteins, and macular pigmentation. *Am J Clin Nutr* 2008;87(5):1521-9.
258. Johnson E, Hammond B, Yeum K, et al. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. *Am J Clin Nutr* 2000;71(6):1555-62.
259. Johnson E, Neuringer M, Russell R, et al. Nutritional manipulation of primate retinas, III: Effects of lutein or zeaxanthin supplementation on adipose tissue and retina of xanthophyll-free monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):692-702.
260. Jones C, Sane D, Herrington D. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003;59(4):812-23.
261. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 2003;22 (6):100-1067.
262. Jorge R, Costa R, Quirino L, et al. Optical coherence tomography findings in patients with late solar retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2004;137(6):1139-43.
263. Joseph R, Li T. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL transgenes and photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(12):2434-46.
264. Kalariya N, Ramana K, Srivastava S, van Kuijk F. Carotenoid derived aldehydes-induced oxidative stress causes apoptotic cell death in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2008;86(1):70-80.
265. Kamei M, Hollyfield J. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(10):2367-75.
266. Kang J, Pasquale L, Willett W, et al. Antioxidant intake and primary open-angle glaucoma: a prospective study. *Am J Epidemiol* 2003;158(4):337-46.

267. Kardon R, Bergamin, O,. The latency time of the pupil light reflex: Influence if sampling rate, stimulus intensity and stimulus duration. Department of Ophthalmology and Visual Science, Veterans Administration Hospital and University of Iowa, Iowa City, EEUU. 2004.
268. Kashani A. The triplex hypothesis of vision. *Ann Ophthalmol* 1993;25(4):125-32.
269. Kassen S, Ramanan V, Montgomery J, et al. Time course analysis of gene expression during light-induced photoreceptor cell death and regeneration in albino zebrafish. *Dev Neurobiol* 2007;67(8):1009-31.
270. Kaushik S, Gupta V, Gupta A. Optical coherence tomography findings in solar retinopathy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2004;35(1):52-5.
271. Keeler C, Sutcliffe E, Chaffee E. Normal and "Rodless" Retinae of the House Mouse with Respect to the Electromotive Force Generated through Stimulation by Light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1928;14(6):477-84.
272. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
273. Khachik F, Beecher G, Goli M, Lusby W. Separation and quantitation of carotenoids in foods. *Methods Enzymol* 1992;213:347-59.
274. Khachik F, Beecher G, Goli M, et al. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem* 1992;64(18):2111-22.
275. Khachik F, de Moura F, Chew E, et al. The effect of lutein and zeaxanthin supplementation on metabolites of these carotenoids in the serum of persons aged 60 or older. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(12):5234-42.
276. Kilbride P, Alexander K, Fishman M, Fishman G. Human macular pigment assessed by imaging fundus reflectometry. *Vision Res* 1989;29(6):663-74.
277. Kim S, Fishkin N, Kong J, et al. Rpe65 Leu450Met variant is associated with reduced levels of the retinal pigment epithelium lipofuscin fluorophores A2E and iso-A2E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(32):11668-72.
278. Kim S, He J, Yanase E, et al. Characterization of dihydro-A2PE: an intermediate in the A2E biosynthetic pathway. *Biochemistry* 2007;46(35):10122-9.
279. Kim S, Jang Y, Jockusch S, et al. The all-trans-retinal dimer series of lipofuscin pigments in retinal pigment epithelial cells in a recessive Stargardt disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(49):19273-8.
280. Kim S, Jockusch S, Itagaki Y, et al. Mechanisms involved in A2E oxidation. *Exp Eye Res* 2008;86(6):975-82.
281. Kirby M, Galea M, Loane E, et al. Foveal anatomic associations with the secondary peak and the slope of the macular pigment spatial profile. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(3):1383-91.
282. Kirlin W, Cai J, DeLong M, et al. Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J Nutr* 1999;129(10):1827-35.
283. Klaui H. B, J.C. Carotenoids as Food Color. In: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. Technological and Nutritional Applications. Academic Press 1981:156 - 69.

284. Klein R, Klein B, Wang Q, Moss S. Is age-related maculopathy associated with cataracts? *Arch Ophthalmol* 1994;112(2):191-6.
285. Klein R, Klein B, Wong T, et al. The association of cataract and cataract surgery with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. *Arch Ophthalmol* 2002;120(11):1551-8.
286. Kliffen M, van der Schaft T, Mooy C, de Jong P. Morphologic changes in age-related maculopathy. *Microsc Res Tech* 1997;36(2):106-22.
287. Koh H, Murray I, Nolan D, et al. Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. *Exp Eye Res* 2004;79(1):21-7.
288. Kohnen T, Terzi E, Bühren J, Kohnen E. Comparison of a digital and a handheld infrared pupillometer for determining scotopic pupil diameter. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(1):112-7.
289. Kolb F, Fischer W. Characteristics of posture alterations associated with a stepping movement in cats. *Exp Brain Res* 1994;98(2):287-97.
290. Kolb H. The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol* 1974;155(1):1-14.
291. Kolb H, Famiglietti E. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* 1974;186(4158):47-9.
292. Kolb H, Fernandez E, Schouten J, et al. Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J Comp Neurol* 1994;343(3):370-86.
293. König A. Ber den menschlichen Sehpurpur und seine Bedeutung für das Sehen. *Sitzungsberichte der Preussischen Akademie der Wissenschaften* 1894;30:577-98.
294. Kopsell D, Lefsrud M, Kopsell D, et al. Spinach cultigen variation for tissue carotenoid concentrations influences human serum carotenoid levels and macular pigment optical density following a 12-week dietary intervention. *J Agric Food Chem* 2006;54(21):7998-8005.
295. Kuffler S. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* 1953;16(1):37-68.
296. Kuffler S, Nichols, JG., ed. *De la neurona al cerebro*. Barcelona: Reverté, 1982.
297. Kuffler S, Fitzhugh R, Barlow H. Maintained activity in the cat's retina in light and darkness. *J Gen Physiol* 1957;40(5):683-702.
298. Kulkarni A, Kuppermann B. Wet age-related macular degeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(14):1994-2009.
299. Kunzler J OR. Hydrogels based on hydrophilic side chain siloxanes. *Poly Mat Sci and Eng* 1993;69(226-227).
300. Kurrer M, Pakala S, Hanson H, Katz J. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(1):213-8.
301. Kuwabara T, Gorn R. Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 1968;79(1):69-78.
302. Kvansakul J, Rodriguez-Carmona M, Edgar D, et al. Supplementation with the carotenoids lutein or zeaxanthin improves human visual performance. *Ophthalmic Physiol Opt* 2006;26(4):362-71.

303. Lai Y-C WA, Zantos SG. The role of bulky polysiloxanylalkyl methacrylates in oxygen permeable hydrogel materials. *Poly Mat Sci Eng* 1983;69:287-91.
304. Lai Y-C WA, Zantos SG. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Contact Lenses. John Wiley & Sons, Inc., New York 1993;7:192-218.
305. Landrum J, Bone, RA, Dixon, Z, Etienne-Levielle, V, Formosa, M, Saint-Louis, M. Influence of Lutein Dosage on Macular Pigment Response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004;45.
306. Landrum J, Bone R. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* 2001;385(1):28-40.
307. Landrum J, Bone R, Joa H, et al. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res* 1997;65(1):57-62.
308. Lanum J. The damaging effects of light on the retina. Empirical findings, theoretical and practical implications. *Surv Ophthalmol* 1978;22(4):221-49.
309. LaRowe T, Mares J, Snodderly D, et al. Macular pigment density and age-related maculopathy in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study. An ancillary study of the women's health initiative. *Ophthalmology* 2008;115(5):876-83.e1.
310. LaVail M, Gorrin G. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. *Exp Eye Res* 1987;44(6):877-89.
311. Lawill T. Effects of prolonged exposure of rabbit retina to low-intensity light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12:45-51.
312. Lawrence W. Neurology and telerobotics unit. The pupil as a control system. University of California 2000.
313. Leco K, Apte S, Taniguchi G, et al. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997;401(2-3):213-7.
314. Leco K, Khokha R, Pavloff N, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994;269(12):9352-60.
315. Lerman S. In vivo- in vitro investigations on cataract risk factors. *Dev Ophthalmol* 1987;15:77-81.
316. Leu S, Batni S, Radeke M, et al. Drusen are Cold Spots for Proteolysis: Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitor Proteins in Age-related Macular Degeneration. *Exp Eye Res* 2002;74(1):141-54.
317. Leung A, Leung J, Chan L, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a proliferative marker during embryonic and adult zebrafish hematopoiesis. *Histochem Cell Biol* 2005;124(2):105-11.
318. Levy C, Khaled M, Fisher D. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006;12(9):406-14.
319. LG M. Lentes blandos coloreados: el espectro completo. Interamericana-McGraw-Hill 1990;8:313.
320. Liew S, Gilbert C, Spector T, et al. Central retinal thickness is positively correlated with macular pigment optical density. *Exp Eye Res* 2006;82(5):915-20.
321. Lippman J. Contact lens materials: a critical review. *CLAO J* 1990;16(4):287-91.

