UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

"Foto-transducción Mediada Por Melanopsina En Células de La Retina De Pollo"

Andres Alberto Hernández Clavijo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2013

Foto-transducción Mediada Por Melanopsina En Células de La Retina De Pollo

Andres Alberto Hernández Clavijo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Biología

Directora:
PhD. María del Pilar Gómez

Codirector:
PhD. Enrico Nasi

Línea de Investigación:
Fisiología Sensorial
Grupo de Investigación:
Grupo de Neurofisiología celular
Biofísica de la señalización celular

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2013

A mis fantásticos profesores María del Pilar Gómez y Enrico Nasi, por su agrado y excelencia en la labor docente, su disposición continúa de compartir el conocimiento, su apoyo incondicional para resolver las dudas y en por un sinfín de cualidades que llenaría varias páginas. A mi padre, madre y hermanos, que siempre están dando un fuerte apoyo emocional y creyendo en mí. A mi princesa Francy, la persona que más sufrió por mi trabajo de laboratorio, por su apoyo inmenso y por ser la compañía de mi vida.

"El estudio no se mide por el número de páginas leídas en una noche, ni por la cantidad de libros leídos en un semestre. Estudiar no es un acto de consumir ideas, sino de crearlas y recrearlas"

Paulo Freire.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por haberme brindado la posibilidad y los recursos para realizar mis estudios. Al Centro Internacional de Física, por su apoyo en administración e infraestructura. A los profesores María del Pilar Gómez y Enrico Nasi por su orientación y apoyo en el desarrollo del trabajo y discusión. A Jorge Ramírez y Kevin González por su colaboración en la realización de los experimentos y discusión.

Resumen

Las funciones de visión no especial como la regulación del ciclo circadiano y el reflejo pupilar son mediados por una subpoblación de células ganglionares de la retina (ipRGC), que utilizan el fotopigmento melanopsina. En mamíferos, la baja cantidad de células ipRGCs en la retina y su difícil identificación han dificultado el estudio de su cascada de señalización. En la retina de pollo la melanopsina es altamente expresada en la capa nuclear interna, sugiriendo que este organismo es un buen modelo para el estudio de la foto-transducción por melanopsina. Se usó Inmunodetección para identificar las células que expresan la melanopsina y su funcionalidad fue evaluada mediante electrofisiología e indicadores de calcio fluorescentes. Se observó un incremento en la fluorescencia de calcio en células bipolares y horizontales en repuesta a una estimulación lumínica; La respuesta exhibe una latencia larga y un curso temporal lento. Estas observaciones indican que la fotosensibilidad intrínseca no es exclusiva de conos, bastones y algunas células ganglionares, sino que se extiende a otros tipos de células retinales. Su importancia fisiológica sigue pendiente de ser investigada.

Palabras Clave:

Melanopsina, Retina de pollo, Foto-transducción, Célula bipolar, Célula horizontal.

Abstract

Light-dependent nonvisual functions like circadian rhythms and the pupillary light reflex are mediated by a subpopulation retinal ganglion cells (ipRGC), which utilize the photopigment Melanopsin. In mammals, the low density of ipRGCs and their difficult identification has hampered the study of their transduction mechanisms. In the chicken retina melanopsin is highly expressed in the inner nuclear layer, suggesting that this may be a convenient model to study melanopsin transduction. Immunodetection was used to identify melanopsin expressing cells, and their functionality was examined with electrophysiological recordings and fluorescent calcium indicators. A Ca fluorescence increase in selected bipolar and horizontal cells was observed in response to light stimulation; the response exhibits a long latency and a slow time course, spanning minutes. These observations indicate that intrinsic photosensitivity is not confined to rods, cones, and some ganglion cells, but extends to additional retinal cell types. The physiological significance remains to be investigated.

Key Words:

Melanopsin, Chicken retina, Phototransduction, Bipolar cell, Horizontal cell.

Contenido

Resumen.....IX

Lista de Figuras.....XII

Introducción.....1

1. Metodología **.....13**
1.1 Modelo de estudio: 13
1.2 Electrofisiología: 14
1.3 Anticuerpos: 15
1.4 Cortes de retina: 16
1.5 Inmunohistoquímica: 16
1.6 Inmunocitoquimica: 17
1.7 Seguimiento de la concentración de calcio Intracelular: 17
1.8 2-APB 19

2. Resultados **.....21**
2.1 Disociación de células de la retina: 21
2.2 Viabilidad de las células aisladas enzimáticamente 23
2.3 Melanopsina en retina de embriones de pollo: 25
2.4 Funcionalidad y señalización de la melanopsina: 31
2.4.1 Aumento de calcio citosolico: 31

3. Discusión **.....41**
3.1 Retinas de embrión de pollo como modelo para el estudio de la melanopsina. 41
3.2 Melanopsina funcional en células de la capa nuclear interna de la retina. . . . 42
3.3 Cascada de fosfoinositidos en la señalización de melanopsina. 43

4. Conclusiones y recomendaciones **.....47**
4.1 Conclusiones 47
4.2 Recomendaciones 47

5. Bibliografía **.....48**

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Estructura de la retina..... 2
Figura 2. Proyecciones de las células ganglionares de la retina. 5
Figura 3. Secuencia de aminoácidos deducida y estructura secundaria predicha de la melanopsina y su relación filogenética con otras opsinas.. 8
Figura 4. Diagrama equipos para estimulación y registro de células 19
Figura 5. Microfotografias de células aisladas. 21
Figura 6. Registros de corrientes en células aisladas. 24
Figura 7 Corrientes de entrada y salida en células aisladas.....25
Figura 8. Western Blot antiMelanopsina.....27
Figura 9. Alineamiento secuencias de Gq y Western blot xGq 28
Figura 10. Inmunohistouímica. 29
Figura 11. Inmunocitoquímica 30
Figura 12. Respuesta de Ca^{2+} en célula bipolar y célula horizontal 33
Figura 13. Trazos representativos de los tres tipos de respuestas. 34
Figura 14. Promedio aumento transitorio de calcio. 34
Figura 15. Promedio aumento transitorio largo de calcio.....35
Figura 16. Promedio aumento sostenido de calcio 35
Figura 17. Relación tipo de respuesta con tipo de célula 37
Figura 18. Relación tamaño de la célula Vs respuesta.....38
Figura 19. Respuesta en bajo calcio extracelular 39
Figura 20. Efecto del 2-APB en la respuesta a la luz. 40

Introducción

La visión es la capacidad de interpretar nuestro entorno gracias a los rayos de luz que alcanzan el ojo. En vertebrados, la región especializada en captar la luz y transmitir la señal al cerebro es la retina, que se encuentra compuesta de diversos tipos de células acomodados en varias capas: la capa más distal (cercana al epitelio pigmentado) es la Capa Nuclear Externa (CNE) donde se alojan los fotoreceptores convencionales, conos y bastones, que reciben la luz y transforman la señal en un cambio de potencial de membrana; más abajo se encuentra la Capa Nuclear Interna (CNI) donde se alojan las células bipolares, horizontales y amacrinas, encargadas recibir y modular la señal proveniente de los conos y bastones, y transmitirla hacia las células ganglionares ubicadas en la capa más proximal de la retina denominada Capa de Células Ganglionares (CCG). Las capas nucleares interna y externa se encuentran separadas por la Capa Plexiforme Externa (CPE), compuesta por los procesos de conos, bastones y células bipolares y horizontales. La capa nuclear interna está separada de la capa de células ganglionares por la Capa Plexiforme Interna (CPI) conformada por procesos de células bipolares, amacrinas y ganglionares (Ver figura 1).

En conos y bastones la recepción de la luz desencadena una serie de procesos que finalizan con la hiperpolarización del potencial de la membrana celular. En la oscuridad el fotoreceptor se encuentra relativamente despolarizado, con un potencial de membrana cercano a -40mV; esta despolarización se debe al estado abierto de canales iónicos presentes en la membrana del segmento externo de la célula, los cuales permiten el ingreso de iones de Ca^{2+} y Na^{+}, reduciendo el grado de negatividad interno. La apertura de estos canales se encuentra regulada por la presencia del nucleótido guanosin-monofosfato cíclico (cGMP).

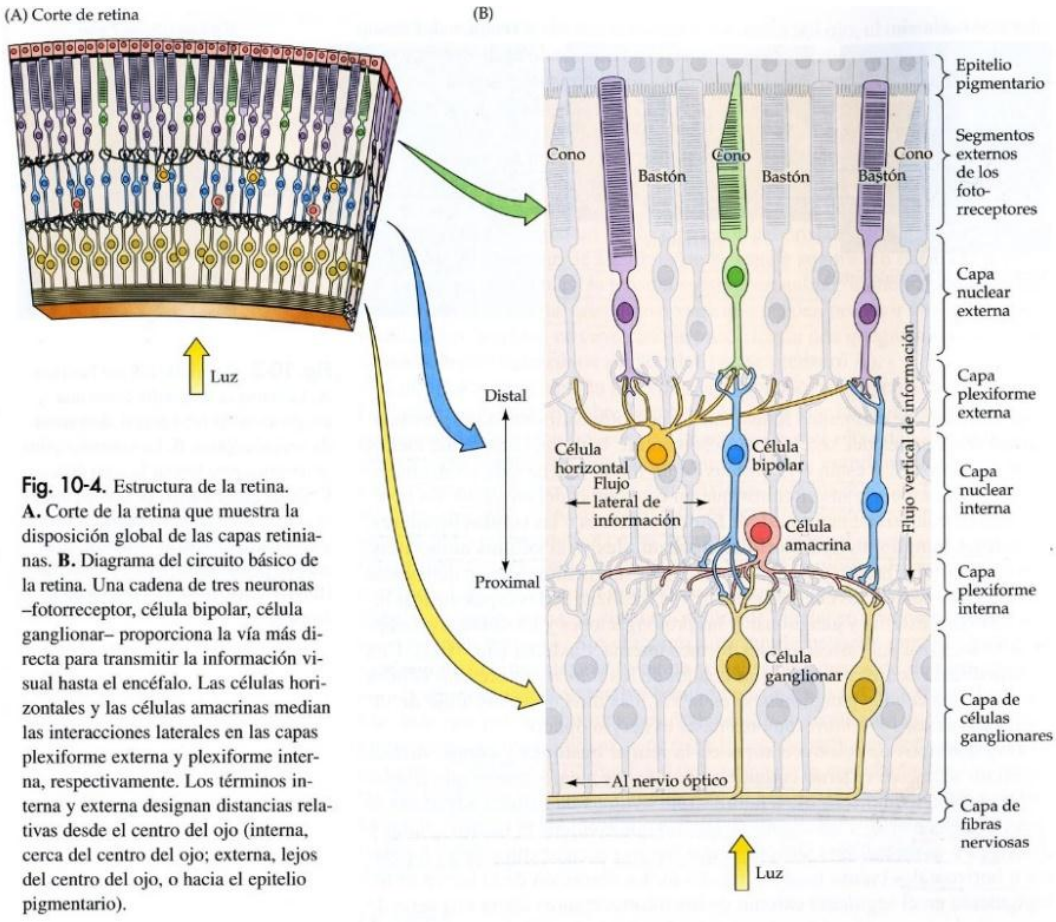


Fig. 10-4. Estructura de la retina. **A.** Corte de la retina que muestra la disposición global de las capas retinianas. **B.** Diagrama del circuito básico de la retina. Una cadena de tres neuronas –fotorreceptor, célula bipolar, célula ganglionar– proporciona la vía más directa para transmitir la información visual hasta el encéfalo. Las células horizontales y las células amacrinas median las interacciones laterales en las capas plexiforme externa y plexiforme interna, respectivamente. Los términos interna y externa designan distancias relativas desde el centro del ojo (interna, cerca del centro del ojo; externa, lejos del centro del ojo, o hacia el epitelio pigmentario).

Figura 1. Estructura de la retina. Tomado de: (Purves *et al.,* 2004).

La molécula encargada de absorber la luz e iniciar la señalización celular es el fotopigmento, que consiste en una apoproteína, la opsina, que mantiene covalentemente unido un cromóforo, retinaldehido; en presencia de la luz, el cromóforo se foto-isomeriza de su conformación 11-*cis* a todo-*trans,* y, de esta manera genera un cambio conformacional en la opsina; este cambio hace que se expongan los sitios de la opsina que interactúan con la subunidad alfa de la proteína G de tipo t (Transducina) generando que se intercambie GDP por GTP en su subunidad alfa. La subunidad alfa de la transducina es liberada y activa una fosfodiesterasa que hidroliza cGMP generando una disminución de su concentración; al haber menos moléculas disponibles para unirse a los canales, estos se cierran ocasionando la hiperpolarización del potencial de membrana, que se satura en un nivel cercano a los -65mV. Esta hiperpolarización conlleva al cierre de canales de calcio voltaje dependientes en las terminaciones sinápticas. Al disminuir el calcio en la terminal sináptica, se disminuye la fusión de vesículas a la membrana pre-sináptica, y por ende la liberación del neurotransmisor glutamato (Provencio *et al.,* 1998, Purves *et al.,* 2004).

La vía más directa para el flujo de información desde los foto-receptores hasta el nervio óptico involucra tres tipos de células: Foto-receptores, bipolares y ganglionares. La

hiperpolarización del potencial de membrana de los foto-receptores cambia la tasa de liberación del neurotransmisor hacia las células con las que hace contacto en la capa plexiforme externa (bipolares y horizontales). Las células bipolares existen de dos tipos "ON" y "OFF"; las primeras se encuentran hiperpolarizadas por efecto del neurotransmisor glutamato liberado desde los foto-receptores en oscuridad; una vez llega la luz, se detiene la liberación de glutamato y se despolariza la célula bipolar. Por el contrario, las bipolares "OFF" se mantienen despolarizadas por acción del glutamato y en ausencia de este se hiperpolarizan. Estos efectos contrarios del glutamato sobre los dos tipos de células bipolares se deben a la expresión de receptores diferentes en sus membranas post-sinápticas; en las bipolares de tipo "ON" se expresa un receptor de glutamato metabotrópico que al unirse a su ligando, desencadena una cascada de señalización que finalmente disminuye una conductancia de entrada de cationes e hiperpolariza la membrana celular. Por otro lado las bipolares de tipo "OFF" expresan en la membrana post-sináptica un receptor de glutamato ionotrópico que al unirse a su ligando deja pasar iones Na^+ y Ca^{2+} que despolarizan la célula.