322. Liu I, White L, LaCroix A. The association of age-related macular degeneration and lens opacities in the aged. *Am J Public Health* 1989;79(6):765-9.
323. Liu J, Itagaki Y, Ben-Shabat S, et al. The biosynthesis of A2E, a fluorophore of aging retina, involves the formation of the precursor, A2-PE, in the photoreceptor outer segment membrane. *J Biol Chem* 2000;275(38):29354-60.
324. Liu X, Grishanin R, Tolwani R, et al. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB modulate visual experience-dependent refinement of neuronal pathways in retina. *J Neurosci* 2007;27(27):7256-67.
325. Llamas M, Cernuda-Cernuda R, Huerta J, et al. Neurotrophin receptors expression in the developing mouse retina: an immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 1997;195(4):337-44.
326. Lockshin R, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(7):545-50.
327. Loewenfeld IE. The pupil: anatomy, physiology, and clinical applications. Butterworth-Heinemann. Boston 1999.
328. Lois N, Holder G, Bunce C, et al. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol* 2001;119(3):359-69.
329. Lois N, Owens S, Coco R, et al. Fundus autofluorescence in patients with age-related macular degeneration and high risk of visual loss. *Am J Ophthalmol* 2002;133(3):341-9.
330. López-Otín C, Overall C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(7):509-19.
331. Lucas R, Douglas R, Foster R. Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 2001;4(6):621-6.
332. Lucas R, Foster R. Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinology* 1999;140(4):1520-4.
333. Lucas R, Freedman M, Muñoz M, et al. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999;284(5413):505-7.
334. Lucas R, Hattar S, Takao M, et al. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003;299(5604):245-7.
335. Lupi D, Oster H, Thompson S, Foster R. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nat Neurosci* 2008;11(9):1068-73.
336. Lupi D, Sekaran S, Jones S. Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4^{-/-}) mice: a developmental study. *Chronobiol Int* 2006;23(1-2):167-79.
337. Magnussen S, Spillmann L, Stürzel F, Werner J. Filling-in of the foveal blue scotoma. *Vision Res* 2001;41(23):2961-7.
338. Magnussen S, Spillmann L, Stürzel F, Werner J. Unveiling the foveal blue scotoma through an afterimage. *Vision Res* 2004;44(4):377-83.
339. Maguire L. Keratorefractive surgery, success, and the public health. *Am J Ophthalmol* 1994;117(3):394-8.
340. Mahler J, Driever W. Expression of the zebrafish intermediate neurofilament Nestin in the developing nervous system and in neural proliferation zones at postembryonic stages. *BMC Dev Biol* 2007;7:89.

341. Mainster M. Light and macular degeneration: a biophysical and clinical perspective. *Eye (Lond)* 1987;1 (Pt 2):304-10.
342. Mainster M, Ham WJ, Delori F. Potential retinal hazards. Instrument and environmental light sources. *Ophthalmology* 1983;90(8):927-32.
343. Malacara D. Óptica básica. Fondo de cultura económica. Méjico 2004.
344. Mangels A, Holden J, Beecher G, et al. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc* 1993;93(3):284-96.
345. Marcus R, Delaney C, Easter SJ. Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *off. Vis Neurosci* 1999;16(3):417-24.
346. Margrain T, Boulton M, Marshall J, Sliney D. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res* 2004;23(5):523-31.
347. Mariño G, Uría J, Puente X, et al. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem* 2003;278(6):3671-8.
348. Marshall J. Radiation and the ageing eye. *Ophthalmic Physiol Opt* 1985;5(3):241-63.
349. Marshall J, Grindle J, Ansell P, Borwein B. Convolution in human rods: an ageing process. *Br J Ophthalmol* 1979;63(3):181-7.
350. Martínez López R. El Poder del ojo adaptado a la oscuridad. *Gaceta óptica* 2006.
351. Massacesi A, Faletra, R, Gerosa, F, Staurenghi, G, Orzales, N. The effect of oral supplementation of macular carotenoids (lutein and zeaxanthin) on the prevention of age-related macular degeneration: A 18 month follow up study *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2001;42 (4).
352. Mata N, Weng J, Travis G. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7154-9.
353. Matsuda T, Cepko C. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):16-22.
354. Matthews S, Ross N, Lall S, Gill T. Astaxanthin binding protein in Atlantic salmon. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2006;144(2):206-14.
355. Maxwell J. A dynamical theory of the electromagnetic field. *Philosophical transactions of the royal society* 1865;155:459-512.
356. McCarty C, Mukesh B, Fu C, et al. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol* 2001;119(10):1455-62.
357. McFall A, Ulkü A, Lambert Q, et al. Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21(16):5488-99.
358. McGillem G, Dacheux R. Rabbit retinal Müller cells undergo antigenic changes in response to experimentally induced proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 1999;68(5):617-27.
359. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407(6805):796-801.
360. Mellerio J, Ahmadi-Lari S, van Kuijk F, et al. A portable instrument for measuring macular pigment with central fixation. *Curr Eye Res* 2002;25(1):37-47.
361. Menacker S, Breton M, Breton M, et al. Do tinted lenses improve the reading performance of dyslexic children? A cohort study. *Arch Ophthalmol* 1993;111(2):213-8.

362. Meyers S, Ostrovsky M, Bonner R. A model of spectral filtering to reduce photochemical damage in age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2004;102:83-93; discussion -5.
363. Michels S, Rosenfeld P, Puliafito C, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112(6):1035-47.
364. Mino De Kaspar H, Hoepfner AS, Engelbert M, et al. Antibiotic resistance pattern and visual outcome in experimentally-induced *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis in a rabbit model. *Ophthalmology* 2001;108(3):470-8.
365. Moeller S, Parekh N, Tinker L, et al. Associations between intermediate age-related macular degeneration and lutein and zeaxanthin in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study (CAREDS): ancillary study of the Women's Health Initiative. *Arch Ophthalmol* 2006;124(8):1151-62.
366. Molina M, Rowland, FS. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* 1974;249(5460):810-2.
367. MOM T. Photic maculopathy in rhesus monkey : A light and electron microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12:17-34.
368. Moore R, Speh J, Card J. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1995;352(3):351-66.
369. Moreland J, Robson, AG, Kulikowski, JJ. Macular pigment assessment using a colour monitor. *Color Research & Application* 2001;26 (S1):S261-S3.
370. Moreland J, Robson A, Soto-Leon N, Kulikowski J. Macular pigment and the colour-specificity of visual evoked potentials. *Vision Res* 1998;38(21):3241-5.
371. Morganti P, Fabrizi G, Bruno C. Protective effects of oral antioxidants on skin and eye function. *Skinmed* 2004;3(6):310-6.
372. Mosca L, Marcellini S, Perluigi M, et al. Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochem Pharmacol* 2002;63(7):1305-14.
373. Mrosovsky N, Hattar S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int* 2003;20(6):989-99.
374. Muñoz B, West S, Rubin G, et al. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. *Arch Ophthalmol* 2000;118(6):819-25.
375. Nagase H WJJ. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999;274:21491-4.
376. Narayanan B, Narayanan N, Reddy B. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2001;19(6):1255-62.
377. Nasevicius A, Ekker S. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000;26(2):216-20.
378. Neelam K, Hogg R, Stevenson M, et al. Carotenoids and co-antioxidants in age-related maculopathy: design and methods. *Ophthalmic Epidemiol* 2008;15(6):389-401.
379. Negishi K, Stell W, Takasaki Y. Early histogenesis of the teleostean retina: studies using a novel immunochemical marker, proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin). *Brain Res Dev Brain Res* 1990;55(1):121-5.