Las células bipolares hacen contacto directo con las células ganglionares en la capa plexiforme interna. Los axones mucho más grandes de las células ganglionares forman el nervio óptico y envían la información acerca de la estimulación retiniana al resto del sistema nervioso central.

La forma como los humanos construimos una representación de lo que nos rodea es la visión espacial. La luz proveniente del exterior es recibida por los foto-receptores y pasada, a través de la vía previamente explicada, a las células ganglionares que dan originen a los axones del nervio óptico. Estos realizan un recorrido directo hasta el quiasma óptico en la base del diencéfalo; allí cerca del 40% de estas fibras cruzan al lado opuesto, mientras que el otro 60% continúan ipsilateralmente hasta puntos diana en el mesencéfalo y el tálamo. Posterior al quiasma, a cada lado se forma el tracto óptico que contiene axones provenientes de los dos ojos. La estructura principal a donde llegan los axones del tracto óptico es el núcleo geniculado dorsolateral del tálamo. Las neuronas del núcleo geniculado lateral envían sus axones hacia la corteza cerebral, denominada corteza visual primaria o corteza estriada, ubicada en el lóbulo occipital; es allí donde se realiza la mayor parte del procesamiento de lo que se denomina visión espacial. La proyección retino-geniculo-estriada (la vía visual primaria) está organizada topográficamente de modo que las estructuras visuales centrales contengan un mapa organizado del campo visual. Las células de la corteza estriada están diferencialmente especializadas en la longitud, orientación o movimiento de los bordes de los objetos en el exterior. Así, un punto en el espacio visual se relaciona con un conjunto de neuronas corticales, cada una de las cuales está especializada en el procesamiento de un conjunto limitado de atributos del estímulo visual.

Adicional a la visión espacial existen otros procesos de foto-recepción que no están involucrados en la formación de imágenes, como el reflejo pupilar o la regulación del ciclo circadiano. El ciclo día/noche o ciclo circadiano se refiere a la ritmicidad de 24 horas que

presentan la mayoría de los eucariotas. Se presume que los ritmos circadianos se desarrollaron para mantener periodos controlados de vigilia y sueño. Para sincronizar los procesos fisiológicos del ciclo día/noche (denominado foto-entrenamiento), el reloj biológico debe detectar las disminuciones en la cantidad de luz al caer la noche y el aumento de luz al amanecer (Van Gelder 2001). Esta ritmicidad generada por la activación de las células de núcleo supraquiasmático, controla numerosas funciones, incluyendo los ciclos de actividad-sueño, la temperatura corporal y la liberación pulsátil de hormonas.

El flujo de información que regula los procesos involucrados en la visión no formadora de imágenes sufre un recorrido diferente al de la visión espacial. El núcleo supraquiasmático del hipotálamo es inervado por fibras del tracto óptico y envía sus axones hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo. Este a su vez controla las neuronas preganglionares que finalmente proyectan hacia la glándula pituitaria, donde se sintetiza la neuro-hormona promotora del sueño denominada melatonina.

Otra vía de flujo de información en la visión no espacial es la que utiliza el reflejo pupilar, controlado por la región pretectal; esta es inervada por los axones del tracto óptico. Las neuronas de la región pretectal, envían la señal hacia el núcleo de Edinger-Westphal, cercano al nervio óculo-motor. Las neuronas del núcleo de Edinger-Westphal envían axones a través del nervio óculo-motor para terminar en las neuronas del ganglio ciliar que controlan los músculos ciliados encargados de la contracción pupilar (Figura 2).

Se ha reportado que animales con lesión en el núcleo supraquiasmático pierden toda ritmicidad de comportamiento. Al trasplantar tejido del núcleo supraquiasmático a estos ratones, se genera la total recuperación de la ritmicidad. Estos estudios muestran que el núcleo supraquiasmático es tanto necesario como suficiente para la determinación del ritmo circadiano (Van Gelder 2001).

Tradicionalmente se había atribuido la posibilidad de responder a la luz, únicamente a los conos y bastones de la retina, incluyendo tanto señalización de visión espacial como no espacial. Se sabía también, que la perdida de los ojos, tanto en humanos como en otros mamíferos, conllevaba a la eliminación de la visión espacial y del fotoentrenamiento, demostrando que el ojo provee la primera fuente de información de la luz (Foster 1998). Sorpresivamente, cuando en 1999 Freedman y colaboradores, usando un ratón con degeneración total de conos y bastones "*rdta/Cl*", (el cual expresaba la toxina diftérica bajo el promotor de rodopsina de conos y bastones) encontraron que en ausencia de los foto-receptores tradicionales se mantenían la regulación del ciclo circadiano, y otras funciones de visión no espacial, como el reflejo pupilar (Whiteley *et al.,* 1998). Este resultado también fue observado en pacientes ciegos por degeneración completa de conos y bastones en los que se mostró que retenían el reflejo pupilar y la regulación del ciclo circadiano (Klerman *et al.,* 2002).

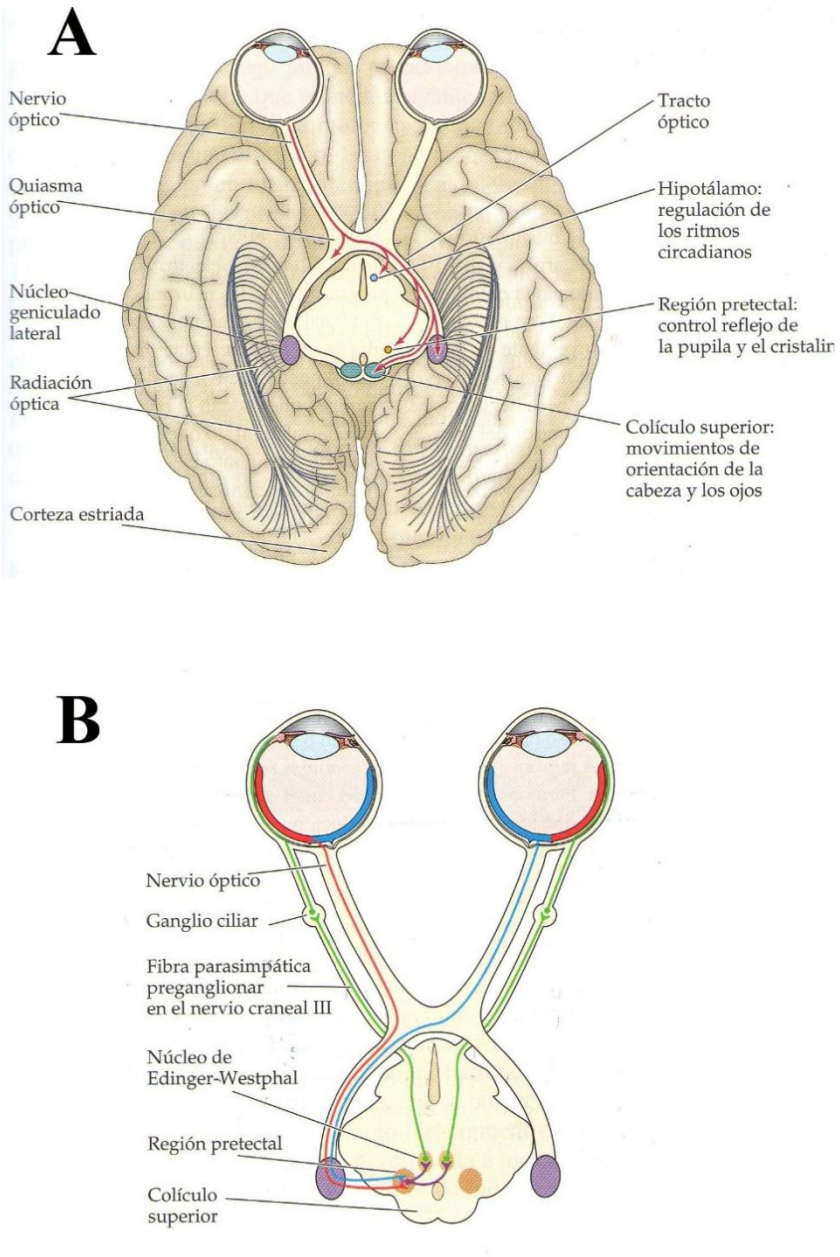


Figura 2. A. Proyecciones centrales de las células ganglionares de la retina. B. circuito responsable del reflejo pupilar. Tomado de: (Purves *et al.,* 2004)

Estos estudios, que indican la prevalencia de visión no espacial en animales y humanos con degeneración completa de conos y bastones, sumados a reportes que muestran que la enucleación bilateral en roedores elimina por completo la visión no espacial (Freedman *et al.,* 2009), sugieren la existencia de foto-receptores diferentes a conos y bastones dentro del ojo. Conociendo que el centro regulador del ciclo circadiano es el núcleo supraquiasmático el cual, por lo tanto, debe recibir proyecciones de estos nuevos foto-receptores, Berson y colaboradores en 2001 desarrollaron una estrategia para identificarlos. Esta consistió en utilizar microesferas de látex marcadas fluorescentemente con Rodamina y/o fluorescina, e inyectarlas en el hipotálamo, específicamente en el

núcleo supraquiasmático; estas esferas, son internalizadas por fibras neuronales y pueden ser transportadas retrógradamente en su interior, permitiendo marcar el soma de las células que las originan. De esta manera se pudo comprobar que las esferas fluorescentes marcaron únicamente una pequeña subpoblación de células ganglionares de la retina (cerca del 1%). Una vez identificada esta población de células ganglionares que inervan el núcleo supraquiasmático era válido preguntarse si son estas células capaces de transducir la luz o son encargadas simplemente de transmitir la señal proveniente de otras células que hacen contacto sináptico con ellas. Para investigar si estas células ganglionares constituyen foto-receptores primarios no convencionales, Berson y colaboradores las aislaron de toda conexión sináptica; inicialmente esto se logró inhibiendo toda posible actividad pre-sináptica con la presencia de cobalto extracelular, que bloquea los canales de calcio voltaje-dependientes y de esta manera impide la liberación final de neurotransmisor. Además, el bloqueo por cobalto fue acompañado por la aplicación de fármacos específicos que bloquean los receptores iontrópicos post-sinápticos en las sinapsis glutamatergicas identificados en la señalización interna de la retina. Debido a que el bloqueo farmacológico podría ser insuficiente, no se puede tener certeza de que en rodajas de tejido una célula determinada sea totalmente libre de influencias sinápticas. Para evitar la posible acción de sinapsis no bloqueadas por los fármacos Berson y colaboradores también llevaron a cabo experimentos en los cuales se disociaron completamente las células marcadas por medio de microdisección. En ambos tipos de acercamiento se pudo comprobar por registros electrofisiológicos que las células marcadas responden a una estimulación con luz. De esta manera determinaron contundentemente que estas células son intrínsecamente fotosensibles, y las denominaron Células Ganglionares de la Retina Intrínsecamente Fotosensible (ipRGC por su sigla en inglés) (Berson *et al.,* 2001).

Para nuevas sorpresas de los investigadores, las características de la respuesta a la luz en las ipRGCs difiere de las respuestas conocidas a la luz en vertebrados (conos y bastones). La iluminación de ipRGCs produce una despolarización de su potencial de membrana, contrario a la respuesta de hiperpolarización que presentan conos y bastones; además, estas células presentan una muy baja sensibilidad, respondiendo únicamente a luces muy fuertes y prolongadas (luces de 15 segundos con intensidad de aproximadamente $1x10^{17}$ fotones/s*cm^2), y responden con una latencia muy larga, alcanzando el máximo de su respuesta a los 20 segundos después de iniciado el estímulo (Berson *et al.,* 2001). Estas características son consistentes con su rol de regular procesos como el ciclo circadiano, que requiere responder poco a estímulos cortos y presentar un periodo de integración largo.

Ahora bien, conociendo las características de la respuesta a la luz en las ipRGCs el paso a seguir fue conocer el espectro de absorción del fotopigmento presente en estas células. Un espectro de absorción indica cual rango de longitudes de onda es absorbido preferencialmente por el fotopigmento. En los humanos el espectro de absorción de la rodopsina de bastones presenta un máximo pico de absorción a una longitud de onda

cercana a los 500nm. Los conos, responsables de la visión a color, presentan tres tipos de rodopsina con diferentes picos de absorción: 564–580 nm, 534–545 nm, y 420–440 nm (Kandel *et al.,* 2000). Para el caso de las ipRGC se encontró que presentan un espectro de absorción con un pico cercano a los 484nm de longitud de onda, espectro que no coincide con ninguno de los de las opsinas funcionales conocidas hasta el momento en retinas de vertebrados (Berson *et al.,* 2001). Este resultado, unido al hecho de que en ratones con mutación de la rodopsina se mantienen funciones visuales como el ciclo circadiano y el reflejo pupilar (Van Gelder 2001), llevó a postular que posiblemente las ipRGCs utilizan un nuevo tipo de opsina para transducir la luz.

En 1998 Provencio y colaboradores, estudiando la migración de los melanóforos de piel de anfibio *Xenopus laevis,* identificaron una nueva opsina, a la cual denominaron Melanopsina. Inicialmente se conocía que los melanóforos eran fotosensibles y migraban en respuesta a la luz; que su fotosensibilidad es reactivada por la acción de retinaldehidos (Rollang 1996) y que absorben luz en longitudes de onda similares a las de las opsinas (Daniolos *et al.,* 1990), es decir, en el espectro de luz visible. Esto difiere de otras moléculas fotorreceptoras como los criptocromos que absorben luz preferencialmente en el azul profundo o ultravioleta, entre 350 y 450 nm de longitud de onda. Para tratar de identificar la posible opsina involucrada en la migración de los melanóforos, Provencio y colaboradores analizaron la inmunoreactividad de extractos de proteínas de melanóforos, a un anticuerpo generado contra rodopsina bovina y se pudo identificar la expresión de una posible opsina en estas células. Utilizando una librería de cADN que contiene las secuencias de todos los transcritos sintetizados por una célula listos para ser traducidos (mARN), se encontró una secuencia con homología a opsinas. Esta secuencia aislada presenta características básicas de opsina como son: 1) siete dominios transmembrana, 2) una Lisina en la posición 294 que podría servir como sitio de unión del cromóforo por medio de una base de Schiff y 3) un par de cisteínas en el segundo y tercer bucle que le sirven para estabilizar la estructura terciaria. Sin embargo, aunque esta opsina es de origen vertebrado, por medio de análisis filogenéticos, se encontró que presenta una mayor homología con las opsinas de invertebrados (38% de homología con rodopsina de Octopus vs 32% de homología con rodopsina bovina); en particular, esta opsina presenta un residuo aromático (Tyr-103) que podría estar involucrado en la estabilización de la base de Schiff (Provencio *et al.,* 1998) (Figura 3). Además de su expresión en melanóforos dermales, se encontró por medio de la técnica de hibridización *in situ* que esta nueva opsina se expresaba en otros tejidos como en el núcleo supraquiasmático, el iris, el epitelio pigmentado, y en la capa nuclear interna de la retina donde se cree no se alojan células fotorreceptoras (Provencio *et al.,* 1998).

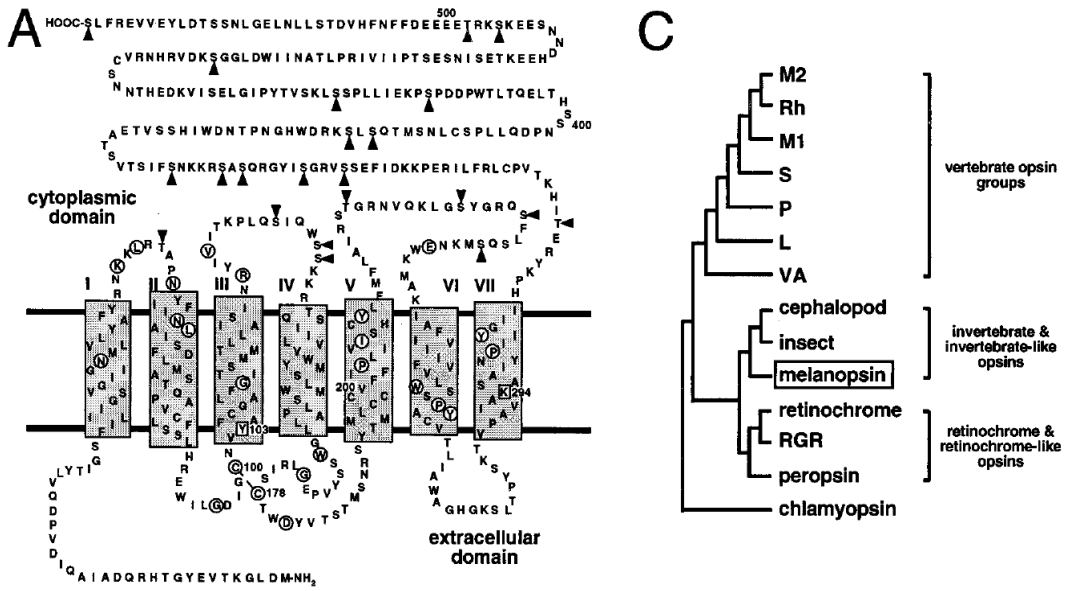


Figura 3. Secuencia de aminoácidos deducida y estructura secundaria predicha de la melanopsina y su relación filogenética con otras opsinas. Tomado de: (Provencio *et al.,* 1998).

Con el hallazgo de la melanopsina en la capa interna de la retina de anfibios (Provencio *et al.,* 1998), peces (Soni *et al.,* 1998), humanos y ratones (Provencio *et al.,* 2000), una conjetura plausible era que existiera una relación específica entre la melanopsina y las ipRGCs en retinas de mamíferos. La confirmación que las ipRGCs expresan el fotopigmento melanopsina y que es esta opsina la que media la recepción de la luz, llegó por investigaciones realizadas por dos grupos: Primero, Hattar y colaboradores en 2002 llevaron a cabo un doble marcaje para melanopsina y para las células que inervan el NSQ: usando la secuencia clonada de la melanopsina a partir de cADN de retina, generaron anticuerpos policlonales contra las terminaciones amino y carboxilo de la proteína predicha. Con esta técnica se identificó un pequeño grupo de células ganglionares de la retina que expresan la proteína. Para determinar si esta población de células ganglionares es la misma subpoblación que proyecta sus axones al núcleo supraquiasmático, insertaron el constructo Taulac Z, que codifica para β-Galactosidasa unida a una proteína de asociación a actina, en el locus que codifica para la melanopsina; de esta forma las células que expresan la melanopsina ahora expresan la β-Galactosidasa. Si se adiciona el sustrato X-Gal la β-Galactosidasa lo degrada y genera un precipitado azul, marcando de esta manera las células que expresaron la β-Galactosidasa que por ende son las que expresan la melanopsina. De esta manera, al observar preparaciones de retina, tracto óptico y núcleo supraquiasmático al microscopio óptico encontraron que las células que expresan la melanopsina son la misma subpoblación intrínsecamente fotosensible que proyecta sus axones al núcleo supraquiasmático (ipRGC) (Hattar *et al.,* 2002).

Al reportar que las ipRGCs expresan el fotopigmento melanopsina fue necesario saber si este fotopigmento es necesario para la recepción de la luz. Para dilucidar el papel de la

melanopsina en la señalización de la luz en las ipRGCs Lucas y colaboradores en 2003 usaron los ratones a los cuales se les había introducido el gen TaulacZ (Hattar *et al.,* 2002) en el locus de la melanopsina (ratones Knock-Out para melanopsina) y estudiaron la respuesta a la luz en las ipRGCs marcadas retrógradamente desde el núcleo supraquiasmático. De esta manera observaron que las células que inervan el núcleo supraquiasmático, es decir, las intrínsecamente fotosensibles, pierden toda capacidad de responder a la luz cuando está ausente la melanopsina, pero mantienen aún su morfología, proyecciones y excitabilidad eléctrica características. Se confirmó así que la melanopsina es el fotopigmento encargado de recibir la luz e iniciar la señalización en las ipRGCs (Lucas *et al.,* 2003).

Puesto que la foto-respuesta de las células ganglionares retinales intrínsecamente fotosensibles difiere en su polaridad a la de conos y bastones, (como ya se ha dicho, las ipRGCs presentan una despolarización del potencial de membrana mientras que los conos y bastones presentan una hiperpolarización del potencial de membrana) las respectivas cascadas de señalización necesariamente han de ser diferentes. Es lógico, por lo tanto, intentar identificar la cascada de señalización que desencadena la melanopsina luego de su activación por la luz. En el estudio de la Foto-transducción de la melanopsina es donde se han presentado mayores dificultades. Debido a que en mamíferos solo cerca del 1% de las células ganglionares expresan melanopsina y estas células no se diferencian morfológicamente de otras células ganglionares, ha sido muy difícil llevar a cabo estudios robustos que muestren los posibles pasos en la cascada de Foto-transducción. En algunas instancias se han utilizado estrategias para marcar las ipRGC y diferenciarlas fácilmente, por ejemplo la ya mencionada marcación retrograda fluorescente desde el núcleo supraquiasmático (Berson *et al.,* 2002) o la expresión de proteínas fluorescentes bajo el control del promotor de la melanopsina, generando organismos transgénicos con ipRGC fluorescentes (Do *et al.,* 2008). Estas estrategias, sin embargo, conllevan un trabajo arduo y largo, así como costos elevados, lo que dificulta ulteriormente agilizar el estudio de la cascada de señalización de la melanopsina.

Aunque el estudio de la melanopsina se ha centrado principalmente en mamíferos, nuevas secuencias ortólogas a la melanopsina han sido encontradas en una gran variedad de vertebrados como peces (Bellinghan *et al.,* 2002; Drivenes *et al.,* 2003), aves (Chaurasia *et al.,* 2005) y reptiles (Frigato *et al.,* 2006). Dos tipos de melanopsinas han sido encontrados: una forma ortóloga a la melanopsina de *Xenopus*, denominada *Opn4x*, presente en los peces, reptiles, aves y anfibios, pero ausente en los mamíferos. Y un segundo tipo de melanopsinas ortólogo a la melanopsina de mamíferos, denominado *Opn4m,* presente en los peces, aves, anfibios, reptiles y mamíferos. Como las secuencias de estos dos tipos de melanopsina se encuentran en cromosomas separados, indica que son dos genes separados (Bellingham *et al.,* 2006). La presencia de dos distintos genes de melanopsinas en tres clases separadas de vertebrados, unido al hecho de que el cordado basal Anfioxo expresa también una secuencia ortóloga a la melanopsina

(Koyagani *et al.,* 2005), indicarían que este fotopigmento precede a la separación entre vertebrados e invertebrados (Koyagani *et al.,* 2006).

Adicionalmente, se han observado diferencias en la distribución celular de la melanopsina: en peces y aves este fotopigmento se encuentra ampliamente expresado en la capa nuclear interna de la retina, donde se alojan células bipolares, horizontales, amacrinas y gliales (Bailey *et al.,* 2005, Chaurasia *et al.,* 2005, Tomonari *et al.,* 2005, Lima *et al.,* 2006). La abundancia de la expresión, hace que estos organismos puedan constituir buenos modelos de estudio para descifrar la cascada de señalización de la melanopsina, obviando la escasez y la difícil identificación de las ipRGCs en los mamíferos. Específicamente se ha reportado que la retina de pollo *Gallus gallus* expresa de manera abundante la melanopsina en sus diferentes capas celulares, desde estadios embrionarios (E10) hasta varios días después de la eclosión (P30) (Tomonari *et al.,* 2005).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar qué tipos de células de la retina de *Gallus gallus* expresan el fotopigmento melanopsina, verificar la funcionalidad del fotopigmento en dichas células, caracterizar el tipo de respuesta a la luz y esbozar posibles pasos en la cascada de señalización. Para evitar toda posible interferencia sináptica en las respuestas a ser medidas, se hace necesario usar células disociadas y aisladas de toda interacción con otras células. Para este propósito es más favorable el uso de organismos en estadios embrionarios con menos tejido conectivo y fácil de disociar por métodos enzimáticos, facilitando la retención de su morfología.

Para el estudio de la cascada de señalización desencadenada por la melanopsina se tendrán como antecedentes no solo los resultados en mamíferos, sino también los estudios de transducción por melanopsina en el Anfioxo, el cordado basal más primitivo. En este organismo, la melanopsina activada interactúa con una proteína G de tipo q, haciendo que se disocie su subunidad alfa y está activa una fosfolipasa C de tipo β (PLC-β) (Angueyra *et al.,* 2012). Esta enzima tiene como blanco fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), un fosfolípido minoritario presente en la hoja interna de la membrana plasmática. La PLC corta un enlace justo debajo de un grupo fosfato del PIP_2 generando Diacilglicerol (DAG), que se queda anclado a la membrana, e Inositol trifosfato (IP_3) que difunde por el citoplasma. A cada uno de los productos de la hidrólisis del PIP2, IP3 y DAG, se le han encontrado funciones bio-activas: el IP3 se difunde hasta el retículo endoplasmático (RE) donde activa receptores específicos (IP3R) que median la liberación de Ca^{+2} hacia el citosol; el DAG, en cambio se queda anclado a la membrana y puede activar la Proteina Kinasa C (PKC) que fosforila proteínas y puede modificar la fisiología de la célula. El eslabón final de la vía se señalización en la foto-recepción mediada por la melanopsina en Anfioxo involucra la activación de canales iónicos los cuales median el potencial de receptor (Angueyra *et al.,* 2012). El mismo esquema opera en las células visuales de los ojos de insectos; en *Drosophila* se han identificado molecularmente los canales implicados. Estos forman parte de la súper-familia denominada TRP (Transient Receptor

Potencial). Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual este último canal es activado, pero se presumen dos posibles activadores: la elevación del Ca^{+2} intracelular y el DAG como segundo mensajero (Angueyra *et al.,* 2012).

1. Metodología

1.1 Modelo de estudio:

Los huevos fertilizados de *Gallus gallus* fueron comprados en granjas cerca de la ciudad de Bogotá, Colombia. Para su desarrollo, los huevos fueron incubados en una incubadora modelo 6300 de Little Giant, a temperatura de 38°C +/- 0.5°C, con humedad constante y rotación continua de 4 ciclos por día.

Los embriones fueron tratados y sacrificados según las normas exigidas por el comité de ética del Centro Internacional de Física. Cuando el estadio de desarrollo excedía los 18 días (E18), los embriones fueron anestesiados con 0.5ml de tricaina 50mg/ml inyectada en la cámara de aire, 2 minutos antes de la ruptura de la cascara. Para facilitar la obtención de células aisladas por métodos enzimáticos, se utilizaron embriones entre los estadios E14 y E20, de acuerdo a la clasificación obtenida por Hamilton & Hamburger (1999) la cual se basa en la longitud del pico y del tercer dedo. Se trabajaron estos estadios de desarrollo debido a que las células de la retina ya son identificables y la melanopsina ya se expresa en la capa nuclear interna (Tomonari *et al.,* 2005, Bailey *et al.,* 2005).

Para la extracción de la retina, primero se abre la cámara de aire del huevo, se extrae el embrión y se decapita rápidamente. Uno de los dos ojos es enucleado, y con tijeras de micro-disección se retiran la córnea y el iris. Posteriormente, se extrae el humor vítreo quedando expuesta la retina junto al epitelio pigmentado y la esclerótica. Con ayuda de pinzas de disección, se desprende totalmente la retina del epitelio pigmentado y se aísla completamente para su posterior utilización. Durante la disección, todos los tejidos se mantuvieron sumergidos en solución salina para pollo (NaCl 140mM, KCl 5mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 1.2mM, HEPES 10mM, Glucosa 10mM, pH 7.4).