380. Negishi K, Stell W, Teranishi T, et al. Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive cells in goldfish retina following intravitreal injection with 6-hydroxydopamine. *Cell Mol Neurobiol* 1991;11(6):639-59.
381. Negishi K, Sugawara K, Shinagawa S, et al. Induction of immunoreactive proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in goldfish retina following intravitreal injection with tunicamycin. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;63(1-2):71-83.
382. Nelson R, von Litzow A, Kolb H, Gouras P. Horizontal cells in cat retina with independent dendritic systems. *Science* 1975;189(4197):137-9.
383. Noell W, Albrecht R. Irreversible effects on visible light on the retina: role of vitamin A. *Science* 1971;172(978):76-9.
384. Noell W, Walker V, Kang B, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 1966;5(5):450-73.
385. Nolan J. Collaborative Optical Macular Pigment Assessment Study. 2009.
386. Nolan J, O'Donovan O, Kavanagh H, et al. Macular pigment and percentage of body fat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(11):3940-50.
387. Nolan J, Stack J, O' Donovan O, et al. Risk factors for age-related maculopathy are associated with a relative lack of macular pigment. *Exp Eye Res* 2007;84(1):61-74.
388. Nolan J, Stack J, O'connell E, Beatty S. The relationships between macular pigment optical density and its constituent carotenoids in diet and serum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):571-82.
389. Nolan J, Stringham J, Beatty S, Snodderly D. Spatial profile of macular pigment and its relationship to foveal architecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):2134-42.
390. Obana A, Hiramitsu T, Gohto Y, et al. Macular carotenoid levels of normal subjects and age-related maculopathy patients in a Japanese population. *Ophthalmology* 2008;115(1):147-57.
391. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 2003;19(1):21-4.
392. Ooto S, Akagi T, Kageyama R, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(37):13654-9.
393. Organisciak D, Darrow R, Barsalou L, et al. Susceptibility to retinal light damage in transgenic rats with rhodopsin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(2):486-92.
394. Organisciak D, Vaughan D. Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res* 2010;29(2):113-34.
395. Organisciak DT, Winkler, B.S., Retinal light damage: practical and theoretical considerations. *Prog. Retin. Eye Res.* 1994;13:1-29.
396. O'Steen W. Hormonal and dim light effects in retinal photodamage. *Photochem Photobiol* 1979;29(4):745-53.
397. O'Steen W, Bare D, Tytell M, et al. Water deprivation protects photoreceptors against light damage. *Brain Res* 1990;534(1-2):99-105.
398. O'Steen W, Donnelly J. Antagonistic effects of adrenalectomy and ether/surgical stress on light-induced photoreceptor damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22(1):1-7.

399. O'Steen W, Donnelly J. Chronologic analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22(2):252-5.
400. O'Steen W, Spencer R, Bare D, McEwen B. Analysis of severe photoreceptor loss and Morris water-maze performance in aged rats. *Behav Brain Res* 1995;68(2):151-8.
401. O'Steen W, Sweatt A, Eldridge J, Brodish A. Gender and chronic stress effects on the neural retina of young and mid-aged Fischer-344 rats. *Neurobiol Aging* 1987;8(5):449-55.
402. Panda S, Hogenesch J, Kay S. Circadian light input in plants, flies and mammals. *Novartis Found Symp* 2003;253:73-82; discussion -8, 102-9, 281-4.
403. Panda S, Provencio I, Tu D, et al. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 2003;301(5632):525-7.
404. Panda S, Sato T, Castrucci A, et al. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 2002;298(5601):2213-6.
405. Papazafiri P, Podini P, Meldolesi J, Yamaguchi T. Ageing affects cytosolic Ca²⁺ binding proteins and synaptic markers in the retina but not in cerebral cortex neurons of the rat. *Neurosci Lett* 1995;186(1):65-8.
406. Papp A, Nyilas R, Szepesi Z, et al. Visible light induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat eye. *J Neurochem* 2007;103(6):2224-33.
407. Parish C, Hashimoto M, Nakanishi K. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14609-13.
408. Parisi V, Tedeschi M, Gallinaro G. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. *Ophthalmology* 2008;115(2):324-33.
409. Park H, Cho H, Ha Y, Park J. Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem* 2004;15(4):229-35.
410. Pautler E, Morita M, Beezley D. Reversible and irreversible blue light damage to the isolated, mammalian pigment epithelium. *Prog Clin Biol Res* 1989;314:555-67.
411. Pavan-Langston D. Manual de diagnóstico y terapéutica oculares. Salvat, Barcelona 1988;2.
412. Pavloff N, Staskus P, Kishnani N, Hawkes S. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992;267(24):17321-6.
413. Pease P, Adams A, Nuccio E. Optical density of human macular pigment. *Vision Res* 1987;27(5):705-10.
414. Pérez Carrasco MJ. Efecto de un filtro amarillo sobre la función visual mesópica de sujetos emétopes y sujetos miopes operados de cirugía refractiva lasik. 2007.
415. Perez-Leon J, Warren E, Allen C, et al. Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Eur J Neurosci* 2006;24(4):1117-23.
416. Piñero DP, Maldonado, M.J., Juberías, J.R., Sánchez, M., Gene, A., Montalt, J.C. Importancia del tamaño pupilar escotópico en cirugía refractiva. *Gaceta óptica*. 2003;369.
417. Pires S, Hughes S, Turton M, et al. Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *J Neurosci* 2009;29(39):12332-42.
418. Pirie A. Color and solubility of the proteins human cataracts. *Invest Ophthalmol* 1968;7(6):634-50.

419. Pitts D. Threat of ultraviolet radiation to the eye--how to protect against it. *J Am Optom Assoc* 1981;52(12):949-57.
420. Plantner J. The presence of neutral metalloproteolytic activity and metalloproteinase inhibitors in the interphotoreceptor matrix. *Curr Eye Res* 1992;11(1):91-101.
421. Plantner J, Drew T. Polarized distribution of metalloproteinases in the bovine interphotoreceptor matrix. *Exp Eye Res* 1994;59(5):577-85.
422. Plantner J, Jiang C, Smine A. Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 1998;67(6):637-45.
423. Plantner J, Le M, Kean E. Enzymatic deglycosylation of bovine rhodopsin. *Exp Eye Res* 1991;53(2):269-74.
424. Plantner J, Smine A, Quinn T. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous. *Curr Eye Res* 1998;17(2):132-40.
425. Pocock G RC. FISIOLÓGÍA HUMANA. La base de la medicina. Masson 2005;2^a.
426. Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(6):518-31.
427. Polyak S. The Retina. University of Chicago Press, Chicago 1941.
428. Portera-Cailliau C, Sung C, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(3):974-8.
429. Provencio I, Cooper H, Foster R. Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol* 1998;395(4):417-39.
430. Provencio I, Jiang G, De Grip W, et al. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(1):340-5.
431. Provencio I, Rodriguez I, Jiang G, et al. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 2000;20(2):600-5.
432. Provencio IB, D.M.; Richardson, R.C.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M. Melanopsin immunoreactivity in retinal ganglion cells. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2002.
433. Puell Marín M. Óptica Fisiológica. Madrid: Editorial Complutense, 2006.
434. Radu R, Han Y, Bui T, et al. Reductions in serum vitamin A arrest accumulation of toxic retinal fluorophores: a potential therapy for treatment of lipofuscin-based retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4393-401.
435. Rahmani B, Tielsch J, Katz J, et al. The cause-specific prevalence of visual impairment in an urban population. The Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 1996;103(11):1721-6.
436. Rakoczy P YM, Nusinowitz S, Chang B, Heckenlively JR. Mouse models of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006;82:741-52.
437. Ramón y Cajal S. La rétine des vertébrés. *La Cellule* 1893;9:119-259.
438. Rapp L, Williams T. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res* 1980;20(12):1127-31.
439. Raymond P, Barthel L, Bernardos R, Perkowski J. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 2006;6:36.

440. Rechtman E, Danis R, Pratt L, Harris A. Intravitreal triamcinolone with photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularisation in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2004;88(3):344-7.
441. Refojo M. Mechanism of gas transport through contact lenses. *J Am Optom Assoc* 1979;50(3):285-7.
442. Reichardt L. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361(1473):1545-64.
443. Rein D, Wittenborn J, Zhang X, et al. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):533-40.
444. Remé C. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(8):2671-82.
445. Remé C, Grimm C, Hafezi F, et al. Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 1998;17(4):443-64.
446. Renahan A, Booth C, Potten C. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;322(7301):1536-8.
447. Richer S. ARMD--pilot (case series) environmental intervention data. *J Am Optom Assoc* 1999;70(1):24-36.
448. Richer S, Devenport J, Lang J. LAST II: Differential temporal responses of macular pigment optical density in patients with atrophic age-related macular degeneration to dietary supplementation with xanthophylls. *Optometry* 2007;78(5):213-9.
449. Richer S, Stiles W, Statkute L, et al. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry* 2004;75(4):216-30.
450. Robson A, Harding G, van Kuijk F, et al. Comparison of fundus autofluorescence and minimum-motion measurements of macular pigment distribution profiles derived from identical retinal areas. *Perception* 2005;34(8):1029-34.
451. Robson A, Moreland J, Pauleikhoff D, et al. Macular pigment density and distribution: comparison of fundus autofluorescence with minimum motion photometry. *Vision Res* 2003;43(16):1765-75.
452. Rodriguez-Carmona M, Kvansakul J, Harlow J, et al. The effects of supplementation with lutein and/or zeaxanthin on human macular pigment density and colour vision. *Ophthalmic Physiol Opt* 2006;26(2):137-47.
453. Rollag M, Berson D, Provencio I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 2003;18(3):227-34.
454. Rosenthal J, Kim J, de Monasterio F, et al. Dose-ranging study of lutein supplementation in persons aged 60 years or older. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(12):5227-33.
455. Rózanowska M, Jarvis-Evans J, Korytowski W, et al. Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem* 1995;270(32):18825-30.
456. Rózanowska M, Wessels J, Boulton M, et al. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med* 1998;24(7-8):1107-12.