Obtención de células disociadas por medio enzimático:

Un objetivo del presente estudio era identificar posibles células intrínsecamente fotosensibles, fuera de los foto-receptores ya conocidos. Para evitar artefactos de señalización originados por conexiones sinápticas en la célula que se está registrando, se hizo necesario el estudio en células aisladas. Para disociar las células, la retina recién extraída se sometió a la acción de las enzimas Pronasa a concentración de 5mg/ml y Tripsina a concentración de 1mg/ml, durante 10 a 15 minutos, dependiendo del día de desarrollo del embrión, a una temperatura de 32°C en un baño con temperatura

controlada. Posteriormente, para detener la acción de las enzimas evitando sobreexposición y posible daño del tejido, la retina se lavó dos veces en Suero Fetal Bovino (FCS) al 4% en solución salina para pollo. A continuación, la retina fue cortada en trozos de cerca de 2 x 2 mm y las células se disociaron mecánicamente mediante succión repetida con pipetas de vidrio pulidas a fuego. El sobrenadante fue recogido y trasladado a una cámara de flujo diseñada con fondo de vidrio, que permite la adhesión y observación de las células al microscopio óptico, y un sistema de intercambio de soluciones por medio de canales. Esta cámara de flujo era montada en el la platina de un microscopio invertido (Nikon modelo Diaphot). El vidrio de la cámara de flujo fue previamente -tratado con Concanavalina A (5 mg/ml en 1 M NaCl, 2-3 horas), una proteína que ayuda en la adhesión del tejido a la lámina de vidrio. La preparación se dejó reposar por 30 minutos en la cámara, luego de los cuales fue perfundida constantemente con solución salina oxigenada. En el iluminador del microscopio se interpuso un filtro infrarrojo, para evitar estimular las células previamente a los experimentos. Para poder visualizar las células en luz infrarroja, al microscopio se le adaptó una cámara CCD (Genwac) acoplada a un amplificador de contraste de video (Colorado Video Inc.) conectado a una pantalla de video (GBC).

1.2 Electrofisiología:

Una vez obtenidas las células disociadas y transferidas a la cámara de flujo, se procedió a determinar si retenían sus características fisiológicas. Se examinaron el potencial de membrana y las respuestas de las células a estímulos de voltaje mediante la técnica de Patch Clamp en modalidad célula completa. Esta técnica consiste en lograr continuidad entre el interior de la célula y un microelectrodo conectado a un conversor corriente-voltaje, lo cual permite controlar el voltaje de la membrana y simultáneamente medir la corriente que pasa a través de ella. Los electrodos se fabricaron con capilares de borosilicato calentando el centro del capilar y estirando los extremos con un "estirador" de pipetas (Narishige); para eliminar irregularidades que podrían impedir la formación del sello, la punta de la micropipeta fue pulida acercándola a un filamento candente bajo visualización microscópica y manipulación por medio de un micro-manipulador. La micropipeta fue llenada con solución que simulara la composición del citosol (KCl 20mM, Mg-ATP 2mM, Na-EGTA 0.1mM, Na-GTP 0.2mM, K-Glutamato 120mM, Hepes 10mM, pH 7.2); la resistencia de los electrodos se midió pasando un pulso de 10mV por el electrodo sumergido en el baño y registrando la corriente generada, y aplicando la ley de Ohm (R=V/I). Solo se usaron electrodos con resistencias entre 8 y 10 MΩ. Para aplicar la técnica de patch-clamp en modalidad de célula completa inicialmente se generó por medio de succión suave y continua, un sello entre la punta de la pipeta y la superficie de la membrana, tal que la resistencia entre el interior del electrodo y el baño fuera superior a 2 GΩ; seguido, se aplicó un pulso de succión fuerte para causar la ruptura de la región de membrana que separaba el interior de la célula con el interior del electrodo. Los registros fueron adquiridos por medio de un amplificador construido por el profesor

Enrico Nasi y pasados al computador por medio de un conversor análogo-digital (Data Translation). Para la estimulación y adquisición de los datos se usó el programa "Collect" y para el análisis se usó el programa "Analyze", ambos desarrollados también por el profesor Enrico Nasi.

Para el estudio de las corrientes generadas en respuesta a la aplicación de pasos de voltaje y evaluar la influencia de sodio y calcio extracelular se cambió la solución salina del baño a solución sin sodio (KCl 5mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 1.2mM, TRIS 150mM, Glucosa 10mM, pH 7.4) o solución con bajo calcio (NaCl 140mM, KCl 5mM, $CaCl_2$ 0.1mM, $MgCl_2$ 3.1mM, HEPES 10mM, Glucosa 10mM, pH 7.4). Para el estudio de la corriente de salida se usaron los clásicos bloqueadores de canales de potasio, 4-Amino-Piridina (4AP) en concentración de 5mM y Tetra-Etil-Amonio (TEA) en concentración 20 de mM disuelto en solución salina; estos fármacos se ha reportado bloquean específicamente canales de potasio que median las corrientes de salida en células de la retina en diversos organismos (Tachibana 1983, Malchow *et al.,* 1990, Yamashita & Wassle 2000).

1.3 Anticuerpos:

Para localizar e identificar las células que expresan la proteína Melanopsina, se fabricaron anticuerpos de conejo contra el péptido CEPAHEKLQPRRSHS; esta secuencia corresponde a los aminoácidos 375-389 de la isoforma 'corta' de la melanopsina de *Gallus* (secuencia ABX 10831.1, de NCBI), y también está presente en la isoforma 'larga' (ABX 10830.1). El anticuerpo fue fabricado por la compañía Gen Script.

Para la identificación de la proteína Gq se usó el anticuerpo monoclonal anti-Gq de Santa Cruz (sc-365906), realizado en ratón contra la secuencia total de la proteína Gq de humano, con número de acceso a la secuencia de la proteína: P29992 de la base datos NCBI. También se utilizó el anticuerpo monoclonal contra la secuencia QLNLKEYNLV correspondiente a la región carboxilo terminal de la proteína Gq/11 alfa de rata (Millipore).

Western Blot:

Para comprobar que los anticuerpos reconocían las proteínas de interés, se hicieron homogenizados de retina utilizando una solución de lisis (NaCl 100mM, EDTA 5mM, SDS 1%, Glicerol 20%, Tris 30mM, Coctel inhibidor de proteasas 0.5%, PMSF 0.5%, pH 7.4), y un homogenizador de vidrio-teflón. Luego se separaron las proteínas por medio de un gel de poliacrilamida al 8% o 12% (SDS-PAGE) en duplicado; como indicadores de peso molecular se utilizó el marcador Kaleidoscope de BIO-RAD. Los geles se corrieron durante 2.5 horas a corriente constante de 20 mA. Posterior a la corrida, una parte del gel se tiñó con azul de Coomassie para verificar la presencia de proteínas. Las proteínas presentes en la otra porción del gel fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa por medio de una cámara de transferencia semi-seca (Semi Phor, Hoefer Scientific Instrument) durante 1 hora a corriente constante de 35mA. Seguido a la

transferencia, la membrana fue bloqueada con Suero Fetal Bovino al 3% en solución Tris-Borato (TBS), incubada con los dos anticuerpos primarios (Anti-Melanopsin 1:500 de Gen Script y/o AntiGq 1:500 de Santa Cruz, durante 2 horas a temperatura ambiente ≈20ºC) y posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios específicos, conjugados a Fosfatasa Alcalina (Cabra anti-Conejo y Cabra anti-ratón 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente ≈20ºC). El revelado final se realizó incubando la membrana con el sustrato para la fosfatasa alcalina Western Blue (Promega) en completa oscuridad.

1.4 Cortes de retina:

Para la obtención de los cortes de retina de embrión de pollo, se fijó la retina en paraformaldehido al 4% en Solución amortiguada de Fosfatos (PBS) durante toda la noche a 4ºC. Debido a que la cera de poliéster ni la parafina son miscibles con el agua la retina se deshidrató con soluciones crecientes de etanol de 70, 90, 95 y 100% dos veces por 1 hora cada vez. Posteriormente la retina se infiltró con soluciones de concentraciones crecientes de cera o parafina (50, 75, 90 y 100%) dos veces c/u por 1 hora cada vez a 40°C para la cera poliéster y a 55°C para la parafina. Finalmente la retina se colocó en un molde con cera o parafina en estado líquido y se dejó solidificar a -20ºC hasta el momento de ser seccionada. Con los bloques de cera poliéster se realizaron cortes de 10 y 15 µm espesor, se montaron en lámina portaobjetos pre-tratadas con solución de Weaver (0.1% gelatina, 0.1% sulfato de cromo potasio) y se almacenaron a 4ºC hasta ser utilizados. Los bloques de parafina fueron seccionados a 3 o 5 µm de espesor, se montaron en láminas electroestáticamente cargadas (Fisherbrand) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

1.5 Inmunohistoquímica:

Los cortes de retina montados incluidos en cera poliéster fueron inicialmente rehidratados en PBS con concentraciones decrecientes de etanol al 100, 90, 75 y 50% dos veces durante 5 minutos cada vez, y dos lavados finales con PBS sin etanol. Para la rehidratación de los cortes montados en parafina previo a las soluciones decrecientes de etanol los cortes se dejaron a 60°C toda la noche y se disolvió la parafina con Xilol dos veces por 10 minutos cada vez. Una vez rehidratados los cortes, se permeabilizaron con el detergente Triton-X 100 en concentración de 0.2% en PBS durante 10 minutos, se lavaron 3 veces en PBS por 10 minutos cada uno y se bloquearon con 3% albumina de suero bovino (BSA) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (Anti-ChickenMelanopsin Gen Script 1:500 por dos horas a temperatura ambiente y/o anti-Gq Santa Cruz 1:500 durante toda la noche a 4°C). Finalmente los cortes se incubaron con anticuerpo secundario especifico Alexa-Fluo 488 o 546 (Invitrogen) en concentración de 1:200 por una hora a temperatura ambiente, se montó una laminilla con glicerol al 50% y se selló con esmalte. Los cortes fueron observados al microscopio óptico (Zeiss Axio Observer A1) equipado con óptica de

Nomarski y filtros de fluorescencia específicos para GFP y CY3 (GFP-FS38: filtro de excitación BP500/20, espejo dicroico FT495 y filtro de emisión BP525/50, CY3-FS43HE: filtro de excitación BP550/25, espejo dicroico FT570 y filtro de emisión BP605/70).

Para el doble marcaje se usó mezcla de los dos anticuerpos primarios (Anti-ChickenMelanopsin Gen Script 1:2000 y anti-Gq Santa Cruz 1:200 a 4°C durante toda la noche) y mezcla de los dos anticuerpos secundarios (Alexa-Fluo 488 y 546 1:200) durante una hora a temperatura ambiente.

1.6 Inmunocitoquimica:

Se procedió inicialmente con el protocolo de disociación de células de retina de embrión de pollo descrito anteriormente, pero en este caso las células fueron adheridas a una laminilla de vidrio previamente tratada con Concanavalina-A durante 30 minutos. Para la fijación, las células se cubrieron con una solución de paraformaldehido al 2% y Glutaraldehido al 0.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguido las células se permeabilizaron con Triton-X 100 en concentración de 0.2% en PBS durante 5 minutos, se lavaron 3 veces en PBS por 10 minutos cada uno y se bloquearon con 3% albumina de suero bovino (BSA) durante toda la noche a 4ºC. Posteriormente, las células fueron sometidas a un tratamiento igual que los cortes histológicos.

1.7 Seguimiento de la concentración de calcio Intracelular:

Dado que uno de los pasos en la cascada de señalización de la melanopsina en Anfioxo (Angueyra *et al.,* 2012) y en ipRGC de vertebrados (Hartwick *et al.,* 2007) es la liberación de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares, y como tomamos como base estas cascadas de señalización para el presente estudio, se monitorearon posibles cambios de la concentración de calcio intracelular en respuesta a la luz mediante el indicador fluorescente Fluo 4. Para introducir el indicador en las células se usó el derivado liposoluble Fluo 4AM (acetoximetil ester), el cual, gracias a su hidrofobicidad atraviesa la membrana celular con facilidad. Una vez dentro de la célula el precursor Fluo 4AM es degradado por la acción de esterasas endógenas que rompen su enlace ester y liberan el indicador Fluo 4 que es hidrosoluble e incapaz de atravesar la membrana. Con la degradación del precursor Fluo 4AM al interior de la célula se mantiene un gradiente entre el exterior y el interior celular lo cual permite acumular significativas concentraciones del indicador Fluo 4 al interior de la célula.

Una vez obtenida la retina del embrión de pollo se sometió a la acción de las enzimas para la disociación, se lavó dos veces en solución salina con FCS al 4% y se incubó con el indicador precursor del indicador fluorescente de calcio Fluo 4AM durante 1 hora a 32ºC en concentración de 20µM, diluido en DMSO y ácido plurónico (DMSO final: 0.36% y

ácido plurónico final 0.04%). Posterior a esto se disoció la retina con pipetas de vidrio pulidas a fuego y se dejaron adherir las células a la cámara de flujo pre-tratada con concanavalina-A.

Para estimular el indicador de calcio se utilizó una lámpara de Xenón montada en un riel óptico. El haz de luz pasaba por un reflector dicroico para eliminar luz infrarroja (fc 670 nm) y un filtro de interferencia de 480nm de longitud de onda (luz azul) y se concentraba en una fibra óptica acoplada al puerto de epi-iluminación del microscopio invertido Nikon. La aplicación de la luz era controlada por un obturador electromagnético a la salida de la lámpara de Xenón. El diagrama en la Figura 4 ilustra el arreglo utilizado para excitar el indicador de calcio fluorescente y al mismo tiempo registrar su emisión, lo cual requirió dos reflectores dicroicos adicionales y un filtro de barrera (λ> 510 nm): la luz de longitud de onda < 570 nm se desviaba hacia un fotomultiplicador, mientras la de longitud de onda larga era captada por una cámara CCD. Cabe destacar el uso de una mascarilla ajustable, colocada en un plano focal conjugado en el puerto lateral de salida del microscopio, la cual permitía delimitar un área de interés y bloquear toda luz proveniente de otras regiones. De esta manera se minimizaba la interferencia por luz parasítica y se optimizaba la relación señal-ruido.

La señal de salida del fotomultiplicador era procesada por un pre-amplificador con un umbral y un generador de pulsos para contar fotones individuales y luego procesada por un contador de alta velocidad; esto reduce el ruido contribuido por eventos térmicos.

El protocolo de estimulación consistió en pulsos de luz de 30ms de duración para medir el calcio basal. Estos destellos cortos de luz no alcanzan a inducir un aumento en la concentración de calcio intracelular. Para el inicio de la respuesta fotosensible se usó un pulso de luz de 5 s de duración, usando la misma lámpara de Xenón que para la estimulación del indicador de calcio fluorescente.