457. Ruby N, Brennan T, Xie X, et al. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002;298(5601):2211-3.
458. Sailer H, Shinoda K, Blatsios G, et al. Investigation of thermal effects of infrared lasers on the rabbit retina: a study in the course of development of an active subretinal prosthesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(8):1169-78.
459. Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, et al. VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 2003;195(2):241-8.
460. Sakai H, Hirata Y, Usui S. Relationship between residual aberration and light-adapted pupil size. *Optom Vis Sci* 2007;84(6):517-21.
461. Sakai N, Decatur, J., Nakanishi, K., Elred, G.E. . Ocular pigment "A2E": An unprecedented pyridinium bisretinoid. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118:1559-60.
462. Salganik R. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* 2001;20(5 Suppl):464S-72S; discussion 73S-75S.
463. Salganik R, Albright C, Rodgers J, et al. Dietary antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice. *Carcinogenesis* 2000;21(5):909-14.
464. Samant R, Lau B, E C, et al. Primary vaginal cancer treated with concurrent chemoradiation using Cis-platinum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69(3):746-50.
465. Sánchez Cerdán A, Domingo Luna, E., Gómez López, D. Envejecimiento ocular: estudio clínico sobre filtros coloreados en pacientes presbitas. Universidad de Alicante 2004.
466. Sánchez Ramos C, Panetsos Petrova, F., Del Moral Martínez, I., Piferrer, A., Bloss, W. Neurooftalmología, electrofisiología y pruebas de imagen. Curso online de experto en métodos y técnicas avanzadas de exploración en visión. UCM 2007.
467. SanGiovanni J, Chew E, Clemons T, et al. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Arch Ophthalmol* 2007;125(9):1225-32.
468. Schalch W, Cohn W, Barker F, et al. Xanthophyll accumulation in the human retina during supplementation with lutein or zeaxanthin - the LUXEA (LUtein Xanthophyll Eye Accumulation) study. *Arch Biochem Biophys* 2007;458(2):128-35.
469. Schallenger JL. The JLS lens: an aid for patients with colour vision problems. *Am J Optom Physiol Opt* 1985;62:149-51.
470. Schanzer M, Mehta R, Arnold T, et al. Irregular astigmatism induced by annular tinted contact lenses. *CLAO J* 1989;15(3):207-11.
471. Schiefer U, Kurtenbach A, Braun E, et al. Centrally tinted contact lenses. A useful visual aid for patients with achromatopsia. *Ger J Ophthalmol* 1995;4(1):52-6.
472. Schmidt T, Kofuji P. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2009;29(2):476-82.
473. Schmidt T, Taniguchi K, Kofuji P. Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J Neurophysiol* 2008;100(1):371-84.

474. Schmitz-Valckenberg S, Bültmann S, Dreyhaupt J, et al. Fundus autofluorescence and fundus perimetry in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4470-6.
475. Scholl H, Bellmann C, Dandekar S, et al. Photopic and scotopic fine matrix mapping of retinal areas of increased fundus autofluorescence in patients with age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):574-83.
476. Schulze-Bergkamen H, Krammer P. Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol* 2004;31(1):90-119.
477. Schweitzer D, Lang G, Beuermann B, et al. [Objective determination of optical density of xanthophyll after supplementation of lutein]. *Ophthalmologe* 2002;99(4):270-5.
478. Seddon J, Ajani U, Sperduto R. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA* 1994;272(18):1413-20.
479. Seiler M, Thomas B, Chen Z, et al. BDNF-treated retinal progenitor sheets transplanted to degenerate rats: improved restoration of visual function. *Exp Eye Res* 2008;86(1):92-104.
480. Sekaran S, Foster R, Lucas R, Hankins M. Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol* 2003;13(15):1290-8.
481. Sekaran S, Lupi D, Jones S, et al. Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 2005;15(12):1099-107.
482. Sekiryu T, Iida T, Maruko I, Horiguchi M. Clinical application of autofluorescence densitometry with a scanning laser ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2994-3002.
483. Semo M, Peirson S, Lupi D, et al. Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci* 2003;17(9):1793-801.
484. Sethi C, Bailey T, Luthert P, Chong N. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000;84(6):654-66.
485. Shaikh S, Ta C, Basham AA, Mansour S. Leber hereditary optic neuropathy associated with antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *Am J Ophthalmol* 2001;131(1):143-5.
486. Sharifzadeh M, Bernstein P. Nonmydriatic fluorescence-based quantitative imaging of human macular pigment distributions. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2006;23(10):2373-87.
487. Sharifzadeh M, Zhao D, Bernstein P, Gellermann W. Resonance Raman imaging of macular pigment distributions in the human retina. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2008;25(4):947-57.
488. Sherwood R, Peberdy J. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. I. Grain storage at reduced temperatures. *J Sci Food Agric* 1974;25(9):1081-7.
489. Sherwood R, Peberdy J. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. II. Treatment of wheat grain with organic acids. *J Sci Food Agric* 1974;25(9):1089-93.
490. Shi X, Bosenko D, Zinkevich N, et al. Zebrafish *pitx3* is necessary for normal lens and retinal development. *Mech Dev* 2005;122(4):513-27.
491. Silvestri G. Age-related macular degeneration: genetics and implications for detection and treatment. *Mol Med Today* 1997;3(2):84-91.

492. Singerman L. Findings of the Phase 2 Trial of the Safety and Efficacy of Pegaptanib Sodium (MacugenT) in Patients with Diabetic Macular Edema. . Invest Ophthalmology Vis Sci 2005.
493. Snellen E, Verbeek A, Van Den Hoogen G, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake. Acta Ophthalmol Scand 2002;80(4):368-71.
494. Snodderly D. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. Am J Clin Nutr 1995;62(6 Suppl):1448S-61S.
495. Snodderly D, Auran J, Delori F. The macular pigment. II. Spatial distribution in primate retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25(6):674-85.
496. Snodderly D, Brown P, Delori F, Auran J. The macular pigment. I. Absorbance spectra, localization, and discrimination from other yellow pigments in primate retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25(6):660-73.
497. Snodderly D, Handelman G, Adler A. Distribution of individual macular pigment carotenoids in central retina of macaque and squirrel monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32(2):268-79.
498. Snodderly D, Mares J, Wooten B, et al. Macular pigment measurement by heterochromatic flicker photometry in older subjects: the carotenoids and age-related eye disease study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(2):531-8.
499. Song Z, Steller H. Death by design: mechanism and control of apoptosis. Trends Cell Biol 1999;9(12):M49-52.
500. Sparrow J, ed. Lipofuscin on the retinal pigment epithelium. In F. G. Holz S, Schmitz-Valckenberg RF, Spaide, Bird AC, Atlas ed. Heidelberg, Berlin, 2007; 3-16.
501. Sparrow J, Nakanishi K, Parish C. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41(7):1981-9.
502. Sparrow J, Parish C, Hashimoto M, Nakanishi K. A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40(12):2988-95.
503. Sparrow J, Vollmer-Snarr H, Zhou J, et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. J Biol Chem 2003;278(20):18207-13.
504. Sparrow J, Zhou J, Ben-Shabat S, et al. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43(4):1222-7.
505. Sparrow J, Zhou J, Cai B. DNA is a target of the photodynamic effects elicited in A2E-laden RPE by blue-light illumination. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44(5):2245-51.
506. Sperling H, Johnson C, Harwerth R. Differential spectral photic damage to primate cones. Vision Res 1980;20(12):1117-25.
507. Spraul C, Grossniklaus H. Characteristics of Drusen and Bruch's membrane in postmortem eyes with age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 1997;115(2):267-73.
508. Spraul C, Lang G, Grossniklaus H, Lang G. [Characteristics of drusen and changes in Bruch's membrane in eyes with age-related macular degeneration. Histological study]. Ophthalmologe 1998;95(2):73-9.
509. Spraul C, Lang G, Grossniklaus H, Lang G. Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular

- degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol* 1999;44 Suppl 1:S10-32.
510. Steinberg R. Survival factors in retinal degenerations. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4(4):515-24.
 511. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267(5203):1445-9.
 512. Straznicky K, Gaze R. The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J Embryol Exp Morphol* 1971;26(1):67-79.
 513. Stringham J, Hammond B. Macular pigment and visual performance under glare conditions. *Optom Vis Sci* 2008;85(2):82-8.
 514. Surette M, Fonteh A, Bernatchez C, Chilton F. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis* 1999;20(5):757-63.
 515. Switzer K, Fan Y, Wang N, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in Th1-polarized murine CD4+ T-cells. *J Lipid Res* 2004;45(8):1482-92.
 516. Sydorova M, Lee M. Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 2005;37(4):188-90.
 517. Sykes S, Robison WJ, Waxler M, Kuwabara T. Damage to the monkey retina by broad-spectrum fluorescent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20(4):425-34.
 518. Ta CT, Beckley J, Eades A. A multiphase CFD model of DAF process. *Water Sci Technol* 2001;43(8):153-7.
 519. Takase K, Sawai M, Yamamoto K, et al. Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: kinetics of the arrest and expression of the cell cycle marker proliferating cell nuclear antigen in Raji cells. *Cell Growth Differ* 1992;3(8):515-21.
 520. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454(7204):656-60.
 521. Tan J, Wang J, Flood V, et al. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2008;115(2):334-41.
 522. Tanito M, Masutani H, Nakamura H, et al. Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1162-7.
 523. Tapiero H, Townsend D, Tew K. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2004;58(2):100-10.
 524. Thanos C, Emerich D. Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5(11):1443-52.
 525. Thapan K, Arendt J, Skene D. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 2001;535(Pt 1):261-7.
 526. Thomas M. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Oxford, University Press. 2000;9.
 527. Thummel R, Bai S, Sarras MJ, et al. Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb. *Dev Dyn* 2006;235(2):336-46.
 528. Thummel R, Li L, Tanase C, et al. Differences in expression pattern and function between zebrafish hoxc13 orthologs: recruitment of Hoxc13b into an early embryonic role. *Dev Biol* 2004;274(2):318-33.

529. Torn D YL. Vitreoretinal complications of cataract surgery. Spide Diseases of the retina & vitreous. Philadelphia: WB Saunders 1999;18.
530. Trachimowicz R, Fisher L, Hinds J. Preservation of retinal structure in aged pigmented mice. *Neurobiol Aging* 1981;2(2):133-41.
531. Trieschmann M, Beatty S, Nolan J, et al. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study. *Exp Eye Res* 2007;84(4):718-28.
532. Trieschmann M, Spital G, Lommatzsch A, et al. Macular pigment: quantitative analysis on autofluorescence images. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(12):1006-12.
533. Trieschmann M, van Kuijk F, Alexander R, et al. Macular pigment in the human retina: histological evaluation of localization and distribution. *Eye (Lond)* 2008;22(1):132-7.
534. Truscott R. Presbyopia and Cataract: A question of Heat and Time. *Prog Retin Eye Res* 2010.
535. Tso M. Effect of photic injury on the retinal tissues. *Ophthalmology* 1983;90(8):952-63.
536. Tu D, Owens L, Anderson L, et al. Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(27):10426-31.
537. Tu D, Zhang D, Demas J, et al. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 2005;48(6):987-99.
538. Turro N, Chow MF, Rigaudy, J. Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects. *Journal of the American Chemical Society* 1981;103:7218-22.
539. Urtubia Vicario C. *Neurobiología de la visión*. Ediciones UPC 1996.
540. van de Kraats J, Berendschot T, Valen S, van Norren D. Fast assessment of the central macular pigment density with natural pupil using the macular pigment reflectometer. *J Biomed Opt* 2006;11(6):064031.
541. van de Kraats J, Berendschot T, van Norren D. The pathways of light measured in fundus reflectometry. *Vision Res* 1996;36(15):2229-47.
542. van de Kraats J, Kanis M, Genders S, van Norren D. Lutein and zeaxanthin measured separately in the living human retina with fundus reflectometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5568-73.
543. van de Kraats J, van Norren D. Directional and nondirectional spectral reflection from the human fovea. *J Biomed Opt* 2008;13(2):024010.
544. van der Schaft T, Mooy C, de Bruijn W, et al. Increased prevalence of disciform macular degeneration after cataract extraction with implantation of an intraocular lens. *Br J Ophthalmol* 1994;78(6):441-5.
545. van het Hof K, Brouwer I, West C, et al. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1999;70(2):261-8.
546. van Wijngaarden P, Coster D, Williams K. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA* 2005;293(12):1509-13.
547. Vega J, García-Suárez O, Germanà A. Vertebrate thymus and the neurotrophin system. *Int Rev Cytol* 2004;237:155-204.

548. Vega J, García-Suárez O, Hannestad J, et al. Neurotrophins and the immune system. *J Anat* 2003;203(1):1-19.
549. Velez Lasso JM. Lentes de contacto y baja visión. 1994.
550. Vélez Lasso JM EMF, Vélez Lasso P. Lentilles de contact comme support d'une filtre selectif. Etudes preliminaires. *Contactologia* 1996;18:87-9.
551. Verderber L, Johnson W, Mucke L. Differential regulation of a glial fibrillary acidic protein-LacZ transgene in retinal astrocytes and Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(6):1137-43.
552. Vihtelic T, Doro C, Hyde D. Cloning and characterization of six zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins. *Vis Neurosci* 1999;16(3):571-85.
553. Vihtelic T, Hyde D. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J Neurobiol* 2000;44(3):289-307.
554. Vihtelic T, Soverly J, Kassen S, Hyde D. Retinal regional differences in photoreceptor cell death and regeneration in light-lesioned albino zebrafish. *Exp Eye Res* 2006;82(4):558-75.
555. Virchow R. Gesammelte Abhandlungen aus dem Gebiete der öffentlichen Medicin und der Seuchenlehre. . 1879.
556. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev* 1989;47(1):23-5.
557. Vishwanathan R, Goodrow-Kotyla E, Wooten B, et al. Consumption of 2 and 4 egg yolks/d for 5 wk increases macular pigment concentrations in older adults with low macular pigment taking cholesterol-lowering statins. *Am J Clin Nutr* 2009;90(5):1272-9.
558. von Rückmann A, Fitzke F, Bird A. Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(2):478-86.
559. von Rückmann A, Fitzke F, Bird A. In vivo fundus autofluorescence in macular dystrophies. *Arch Ophthalmol* 1997;115(5):609-15.
560. Vu H, Robman L, McCarty C, et al. Does dietary lutein and zeaxanthin increase the risk of age related macular degeneration? The Melbourne Visual Impairment Project. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):389-90.
561. Wald G. Human vision and the spectrum. *Science* 1945;101(2635):653-8.
562. Wald G. Blue-blindness in the normal fovea. *J Opt Soc Am* 1967;57(11):1289-301.
563. Wald G. Visual pigments of crayfish. *Nature* 1967;215(5106):1131-3.
564. Wang J, Mitchell P, Cumming R, Lim R. Cataract and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmic Epidemiol* 1999;6(4):317-26.
565. Warren E, Allen C, Brown R, Robinson D. Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *Eur J Neurosci* 2003;17(9):1727-35.
566. Wassell J, Davies S, Bardsley W, Boulton M. The photoreactivity of the retinal age pigment lipofuscin. *J Biol Chem* 1999;274(34):23828-32.
567. Watson W, Cai J, Jones D. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:485-505.
568. Wei X, Cheng Y, Luo Y, et al. The zebrafish *Pard3* ortholog is required for separation of the eye fields and retinal lamination. *Dev Biol* 2004;269(1):286-301.