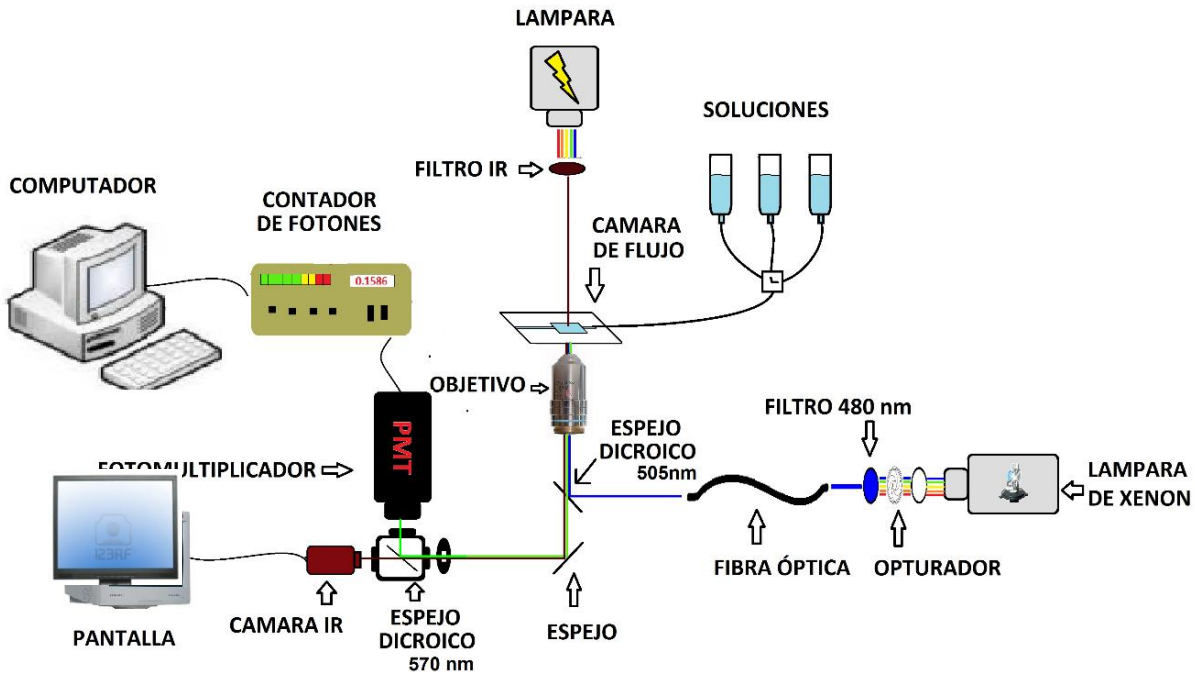


Figura 4. Diagrama equipos para estimulación y registro de células usado.

Calcio extracelular:

Se decidió evaluar el efecto del calcio extracelular sobre las respuestas a la luz. Para esto se usó una solución salina con baja concentración de calcio (NaCl 140mM, KCl 5mM, $CaCl_2$ 0.1mM, $MgCl_2$ 3.1mM, HEPES 10mM, Glucosa 10mM, pH 7.4) y se realizó el protocolo para medir la fluorescencia del indicador de calcio en respuesta a un paso de luz de 5 segundos. El protocolo completo consistió en registrar una respuesta a la luz en solución salina normal, cambiar a solución salina baja en calcio, evaluar la respuesta a la luz, retornar a solución salina normal y evaluar la respuesta a la luz.

1.8 2-APB

Para estudiar la fuente de aumento del calcio citosólico en las células aisladas de la retina de embrión de pollo, se evaluó la respuesta fluorescencia de calcio en respuesta, a la luz, en presencia del fármaco 2 aminoetoxidifenil borato (2-APB). El fármaco fue administrado controladamente junto a la célula mediante la técnica de "puffer". Esta técnica consiste en tener el fármaco a evaluar dentro de una micro-pipeta de vidrio, acercarlo a la célula y por medio de presión positiva expulsar el fármaco cercano a la célula. El 2-APB se disolvió inicialmente en DMSO en concentración de 100mM y se almacenó a -20°C. Al momento de ser usado se disolvió en solución salina a una concentración de 100µM. Las micro-pipetas usadas para cargar el fármaco tenían una resistencia de aproximadamente 2MΩ.

2. Resultados

2.1 Disociación de células de la retina:

Con el fin de estudiar posibles respuestas a la luz en células individuales sin intervención de señalización mediada sinápticamente, se trató la retina recién extraída del embrión con las enzimas proteolíticas pronasa y tripsina (ver Métodos). Luego, al dispersar trozos de retina por medio de succión repetida con pipetas de vidrio pulidas a fuego, se observó que se obtenían células completamente disociadas que en gran medida retenían su morfología y eran de fácil identificación bajo el microscopio óptico.

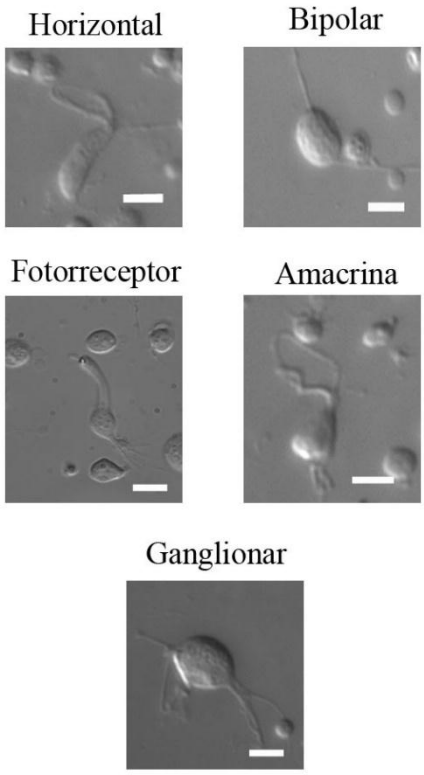


Figura 5. Microfotografías de células aisladas de la retina de embrión de pollo observadas bajo microscopía de Nomarski. Barra de escala 10 µm.

Las retinas de los embriones en estadios de desarrollo E14 a E17 se trataron con acción enzimática de 10 minutos, su disociación por medio de las pipetas de vidrio era fácil y las

células disociadas retenían su morfología con sus procesos característicos. Por el contrario, en estadios de desarrollo embrionario más avanzado, E18 a E21 la retina fue tratada con enzimas durante 15 minutos, su disociación requería una acción más enérgica, posiblemente debido a mayor presencia de tejido conectivo; por lo tanto, muchas de la las células perdían sus procesos haciendo más difícil su identificación y clasificación.

La figura 5 muestra imágenes representativas de los tipos celulares encontrados luego de la disociación de la retina. Las morfologías identificadas fueron:

(1) Células fotorreceptoras primarias (conos y bastones), que presentan una forma delgada y alargada debida a su región fotosensible, el así denominado segmento externo.

(2) Células Bipolares: son células cuyo soma es esférico u ovalado con un tamaño que varía entre los 5 y los 20 µm de diámetro. Presentan dos procesos ubicados en los extremos opuestos del soma, que permiten mediar el flujo de información entre los foto-receptores y las células ganglionares. Fueron las más abundantemente encontradas en las preparaciones de células disociadas.

(3) Células horizontales: son células con soma en forma cilíndrica que presentan una gran cantidad de procesos ramificados en solo uno de sus extremos, su tamaño varía entre los 7 y los 20 µm.

(4) Células Amacrinas: son las células de más difícil identificación debido a la variabilidad morfológica de sus diferentes sub-tipos. En las preparaciones de células disociadas, suelen presentar un soma redondeado con un proceso principal que se ramifica luego de unas pocas micras de salir del soma, también pueden presentar procesos delgados en otras regiones de su soma, su tamaño varía entre los 7 y los 15 µm; son muy poco frecuentes en preparaciones de células aisladas

(5) Células Ganglionares: son células cuyo soma varía entre los 10 y los 25 µm, presentan gran cantidad de procesos distribuidos en la mayor parte del cuerpo y en ocasiones es identificable un proceso de mayor diámetro; son muy poco frecuentes en las preparaciones de células aisladas; Debido al tratamiento enzimático y disociación mecánica muchas de las células pierden sus dendritas haciendo difícil su identificación. Puesto que uno de los objetivos del presente trabajo era identificar respuestas a la luz en nuevos tipos celulares, se realizaron pocos registros de estas células, cuya foto-sensibilidad ya había sido reportada.

En general estos diferentes tipos celulares fueron encontrados en todos los estadios embrionarios evaluados (E14-E21), siendo concordante con los reportes en la bibliografía (Doh *et al.,* 2010), que las identifican por métodos inmunológicos, desde estadios muy tempranos en el desarrollo (E4) y por morfología desde el estadio E10.

2.2 Viabilidad de las células aisladas enzimáticamente

Debido a que la disociación se realiza por medio de la acción de enzimas proteolíticas, como la pronasa y tripsina, un tratamiento excesivo podría llevar a degradar regiones de proteínas de membrana que se encuentren expuestas al medio extracelular y por ende generar cambios en la fisiología celular, o, en el peor caso, daños que conlleven a la muerte celular. Esto podría invalidar la interpretación de las observaciones funcionales. Por lo tanto, es necesario verificar que las células que retienen su morfología posterior a la dispersión, retienen igualmente su viabilidad fisiológica. Un acercamiento conveniente para este propósito es monitorear la integridad funcional de canales iónicos, los cuales, debido a su ubicación en la membrana plasmática, pueden ser vulnerables a ataque proteolítico. Para ese fin se acudió a registros electrofisiológicos por medio de la técnica de Patch-clamp en modalidad célula completa, registrando las corrientes de membrana generadas a estimulación de voltaje. Se optó por examinar la funcionalidad de los canales voltaje-dependientes, los cuales están presentes en todos los tipos de neuronas retinales (Tachibana 1983, Malchow *et al.,* 1990, Yamashita & Wassle 2000). Inicialmente el voltaje de la membrana se impuso a -60 mV, valor cercano al potencial de reposo de dichas células; a partir de este punto se aplicaron pasos despolarizantes de amplitud creciente, con incrementos de 10 mV, y una duración individual de 100ms y se registraron las corrientes iónicas generadas por dichos cambios de voltaje. La figura 6 muestra un ejemplo representativo, en el cual el registro fue llevado a cabo en una célula amacrina. En el panel superior se muestran los trazos superpuestos de corriente mientras que en la parte baja están los estímulos de voltaje aplicados. Como se puede observar, en respuesta a despolarizaciones por encima de un cierto umbral, las células desarrollaron inicialmente una corriente de entrada transitoria rápida (depresión en los trazos de la región superior), la cual se hace evidente luego del tercer paso de voltaje, es decir, al llegar el potencial de membrana aproximadamente a los -30mV. Esta corriente de entrada fue seguida de una corriente de salida (la rápida subida que se aprecia en los trazos superiores), que al parecer presenta dos componentes: uno transitorio rápido, observable por el pequeño pico inicial y posterior estabilización a un nivel más modesto, que perdura mientras se mantenga el paso de voltaje. Observaciones previas en células de retinas de varias especies identifican el componente de entrada como una corriente mediada principalmente por iones de calcio y sodio mientras que la corriente de salida refleja eflujo de potasio (Talchiban 1983, Malchow *et al.,* 1990, Yamashita & Wassle 2000). Observaciones similares se llevaron a cabo en células de los varios tipos clasificados en este estudio (con excepción de conos y bastones, ya que éstos no eran de interés para el presente proyecto). Se hicieron unas pocas manipulaciones para definir mejor algunas de estas corrientes, como por ejemplo mostrar una reducción reversible de la corriente de entrada al sustituir el sodio extracelular por el catión impermeante Tris o al bajar la concentración de calcio extracelular de 2 mM a 100µM; o aplicar fármacos 4AP y TEA, bloqueadores de los canales de potasio, que eliminan los dos componentes de la corriente de salida (figura 7). El estudio en detalle de las corrientes generadas a pasos de

voltaje, sin embargo, sobrepasa los objetivos de este estudio y por eso se llegó únicamente a una descripción básica e inicial. Con estos resultados indicando la funcionalidad de la célula se hace posible el avance de la investigación bajo condiciones de disociación enzimática celular.

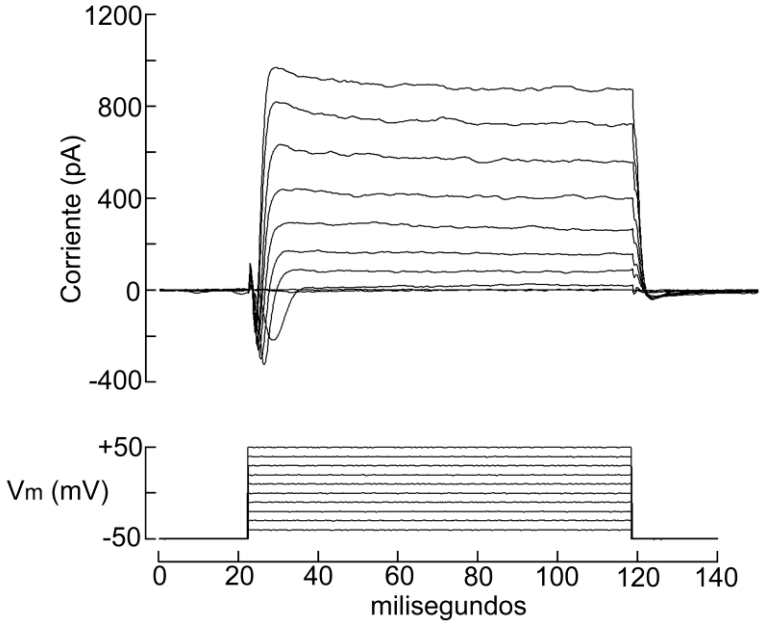


Figura 6. Registros de corrientes (superior) en respuesta a pasos crecientes de voltaje de a 10mV. Registrados a partir de una célula amacrina aislada de la retina de embrión de pollo por medio enzimático.

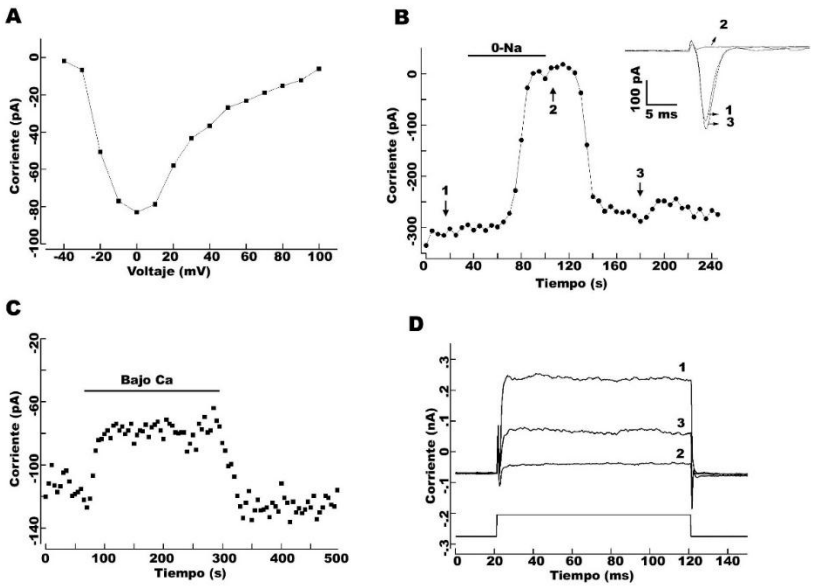


Figura 7 Características de las corrientes de entrada y salida en células aisladas de la retina de embrión de pollo. A. Relación corriente voltaje de la corriente de entrada aislada bloqueando los canales de potasio con 4AP 5mM y TEA 20mM. En una célula bipolar. B. Efecto de cero Na extracelular en la corriente de entrada. Cada punto indica el valor máximo (negativo) logrado por la corriente de entrada en respuesta a un paso despolarizante de 60mV; la línea superior indica el periodo durante el cual la solución de baño se cambió a solución salina sin sodio; los trazos superiores son los registros de la corriente de entrada aislada digitalmente en condiciones control (1), cero sodio (2) y retorno a solución salina normal (3). Los registros de la parte superior fueron restados digitalmente con un trazo tomado en cero Na, donde no presenta corriente de entrada. Trazos a partir de una célula bipolar. C. Efecto de baja concentración de calcio extracelular sobre la corriente de entrada. Cada punto indica el valor máximo (negativo) logrado por la corriente de entrada en respuesta a un paso despolarizante de 60mV. La línea superior indica el periodo durante el cual se cambió la solución externa a bajo Ca. Trazos a partir de una célula unipolar. D. efecto de los fármaco 4AP 5mM y TEA 20mM, reportados como bloqueadores de canales de potasio, sobre las corrientes de salida generadas a un paso de voltaje de 90mV. Los trazos indican la corriente control (1), en presencia de los fármacos (2) y luego de 10 minutos del lavado de los fármacos (3). Trazos de una célula Horizontal.

2.3 Melanopsina en retina de embriones de pollo:

En 2005 dos grupos de investigadores, Bailey y colaboradores y Tomonari y colaboradores, reportaron por primera vez la presencia del transcrito que codifica para la melanopsina en retinas de embriones de pollo El transcrito fue identificado por medio de amplificación por la técnica de PCR y posteriormente fue mostrada su ubicación dentro de la retina por medio de la técnica de hibridización *in situ*. Dichos autores reportaron que el transcrito de la melanopsina se sintetiza de manera abundante en la capa nuclear externa, en la capa nuclear interna, y en la capa ganglionar de la retina de pollo (Bailey & Cassone 2005). En la capa nuclear externa (foto-receptores) se trata de una expresión

abundante marcando una franja compacta al igual que en la capa nuclear interna; mientras que en la capa ganglionar se trata de expresión en pocas células aisladas (Bailey *et al.,* 2005, Tomonari *et al.,* 2005). Igualmente, por medio de anticuerpos se ha reportado la expresión de la proteína melanopsina abundantemente en la capa nuclear interna y pocas células individuales de la capa ganglionar de la retina de *Gallus gallus* (Lima *et al.,* 2006, Guido *et al.,* 2010). Para nuestro estudio se hizo importante la identificación del tipo de células específicas que expresan la melanopsina, cosa que no ha sido posible aclarar en estudios anteriores (Lima *et al.,* 2006, Guido *et al.,* 2010). Por esta razón fue necesario repetir los experimentos usando anticuerpos. Debido a la falta de anticuerpos comerciales contra la melanopsina de pollo se mandó elaborar un anticuerpo específico contra melanopsina de pollo. Este anticuerpo fue generado en conejos contra el péptido CEPAHEKLQPRRSHS perteneciente a la región carboxi terminal de la secuencia de melanopsina de pollo en sus isoformas corta y larga

Para determinar si el anticuerpo reconoce nuestra proteína de interés, se corrió en un gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) el extracto de proteínas obtenidas a partir de un homogenizado de retina de embrión de pollo en estadio E16. Las proteínas corridas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa, y se usó el anticuerpo, en concentración 1:500. Como marcador del primer anticuerpo se usó luego un anticuerpo secundario contra Inmunoglobulina G de conejo conjugado a Fosfatasa Alcalina y se reveló la ubicación del anticuerpo con Western Blue. Se observó una banda prominente en el peso estimado de 48 KDa, (figura 8) como se espera para la isoforma S de la melanopsina de pollo. Además se observó una banda de aproximadamente 60 KDa que correspondería con la isoforma L, y un banda de aproximadamente 120 KDa que podría deberse a un dímero de la melanopsina en su isoforma larga. Los resultados indican que la melanopsina se encuentra expresada en la retina de embriones de pollo y que aparentemente ambas isoformas son reconocidas satisfactoriamente por nuestro anticuerpo.

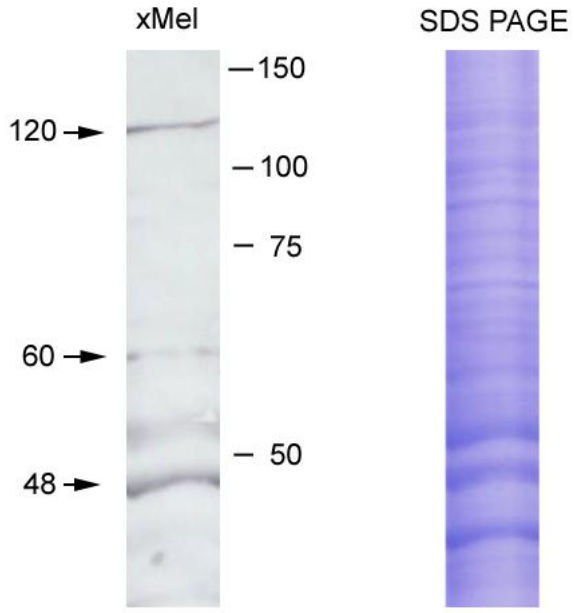


Figura 8. Izquierda: Western Blot de homogenizado de retina de embrión de pollo marcado con anticuerpo primario xMel 1:500 (Gen Script) generado contra el péptido CEPAHEKLQPRRSHS corresponde a los aminoácidos 375-389 de la isoforma 'corta' de la melanopsina de *Gallus* (secuencia ABX 10831.1, de NCBI), y también está presente en la isoforma 'larga' (ABX 10830.1). Revelado con anticuerpo secundario GtxRb conjugado a fosfatasa alcalina 1:2000 (invitrogen). Los números a la derecha del carril indican los pesos del marcador Kaleidoscope (Promega). Se detectan 3 bandas principales con pesos de 48KDa, esperado para la isoforma corta, 60KDa esperado para la isoforma larga y 120KDa posiblemente debido a dímeros de melanopsina en su forma larga. Derecha: gel de corrida con tinción de coomassie mostrando el total de proteínas corridas.

La respuesta despolarizante observada en ipRGCs de mamíferos, y la similitud entre melanopsina y la rodopsina de foto-receptores de invertebrados ha llevado a la conjetura de que la melanopsina podría señalizar a través de la cascada de fosfoinositidos (Graham *et al.,*, 2008) También se ha reportado que la melanopsina presente en el cordado basal anfioxo señaliza mediante la proteína Gq que activa una fosfolipasa C (PLC) (Angueyra *et al.,* 2012). Para determinar la presencia de la proteína Gq en la retina de embriones de pollo se utilizaron anticuerpos contra esta proteina. Debido a la homología de más del 98% entre la secuencia de la proteína Gq de humanos y la Gq de pollo (figura 9) se decidió usar un anticuerpo comercial (Santa Cruz), generado contra la proteína Gq de humanos. Al probar el anticuerpo en un Western blot de homogenizado de retina de embrión de pollo, se observó el marcaje de una banda única con peso aproximado de 42 KDa; este valor corresponde al peso esperado para la proteína Gq, según se estima a partir de la secuencia de aminoácidos (figura 9). Aunque estas observaciones confirman que la proteína Gq se expresa en la retina de embriones de pollo, se hace necesario determinar su co-localización con la melanopsina (mediante inmunohistoquimica e inmunocitoquimica) para poder sugerir un nexo funcional.

```
Chicken_Gq_NP_989565.1|MTLESMMACCLSDEVKESKRINAEIEKQLRRDKRDARRELKLLLLGTGESGKSTFIKQ 58
Human_Gq|gb|AAH96227.1|MTLESMMACCLSDEVKESKRINAEIEKQLRRDKRDARRELKLLLLGTGESGKSTFIKQ 58
                       ************************************************************

MRIIHGSGYSEEDKKGFTKLVYQNIFTAMQSMIRAMETLKILYKYEQNKANAVLIREVDVEKVMTFEQPYVSAIKTLWNDP 139
MRIIHGAGYSEEDKRGFTKLVYQNIFTAMQAMIRAMETLKILYKYEQNKANALLIREVDVEKVTTFEHQYVSAIKTLWEDP 139
******:*******:***************:*********************:********** ***: *********:**

GIQECYDRRREYQLSDSAKYYLSDVDRIATPGYLPTQQDVLRVRVPTTGIIEYPFDLENIIFRMVDVGGQRSERRKWIHCF 220
GIQECYDRRREYQLSDSAKYYLTDVDRIATLGYLPTQQDVLRVRVPTTGIIEYPFDLENIIFRMVDVGGQRSERRKWIHCF 220
********************:********* ************************************************

ENVTSIMFLVALSEYDQVLVESDNENRMEESKALFRTIITYPWFQNSSVILFLNKKDLLEDKILYSHLVDYFPEFDGPQRD 301
ENVTSIMFLVALSEYDQVLVESDNENRMEESKALFRTIITYPWFQNSSVILFLNKKDLLEDKILYSHLVDYFPEFDGPQRD 301
********************************************************************************

AQAAREFILKMFVDLNPDSDKIIYSHFTCATDTENIRFVFAAVKDTILQLNLKEYNLV 359
AQAAREFILKMFVDLNPDSDKIIYSHFTCATDTENIRFVFAAVKDTILQLNLKEYNLV 359
************************************************************
```

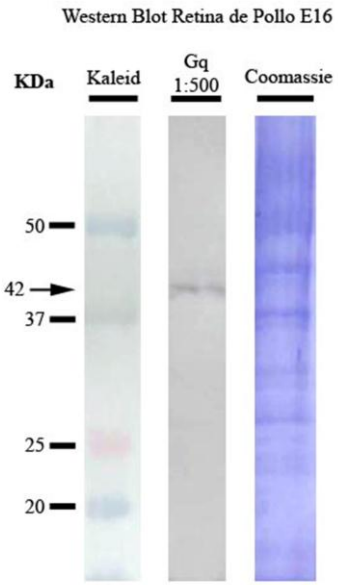


Figura 9. Superior: Alineamiento de las secuencias de Gq de humano (código de acceso AAH96227.1), contra la secuencias de la proteína Gq de Pollo (código de acceso NP_989565.1). Inferior: Western Blot de homogenizado de retina de embrión de pollo marcado con anticuerpo primario xGq 1:500 (Santa Cruz) generado contra la proteína Gq/alfa-11 de humano. Revelado con anticuerpo secundario GtxMs conjugado a fosfatasa alcalina 1:2000 (invitrogen). El marcador de peso molecular usado fue Kaleidoscope (BioRad), los números a la Izquierda del carril indican los pesos del marcador. Y a la derecha se muestra el gel de corrida con tinción de coomassie mostrando el total de proteínas corridas.

Habiendo determinado que el anticuerpo anti-melanopsina no muestra reacción cruzada con blancos espúreos, se procedió a determinar la distribución de antígenos en la retina de embriones de pollo. Para este fin, se realizó una prueba de inmunohistoquimica en cortes de retina fijados con paraformaldehido e impregnados con cera poliéster o impregnados en parafina. Se usó el anticuerpo contra la melanopsina de pollo en concentración 1:500 y se marcó con un anticuerpo secundario conjugado al fluoroforo Alexa fluo 488. Como se muestra en la figura 10 se encuentra una gran cantidad de immunofluorescencia, y por lo tanto expresión de la proteína melanopsina, en la capa nuclear interna de la retina, donde se encuentran alojadas las células bipolares, horizontales y amacrinas. En cambio, la fluorescencia es ausente en las demás capas celulares. Es de importancia destacar que no se identificó inmunofluorescencia en las células de la capa ganglionar, posiblemente debido a la baja frecuencia de células que expresan melanopsina en esta capa, como se ha reportado anteriormente (Lima *et al.,* 2006). Para determinar que la fluorescencia observada no se debe a autofluorescencia del tejido o unión inespecífica del anticuerpo secundario, se realizó un experimento control donde se omitió el anticuerpo primario; al observar estos cortes al microscopio no se encontró fluorescencia con las exposiciones de la cámara usadas en los registros experimentales; lo que corrobora que la inmunofluorescencia vista en los cortes con anticuerpo primario no se debe a reacción del anticuerpo secundario con el tejido.