569. Weiter J, Delori F, Dorey C. Central sparing in annular macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1988;106(3):286-92.
570. Wenzel A, Fuld K, Stringham J, Curran-Celentano J. Macular pigment optical density and photophobia light threshold. *Vision Res* 2006;46(28):4615-22.
571. Wenzel A, Gerweck C, Barbato D, et al. A 12-wk egg intervention increases serum zeaxanthin and macular pigment optical density in women. *J Nutr* 2006;136(10):2568-73.
572. Wenzel A, Grimm C, Marti A, et al. c-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci* 2000;20(1):81-8.
573. Wenzel A, Grimm C, Seeliger M, et al. Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1653-9.
574. Wenzel A, Reme C, Williams T, et al. The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci* 2001;21(1):53-8.
575. Wenzel A, Sheehan J, Gerweck C, et al. Macular pigment optical density at four retinal loci during 120 days of lutein supplementation. *Ophthalmic Physiol Opt* 2007;27(4):329-35.
576. Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, Daniel H. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* 2004;4(7):2160-74.
577. Werner J, Donnelly S, Kliegl R. Aging and human macular pigment density. Appended with translations from the work of Max Schultze and Ewald Hering. *Vision Res* 1987;27(2):257-68.
578. White M, Fisher L. Degree of light damage to the retina varies with time of day of bright light exposure. *Physiol Behav* 1987;39(5):607-13.
579. Wichterle O LD. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960;185:117-8.
580. Wiesel T, Hubel D. Spatial and chromatic interactions in the lateral geniculate body of the rhesus monkey. *J Neurophysiol* 1966;29(6):1115-56.
581. Williamson R, Marston F, Angal S, et al. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J* 1990;268(2):267-74.
582. Williamson R, Muskett F, Howard M, et al. The effect of matrix metalloproteinase complex formation on the conformational mobility of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Biol Chem* 1999;274(52):37226-32.
583. Willmmer E. Observations on the central fovea of certain red-green-blind subjects. *J Physiol* 1946;105(6):38.
584. Wilson R, Kunchithapautham K, Rohrer B. Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(6):2877-86.
585. Winn B, Whitaker D, Elliott D, Phillips N. Factors affecting light-adapted pupil size in normal human subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(3):1132-7.
586. Witmer A, Vrensen G, Van Noorden C, Schlingemann R. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(1):1-29.
587. Wong K, Dunn F, Graham D, Berson D. Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 2007;582(Pt 1):279-96.

588. Wooten B, Hammond B. Macular pigment: influences on visual acuity and visibility. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(2):225-40.
589. Wright R. The use of artificial sunlight for illuminating test apparatus and the general lighting of examination rooms. *Br J Ophthalmol* 1934;18(5):260-4.
590. Wu D, Schneiderman T, Burgett J, et al. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9):2115-24.
591. Wu J, Seregard S, Algvere P. Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 2006;51(5):461-81.
592. Wu Y, Fishkin N, Pande A, et al. Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease. *J Biol Chem* 2009;284(30):20155-66.
593. Wüstemeyer H, Jahn C, Nestler A, et al. A new instrument for the quantification of macular pigment density: first results in patients with AMD and healthy subjects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240(8):666-71.
594. Wyszecki G, Stiles W. High-level trichromatic color matching and the pigment-bleaching hypothesis. *Vision Res* 1980;20(1):23-37.
595. Yanagi Y, Inoue Y, Iriyama A, Jang W. Effects of yellow intraocular lenses on light-induced upregulation of vascular endothelial growth factor. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(9):1540-4.
596. Yang J, Basinger S, Gross R, Wu S. Blue light-induced generation of reactive oxygen species in photoreceptor ellipsoids requires mitochondrial electron transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(3):1312-9.
597. Yannuzzi L, Fisher Y, Slakter J, Krueger A. Solar retinopathy. A photobiologic and geophysical analysis. *Retina* 1989;9(1):28-43.
598. Yano M, Kishida E, Iwasaki M, et al. Docosahexaenoic acid and vitamin E can reduce human monocytic U937 cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Nutr* 2000;130(5):1095-101.
599. Yoshida Y, Anzai N, Kawabata H. Apoptosis in normal and neoplastic hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996;24(3):185-211.
600. Young R. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1981;31:291.
601. Young R. Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1988;32(4):252-69.
602. Young R, Powell J, Watson P. Ultrastructural changes in scleral proteoglycans precede destruction of the collagen fibril matrix in necrotizing scleritis. *Histopathology* 1988;12(1):75-84.
603. Yu J, Qiao L, Zimmermann L, et al. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* 2006;43(1):134-43.
604. Yuodelis C, Hendrickson A. A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development. *Vision Res* 1986;26(6):847-55.
605. Yurco P, Cameron D. Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Res* 2005;45(8):991-1002.
606. Zeimer M, Hense H, Heimes B, et al. [The macular pigment: short- and intermediate-term changes of macular pigment optical density following supplementation with lutein and zeaxanthin and co-antioxidants. The LUNA Study]. *Ophthalmologie* 2009;106(1):29-36.

607. Zhao D, Wintch S, Ermakov I, et al. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in retinal, choroidal, and macular dystrophies. *Arch Ophthalmol* 2003;121(7):967-72.
608. Zhou J, Cai B, Jang Y, et al. Mechanisms for the induction of HNE- MDA- and AGE-adducts, RAGE and VEGF in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2005;80(4):567-80.
609. Zhou J, Jang Y, Kim S, Sparrow J. Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(44):16182-7.
610. Zhou J, Kim S, Westlund B, Sparrow J. Complement activation by bisretinoid constituents of RPE lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(3):1392-9.

1.- Estudios Experimentales Previos del efecto fototóxico de la luz “visible”:

Cuando se inició el análisis bibliográfico previo a cualquier trabajo de investigación se detectó, en la literatura científica, la existencia de un razonable número de artículos en los que se estudia el efecto fototóxico a luz “visible”. Pero resulta interesante comprobar que hay dos variables importantes de nuestro trabajo concretamente la pigmentación de los animales y el tipo e intensidad de la iluminación de exposición que prácticamente no está considerado en otras investigaciones sobre la degeneración retiniana. Resulta sorprendente el déficit de estudios en el que se consideren estas variables porque es conocido, desde hace tiempo, no sólo que la luz tiene un efecto fototóxico sobre la retina sino también que el grado y tipo de afección depende de la intensidad de la luz, de su longitud de onda y del tiempo de exposición. La exposición a luz intensa de forma aguda causa un daño térmico, mientras que la exposición a luz no tan intensa pero de forma crónica produce daño fotoquímico.

A continuación se van a exponer, de forma resumida dos estudios previos realizados de forma paralela al trabajo objeto de esta tesis doctoral porque se considera que pueden colaborar a la demostración de la hipótesis de trabajo. En el primer caso se analizan retinas de ratas sin pigmentación y expuestas a una radiación continua mientras que en el segundo trabajo se analizan retinas de ratas pigmentadas expuestas a luz en ciclos.

ANEXO I: Exposición a luz continua de forma intensa: Fototoxicidad en ratas albinas. Estudio piloto.

Consideraciones Preliminares

La reacción fotoquímica ocurre cuando una molécula absorbe un fotón. Como consecuencia se producen una serie de especies de oxígeno reactivo que son oxidantes y, por lo tanto, muy tóxicas para la célula en la que se ha producido la reacción. En la retina, las moléculas que absorben los fotones están contenidas en los fotorreceptores o en el epitelio pigmentario. Por ello, estas dos capas de la retina son las que se afectan en la fototoxicidad inducida por la luz.

La lipofucsina ocular se localiza sobre todo en las células del epitelio pigmentario y procede de los productos de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Posee varios fluorógenos que absorben la luz y emiten autofluorescencia amarillo-anaranjada cuando se estimula con luz azul. Los efectos adversos de la excitación de la lipofucsina por la luz están mediados por su capacidad para generar sustancias oxidantes que producen daño celular mediante peroxidación lipídica, ruptura de lisosomas y del DNA. Ello conlleva una atrofia de las células del epitelio pigmentario. En la mediación del daño se ha implicado a un fluoróforo de la lipofusina, el A2E que puede producir apoptosis de las células del epitelio pigmentario. Uno de los principales modelos experimentales para producir degeneración retiniana experimental es la exposición a luz permanente. La exposición de ratas a iluminación permanente produce un adelgazamiento de la capa nuclear externa. Este modelo es especialmente interesante cuando se utilizan ratas albinas cuyos fotorreceptores se destruyen después de unos pocos días sometidos a niveles moderados de intensidad lumínica.

Objetivo

Estudiar la estructura de la retina de ratas albinas sometidas a diferentes tipos de iluminación permanente (luz blanca, luz azul y blanca exenta de azul).

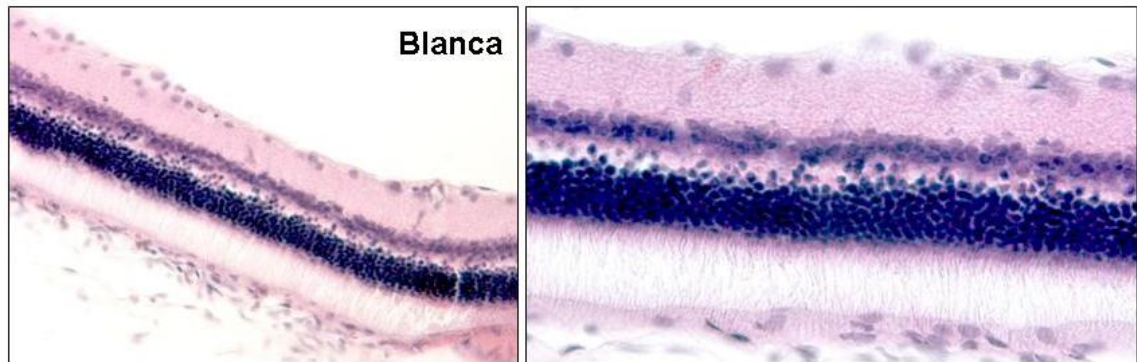
Material y técnicas

Para este estudio se utilizaron ratas albinas, las cuales fueron expuestas a luces de diferente composición espectral de forma continua durante 72 hs. Cada una tenía la pupila del ojo derecho dilatada con atropina y la izquierda sin dilatar. Se estudiaron las retinas en cortes inmunohistoquímicos con hematoxilina-eosina y otras técnicas habituales en estos estudios.