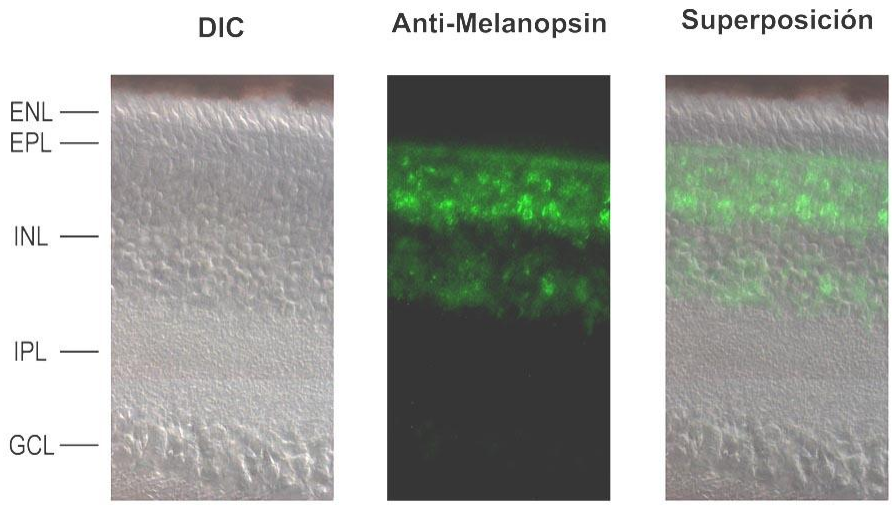


Figura 10. Cortes de retina de embrión de pollo incubados con ×Mel (1:200) seguidos por anticuerpos secundarios conjugados a Alexa-fluo 488 y visualizados en un microscopio de epi-fluorescencia. La figura muestra una porción de un corte visualizado con óptica de Nomarski (izquierda), fluorescencia (centro) y la superposición de las dos imágenes (derecha). Se puede observar una gran expresión de melanopsina en la capa nuclear interna de la retina; en esta región se localizan células bipolares, horizontales, amacrinas, y además células gliales. (*Abreviaciones: ENL= capa nuclear externa; EPL=capa plexiforme externa; INL= capa nuclear interna; IPL=capa plexiforme interna; GCL=capa de células ganglionares*).

La figura 10 muestra la expresión abundante del fotopigmento melanopsina en una capa la retina en la cual no se había reportado previamente la presencia de células intrínsecamente fotosensibles. Cabe destacar que las micrografías sugieren que el marcaje que se observa está localizado en la membrana plasmática, por lo menos en algunas células. Sin embargo, este dato debe ser corroborado por técnicas que permitan una mayor resolución, como la microscopía confocal.

Los ensayos de inmunofluorescencia en secciones de retina identifican regiones de alta inmunoreactividad, pero algunas de ellas contienen más de un tipo celular. Para identificar específicamente cual(es) tipo(s) de células expresan melanopsina, se realizó una inmunocitoquimica en preparaciones de células aisladas de la retina de embriones de pollo usando el anticuerpo anti melanopsina en concentración 1:500 y el anticuerpo secundario conjugado al fluoroforo Alexa fluo 488. En la figura 11 se muestran imágenes de microscopía con la técnica de Nomarski, y el mismo campo tomado bajo fluorescencia, para identificar las células que expresan el fotopigmento. La expresión de melanopsina en células aisladas es abundante, marcando cerca del 95% de las células de más de 8 μm; se identifican también células entre 5 y 8 μm de diámetro que se marcan con fluorescencia pero su contabilización se hace complicada por confusión con fluorescencia de ruido. Como lo muestra la figura 11, entre las células que muestran fluorescencia se identificaron todos los tipos celulares clasificados en este estudio (bipolares, horizontales, ganglionares y amacrinas; foto-receptores no fueron encontrados en estas preparaciones)

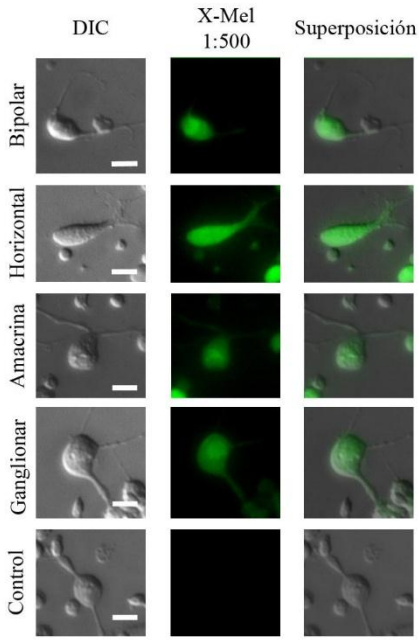


Figura 11. Expresión de melanopsina en diferentes tipos celulares de la retina de embrión de pollo. Barra de escala 10 μm.

2.4 Funcionalidad y señalización de la melanopsina:

Como se detalló en la sección anterior, las neuronas retinales que expresan la melanopsina fueron principalmente bipolares y horizontales, células a las cuales nunca antes se les ha atribuido la capacidad de ser intrínsecamente fotosensibles. Se hace por lo tanto necesario determinar si este fotopigmento que expresan es funcional, es decir, si las células pueden generar directamente una respuesta fisiológica a la estimulación lumínica (i.e. estando aisladas físicamente de toda conexión sináptica).

2.4.1Aumento de calcio citosolico:

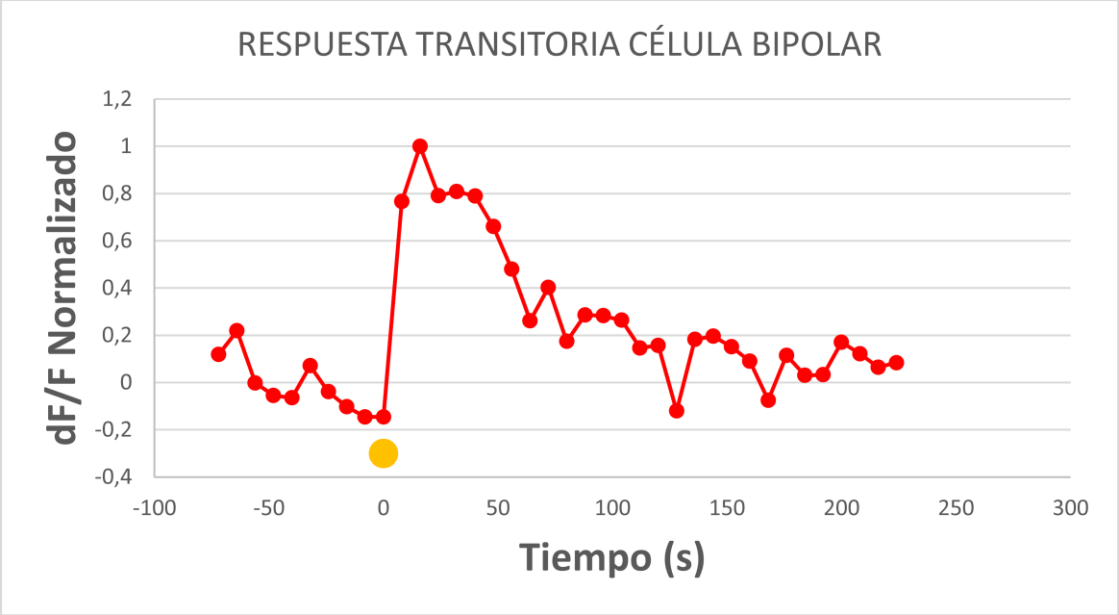
Habiendo localizado la expresión de melanopsina en tres clases de neuronas retinales que previamente no se consideraban foto-sensibles, se procedió a evaluar la posible presencia de respuestas intrínsecas a la iluminación en estas células.

Si el fotopigmento expresado en las células de la capa nuclear interna de la retina de embriones de pollo es funcional, y si asumimos que utiliza la vía de señalización de los fosfoinositidos, su activación por luz debería llevar a un aumento en la concentración de calcio citosólico, desencadenado por la producción de IP_3. Se decidió por lo tanto llevar a cabo mediciones de calcio intracelular por medio de indicadores fluorescentes, específicamente el Fluo 4. Debido a que el precursor del indicador, el Fluo 4AM, es liposoluble y puede atravesar la membrana celular sin necesidad de alterarla (como lo haría un electrodo para estudios electrofisiológicos, o para cargar el la sal del indicador de calcio mediante diálisis ya que no atraviesa la membrana celular) esta técnica es menos invasiva y permite realizar seguimientos de células por periodos prolongados de tiempo manteniendo su integridad y componentes intracelulares lo menos alterados posibles. El indicador de calcio Fluo 4 presenta un pico de absorción de luz para ser estimulado de 480nm de longitud de onda, cercano al pico del espectro de absorción de la melanopsina que es de 485nm (Berson *et al.,* 2002) por esta razón es posible que al momento de medir la fluorescencia de calcio basal se estimule al mismo tiempo la célula. Pero las respuestas fisiológicas de otras neuronas de vertebrados que expresan melanopsina (i) requieren foto-estimulación prolongada de gran intensidad (Berson *et al.,* 2002, Cheng *et al.,* 2009) y (ii) manifiestan una latencia muy larga (Berson *et al.,* 2002); por lo tanto, al aplicar la epi-iluminación para observar fluorescencia debería ser posible determinar inicialmente el nivel basal de fluorescencia de calcio, y solo posteriormente a la aplicación de iluminación de mayor intensidad o duración debería manifestarse un incremento de calcio. El protocolo diseñado para medir una fluorescencia basal de calcio consistió en pulsos iniciales de luz de corta duración (30ms) aplicados cada 8 segundos, bajo la premisa que generan fluorescencia del indicador sin gatillar significativamente ningún cambio fisiológico. Para estar seguros que luces de 30ms no generaban ningún aumento de la fluorescencia del indicador (incluyendo posibles cambios transitorios dentro del lapso de 8 segundos inter-estímulo), se aplicaron los estímulos a intervalos de

1 segundo durante 30 segundos; con este protocolo no se observó cambio alguno en el nivel de fluorescencia. Para descartar cambios de fluorescencia más rápidos que un segundo, se evaluó la fluorescencia de manera continua en respuesta a la aplicación de una luz continua de 2 segundos y nuevamente no se observó cambio alguno. Esto indica que el protocolo es adecuado para medir la fluorescencia basal de calcio. La fluorescencia registrada por los pasos de luz de 30ms cada 8 segundos se tomó como la línea de base de fluorescencia previo a un estímulo más fuerte que consistió en un pulso de luz de 5 segundos. Posterior a la estimulación de luz de 5 segundos se registró la fluorescencia del indicador con pulsos de luz de 30ms cada 8 segundos.

La figura 12 muestra la el cambio de la fluorescencia de una célula bipolar y una célula horizontal aisladas de la retina de embrión de pollo en estadio E16, constituyendo la primera vez que se reporta una respuesta intrínseca a la luz en células de la capa nuclear interna de la retina de vertebrados; el hecho de que se trate de una movilización de calcio sugiere que posiblemente está participando la cascada de señalización de fosfoinositidos. Debido a que el Fluo 4 no es un indicador cociente-métrico, es decir su cambio en la fluorescencia no indica un valor cuantitativo en el cambio de la concentración de calcio citosólico y tanto su fluorescencia basal como su cambio de fluorescencia dependen de varios factores, como su concentración intracelular, el volumen de la célula, la distancia desde la fuente de fluorescencia hasta el objetivo del microscopio, entre otros. Es común observar que diferentes células presentes diferentes niveles de fluorescencia basal y diferentes cambio de fluorescencia en respuesta a la luz. Para poder comparar respuestas de varias células no es útil reportar los datos en valores medidos de fluorescencia directa, sino que es más aconsejable el uso del cambio relativo de la fluorescencia ($\Delta F/F$).

En las células de la capa nuclear interna de la retina, las respuestas de aumento de calcio inducidas por un estímulo lumínico de 5 segundos comparten una cinética de activación lenta, pero difieren en cuanto a curso temporal, y pueden ser clasificadas en tres tipos: 1) las células que responden con un aumento transitorio de calcio que llega a su máximo cerca de los 40 segundos después de aplicado el paso de luz y decae al 50% luego de cerca de 60 segundos. 2) las células que responden con un aumento transitorio de calcio un poco más lento que alcanza su máximo cerca de los 100 segundos después de aplicado el estímulo de luz y decae al 50% cerca de los 120 segundo después de llegar a su nivel máximo. Y 3) las células que responden con un aumento sostenido del nivel de calcio citosólico, que llega a su máximo en aproximadamente un tiempo de 80 segundos después de aplicado el estímulo y se mantienen a ese nivel durante por lo menos 300 segundos. La figura 13 muestra un trazo representativo de cada uno de los tipos de respuestas registrados en células diferentes, indicando su tiempo de latencia largo y diferentes cinéticas de decaimiento de la fluorescencia; y las figuras 14, 15 y 16, muestran el trazo promedio a partir de todas las células que responden a la luz y fueron clasificadas en los tres diferentes grupos (Transitoria n = 15; Transitoria Larga n = 9; Sostenida n = 18)



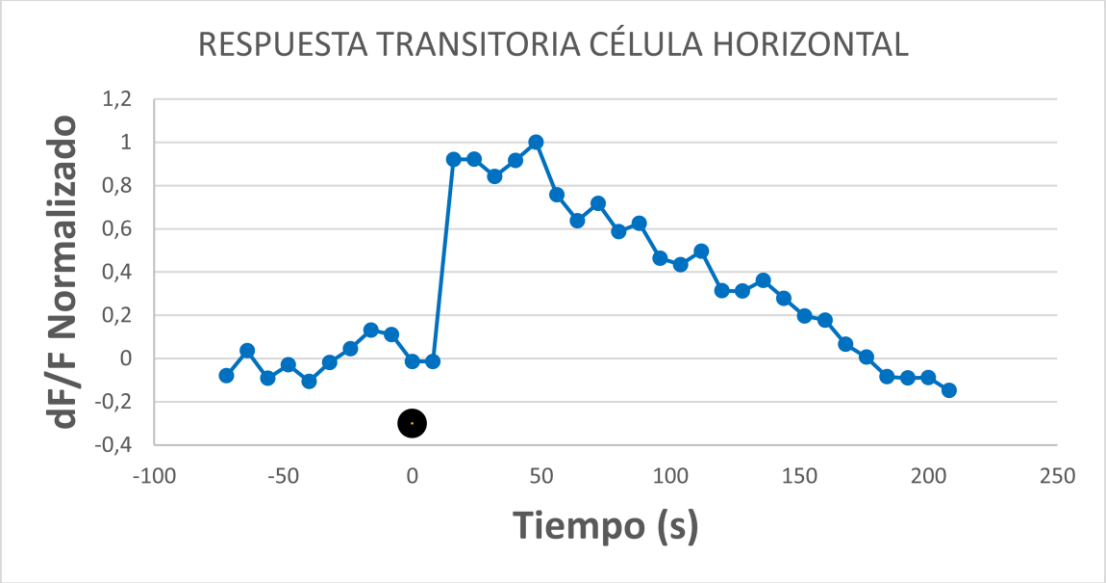


Figura 12. Cambio de fluorescencia normalizado en una célula bipolar y una célula horizontal en respuesta a una luz de 5 segundos (punto amarillo y punto negro).