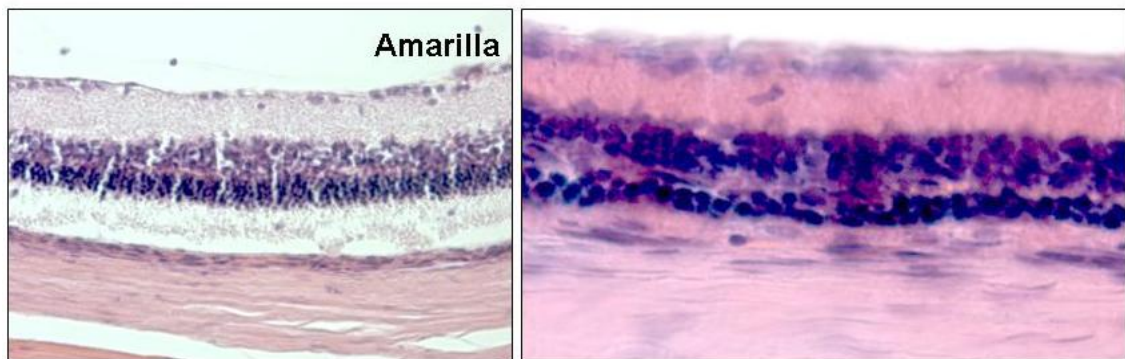
Resultados y Discusión

La estructura de la retina de los animales sometidos a luz blanca muestra una estructura compatible con la normalidad y las capas retinianas están bien organizadas. No obstante hay un detalle que llama la atención en estos animales: la existencia de células, de naturaleza desconocida, entre las capas granulosas interna y externa. La ausencia de pigmentación del epitelio pigmentario es propia de los animales albinos, como los utilizados en este trabajo.

En cuanto a la estructura de la retina de las ratas sometidas a iluminación amarilla durante periodos de tiempo prolongados, se han encontrado dos tipos de comportamiento bien diferentes. En unos casos (imagen de la izquierda) se aprecian todas las capas de la retina, aunque la plexiforme externa está muy reducida de espesor. En otros casos (imagen derecha) la atrofia retiniana es bien manifiesta y hay ausencia de segmentos externos de los fotorreceptores, escasa celularidad en la granular externa y disminución de la densidad de células en la granulosa externa; la plexiforme externa es casi inexistente.

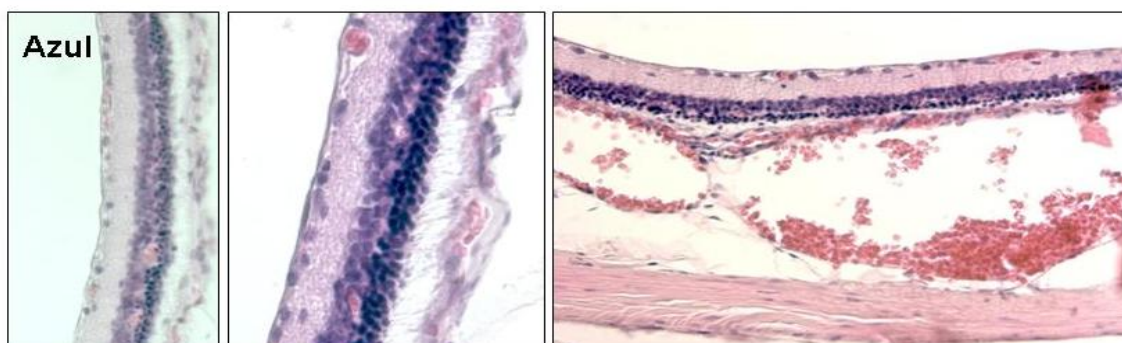


Estructura de la retina de ratas Wistar-Kioto sometidas iluminación blanca permanente durante 15 días. Se aprecia la ausencia de pigmentación en el epitelio pigmentario.



Estructura de la retina de ratas Wistar-Kioto sometidas iluminación amarilla permanente durante 15 días. Se aprecia en ambas imágenes la reducción de la plexiforme externa, y en la imagen derecha la ausencia de segmentos externos en los fotorreceptores, reducción marcada en la celularidad de las granulosas.

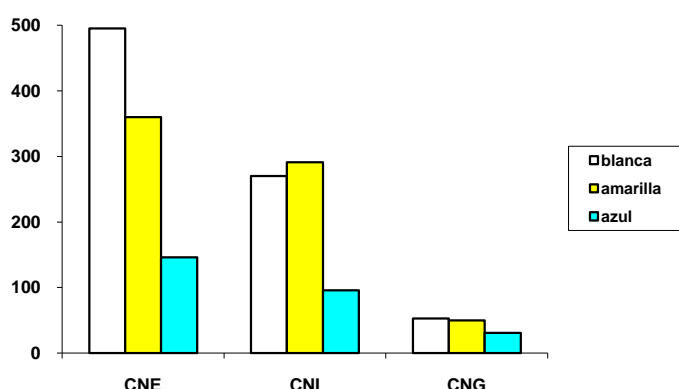
En cuanto a las ratas tratadas con luz azul, los efectos más evidentes se producen a nivel de los fotorreceptores en los cuales desaparece el segmento externo y, además, los que persisten están reducidos en número. La plexiforme externa es casi inexistente y, aparentemente, el número de células de la granular interna está disminuido. Otro detalle importante observado en este grupo de animales fue la presencia de grandes vasos a nivel de la coroides en la mayor parte de los animales (Figura 3, derecha) que afectaban a segmentos variables del ojo.



Estructura de la retina de ratas Wistar-Kioto sometidas iluminación azul permanente durante 15 días. Se aprecia en ambas imágenes la reducción del espesor de la plexiforme externa, ausencia de segmentos externos en los fotorreceptores y la existencia de grandes vasos en la coroides de amplios sectores del ojo.

En cuanto a la granular interna, también en los animales expuestos a la luz azul y la amarilla hay una disminución en la densidad celular determinada por el número de núcleos. Seguramente se encuentran afectadas las neuronas bipolares, pero es posible que también lo estén otras células situadas en esta capa.

Las neuronas ganglionares son las que sufren menos variaciones cuando se expone la retina a diferentes tipos de iluminación. No obstante, se encuentran reducidas en los animales expuestos a la luz azul.



Resultados del estudio cuantitativo realizado en la retina de los diferentes grupos de animales realizados en las capas nuclear externa (CNE), nuclear interna (CNI) y capa de las neuronas ganglionares (CNG).

Los resultados obtenidos en este modelo experimental demuestran claramente que la exposición prolongada y permanente a diferentes tipos de luz produce lesiones en la retina. En el proceso de degeneración retiniana, y no sólo macular, están implicadas la mayoría de las capas celulares de la retina, pero sobre todo los fotorreceptores, especialmente los segmentos externos de los mismos.

Como en la mayoría de los estudios sobre el tema, para la realización de este trabajo hemos utilizado animales albinos. Teóricamente, las pérdidas retinianas inducidas por la luz deberían ser más evidentes en estos animales al carecer de la protección que ofrecen los pigmentos del iris y la retina. Sin embargo, trabajos realizados en animales pigmentados demuestran que esta característica no los hace menos vulnerables a los efectos fototóxicos de la luz (Noell y Cols., 1966). Ello sugiere que la sensibilidad de la retina a la exposición lumínica no está influenciada tanto por la pigmentación como por la cantidad de luz (Rapp y Williams, 1980; LaVail y Gorrin, 1987).

Por lo que respecta a los hallazgos histológicos observados en las retinas de nuestros animales, las lesiones afectan principalmente a los fotorreceptores y se manifiesta como una disminución en las

capas celulares y desorganización de los segmentos externos. Las capas internas de la retina muestran alteraciones evidentes y no tan discretas o inexistentes como señalan algunos autores. (Wenzel y Cols., 2005).

En este trabajo se ha analizado un posible modelo de estudio de las patologías retinianas y se han mostrado signos evidentes de degeneración de la retina como consecuencia de la situación experimental creada. Se eligió este modelo porque representa una aproximación importante al estudio de estas patologías: los cambios fisiopatológicos inducidos por la iluminación permanente con diferentes tipos de luz.

Hemos obtenido resultados interesantes que ya son parcialmente conocidos por la literatura, pero otros, como la afectación cuantitativa de las capas internas de la retina son más novedosos. Los datos que se presentan, tal y como se ha insistido varias veces, son preliminares y están pendientes de conformación con el análisis de un mayor número de animales y la realización de un estudio estadístico adecuado.

En base a estos datos, pues, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- La exposición a luz permanente amarilla y azul produce cambios estructurales en la retina de rata albina que afectan fundamentalmente al segmento externo de los fotorreceptores, pero también al número de estas células, y a los estratos neuronales de la retina. Los efectos más nocivos fueron los causados por la luz azul.

2.- La exposición a luz azul permanente produce cambios vasculares importantes y evidentes en la coroides.

ANEXO II: Exposición a luz continua de forma intensa: Ratas pigmentadas. Estudio preliminar

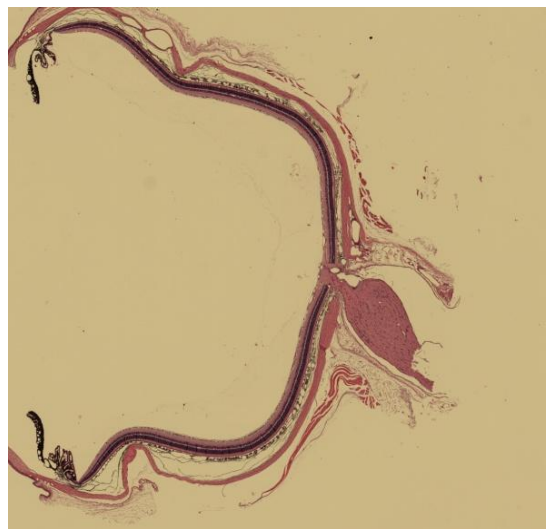
Antecedentes

Se utilizaron ratas hembras pigmentadas, Lister-Hooded (LH), de ocho semanas, para una secuencia de tres experimentos donde se sometió a cada grupo de animales a fotoexposiciones de distintas intensidades lumínicas, siendo la media en el primer experimento de 3086,67lux y 2350lux en el segundo. En el tercer experimento, se utilizó una intensidad lumínica que oscilaba entre 700-800lux, adaptándose al valor estandar de las condiciones medias ambientales de la ciudad de Madrid (España) y con una irradiancia que variaba desde $1,48\text{w/m}^2$ hasta $1,64\text{w/m}^2$. Tanto en el segundo como en el tercer experimento, se utilizaron filtros bloqueantes de longitudes de onda corta, de distinta absorbancia.

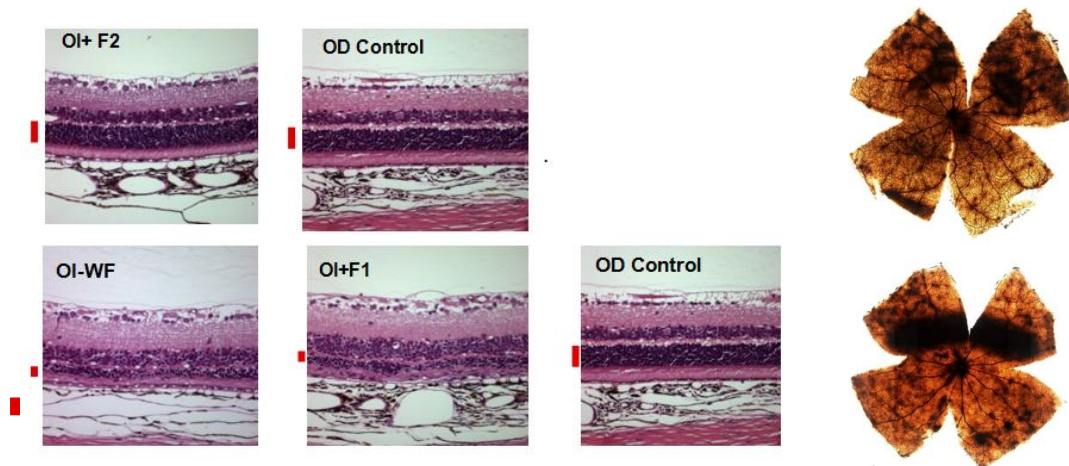
Los resultados se obtuvieron aplicando las técnicas de **Montajes globales** y **Sección transversales**: Las retinas fotoexpuestas, sin protección o protegidas un 5%, con filtros bloqueantes de longitud de onda corta, presentaron una densidad nuclear de 2-4 núcleos en la capa nuclear externa, mientras que las retinas fotoexpuestas con una protección de un 20% de filtros bloqueantes de longitud de onda corta, presentaron un densidad de 10-12 núcleos, comparable a las retinas control, lo que indica el efecto compensador de los elementos ópticos.



Ratas pigmentadas Foto-expuestas a iluminación exenta de longitudes de onda corta



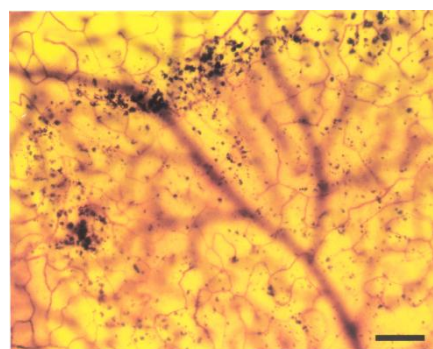
Sección transversal del globo ocular de rata.



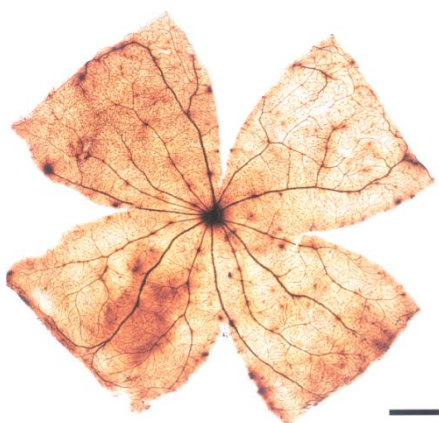
Secciones histológicas de retina. Comparación de un OI con filtro tipo 2 y un OD Control



Fotomontaje de una retina izquierda de rata adulta. 1 día después del periodo de fotoexposición. En ella podemos observar más oscura el área que más precozmente se afecta por la fototoxicidad y que se ha llamado área arciforme.



Micrografía de un extremo del área arciforme de degeneración fototóxica de una retina izquierda del grupo de animales fotoexpuestos sin filtro, montada a plano 7 días después de la fotoexposición. En ella podemos observar células del epitelio pigmentario intrarretinianas. Barra=125µm



Reconstrucción fotográfica de un montaje global de una retina derecha representativa del grupo control o sin exposición. En ella se pueden observar los vasos retinianos marcados con peroxidasa. Barra=1mm.

Resultados:

La exposición de ratas hembras L-H adultas a 3000 lux de luz blanca fría fluorescente durante 72 horas tras la dilatación produce:

- Ruptura de la barrera remoto-retiniana en la región arciforme de la zona supertemporal de la retina que es mayor el primer día de foto exposición y que disminuye a los siete días.
- Una migración de las células del epitelio pigmentario hacia las capas de la retina neurosensorial en esta área arciforme a los siete días de foto exposición.
- Un adelgazamiento de la capa nuclear externa de la retina por muerte de fotorreceptores . la muerte solo ocurre en la zona dorsal media superior un día tras el periodo de exposición y de forma mas severa y en toda la retina a los 7 días.

La interposición del filtro reduce la intensidad de la luz que llega a los animales hasta valores de 791 lux y protege la retina de la fototoxicidad.

Estos trabajos **han permitido demostrar la utilidad de filtros ópticos específicos para la terapia y prevención de la ceguera en procesos de neurodegeneración** dando respuesta a objetivo general de la investigación

Se han alcanzado todos los objetivos específicos propuestos de forma satisfactoria

- Se han foto-expuesto animales de experimentación (conejos y ratas pigmentadas) **consiguiendo establecer patrones de normalidad** y patología de retinas expuestas a diferentes longitudes de onda
- Con los **análisis fisiopatológicos realizados se han cuantificado la degeneración** y pérdida de fotorreceptores en animales expuestos a fototoxicidad
- **Se han corroborado los resultados** de los cambios funcionales debido a la fototoxicidad estudiados en los análisis fisiopatológicos **mediante técnicas de electrofisiología** en animales de foto-expuestos y foto-protegidos
- **Se ha evaluado efecto protector de los filtros ópticos para evitar proceso degenerativo** tanto en lentes de contacto como en lentes intraoculares

En definitiva los resultados han proporcionado importantes datos aclaratorios sobre la relación entre fototoxicidad y los filtros protectores.