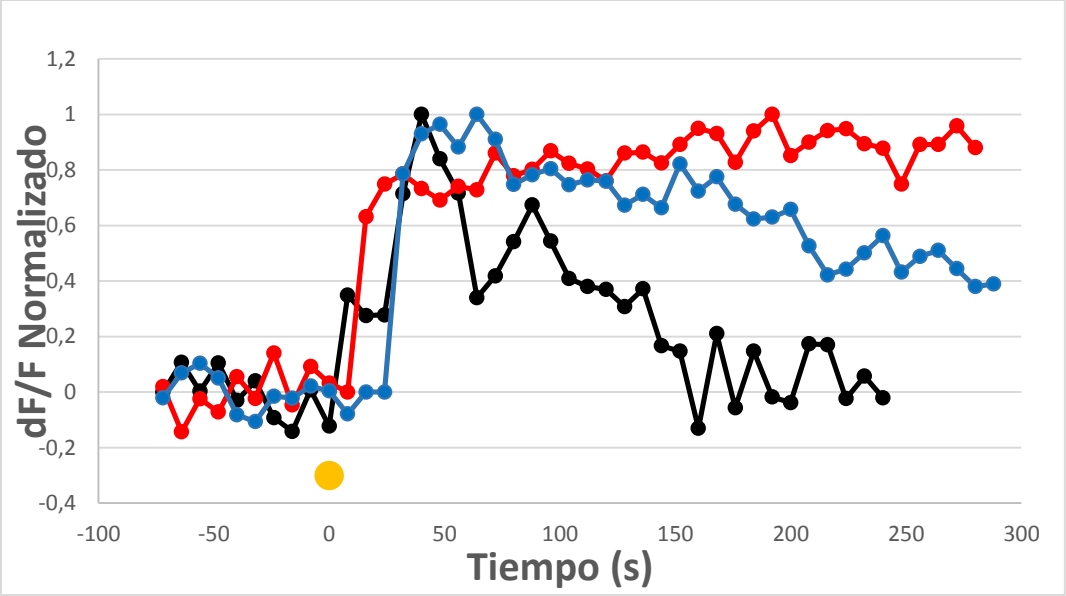


Figura 13. Trazos representativos de los tres tipos de respuestas encontradas en las células de la capa nuclear interna de la retina de embriones de pollo en respuesta a una luz de 5 segundos (Circulo amarillo). Respuesta transitoria (negro), Transitoria larga (azul) y sostenida (roja) pertenecientes a tres diferentes células bipolares. Los datos fueron normalizados al máximo de dF/F.

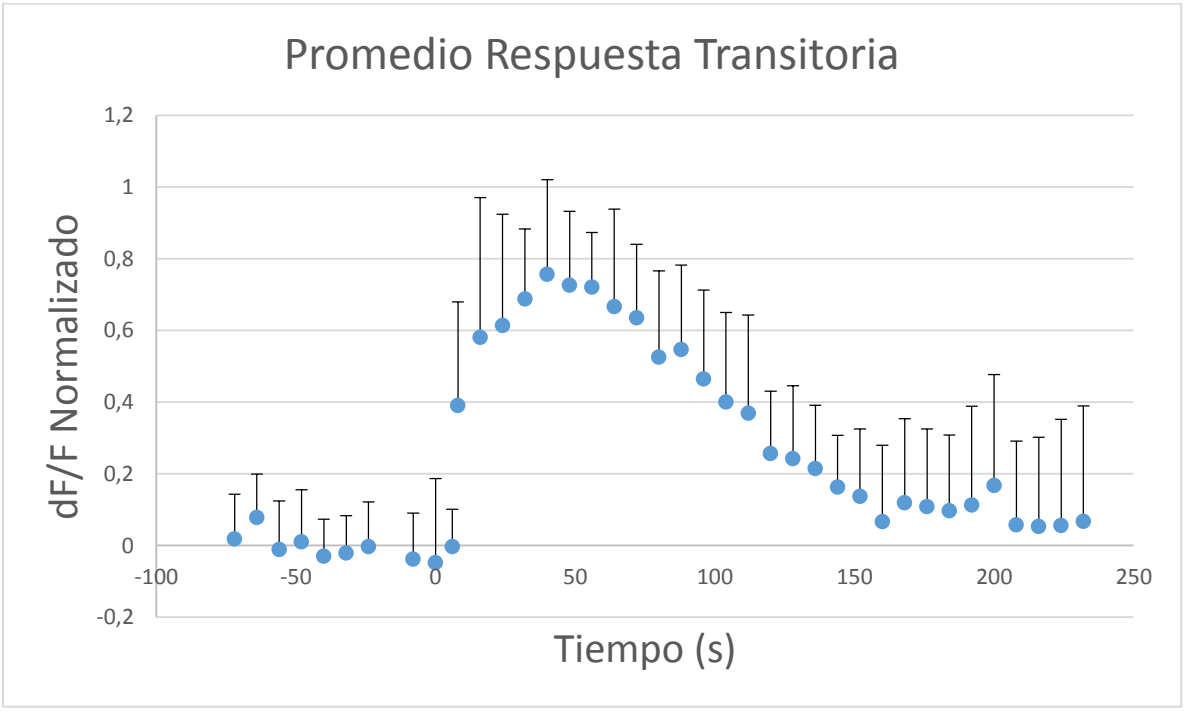


Figura 14. Aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular medido con el indicador fluorescente Fluo 4. Posterior a la aplicación de una luz de 5 segundo (tiempo 0s). Trazo a partir del promedio de 15 células, datos normalizados respecto al máximo de dF/F. como fluorescencia basal se tomó el promedio de los 9 pasos previos al estímulo.

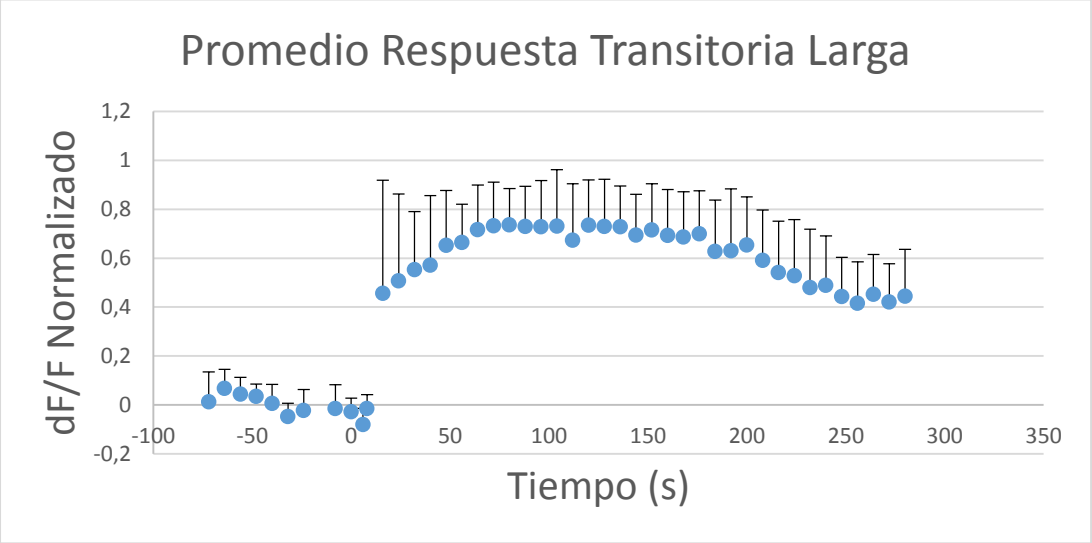


Figura 15. Aumento transitorio largo de la concentración de calcio intracelular medido con el indicador fluorescente Fluo 4. Posterior a la aplicación de una luz de 5 segundo (tiempo 0s). Trazo a partir del promedio de 9 células. Datos normalizados respecto al máximo de dF/F. Como fluorescencia basal se tomó el promedio de los 9 pasos previos al estímulo.

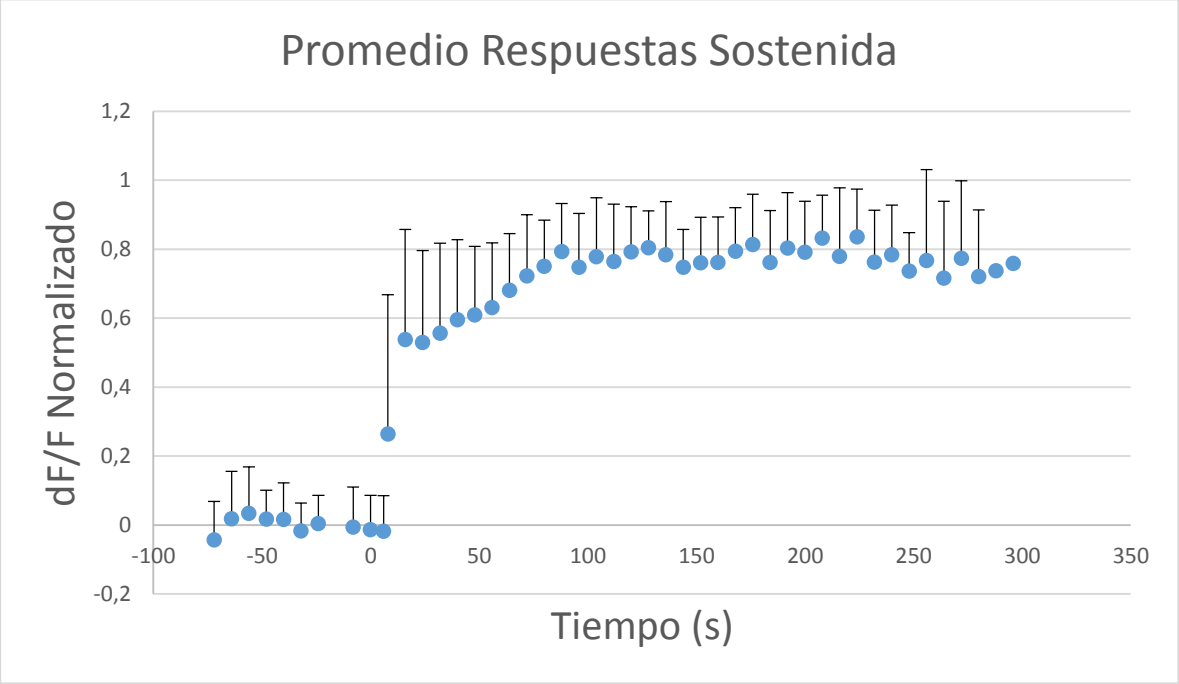


Figura 16. Aumento sostenido de la concentración de calcio intracelular medido con el indicador fluorescente Fluo 4. Posterior a la aplicación de una luz de 5 segundo (tiempo 0s). Trazo a partir del promedio de 18 células. Datos normalizados respecto al máximo de dF/F. Como fluorescencia basal se tomó el promedio de los 9 pasos previos al estímulo.

Considerando que en el estudio se examinaron diferentes clases de neuronas celulares, es importante determinar si éstas difieren en cuanto a incidencia de respuestas a la luz y sus características morfológicas. Se construyó por lo tanto una tabla relacionando el tipo de célula y su respuesta a la luz. Como se puede observar en la tabla 1 el mayor número de células evaluadas fueron las bipolares, seguido por las horizontales, mientras que muy pocas amacrinas y ganglionares fueron muestreadas. En la tabla se muestra un indicativo de la frecuencia de aparición de cada tipo celular en las preparaciones de células aisladas y de sus respuestas a la luz. Se encontró que las células que en mayor proporción responden a una luz son las células bipolares (cerca del 50%), seguidas por las células horizontales con una proporción del 31% de células que son fotosensibles. Estos resultados son concordantes con la abundante expresión de melanopsina encontrada en los cortes de retina (figuras 10 y 11). En la misma tabla se observan algunas células amacrinas que responden a la luz pero debido a su compleja morfología que puede llevar a confusiones en la clasificación es arriesgado formular alguna conclusión. Con respecto a las células ganglionares no se obtuvieron células responsivas, pero cabe aclarar que (i) se sabe que solo una pequeña fracción de células ganglionares expresan melanopsina (Chaurasia *et al.,* 2005) y (ii) el número de células ganglionares examinadas en el presente estudio fue pequeño (n=3). De todas maneras las células ganglionares, cuya foto-sensibilidad intrínseca ya se conocía, por lo menos en los mamíferos, no eran el objeto explícito de este estudio.

	RESPONDE					
TIPO CÉLULA	**NO**		**SI**		**TOTAL**	
	# de células	**% del total**	**# de células**	**% del total**	**# total de células**	**% TOTAL**
AMACRINA	5	71.4%	2	28.6%	7	8.1%
BIPOLAR	29	50.9%	28	49.1%	57	66.3%
GANGLIONAR	3	100.0%		0.0%	3	3.5%
HORIZONTAL	13	68.4%	6	31.6%	19	22.1%
TOTAL	**50**	**58.14%**	**36**	**41.86%**	**86**	100%

Tabla 1. Relación tipo de célula y respuesta a un estímulo de luz de 5 segundos.

Para determinar si el curso temporal de la respuesta de calcio se relaciona con el tipo de célula se elaboró la tabla 2 y su figura complementaria (figura 17). Como se puede observar, los tres tipos de respuestas se encuentran en las células bipolares. En las células horizontales se observaron respuestas transitorias y sostenidas pero no respuestas transitorias largas, debido a que el número de células evaluadas no era muy grande (n = 6) cabe la posibilidad de que no se observaron todos los tipos de respuestas por limitaciones de muestreo. En el tipo de células clasificado como amacrinas se observa que

el 100% responden de manera transitoria, pero este 100% de respuesta transitoria probablemente se debe simplemente al número modesto de células evaluadas (n = 2).

TIPO CÉLULA	TIPO DE RESPUESTA							
	SOSTENIDA		TRANSITORIA		TRANSITORIA LARGA		TOTAL	
	# de células	% del total	# de células	% del total	# de células	% del total	# de células	% del total
AMACRINA	0	0.00%	2	100.00%	0	0.00%	2	100%
BIPOLAR	10	35.71%	14	50.00%	4	14.29%	28	100%
HORIZONTAL	4	66.67%	2	33.33%	0	0.00%	6	100%
TOTAL	**14**	**38.89%**	**18**	**50.00%**	**4**	**11.11%**	**36**	**100%**

Tabla 2. Relación tipo de célula y tipo de respuesta a un estímulo de luz de 5 segundos.

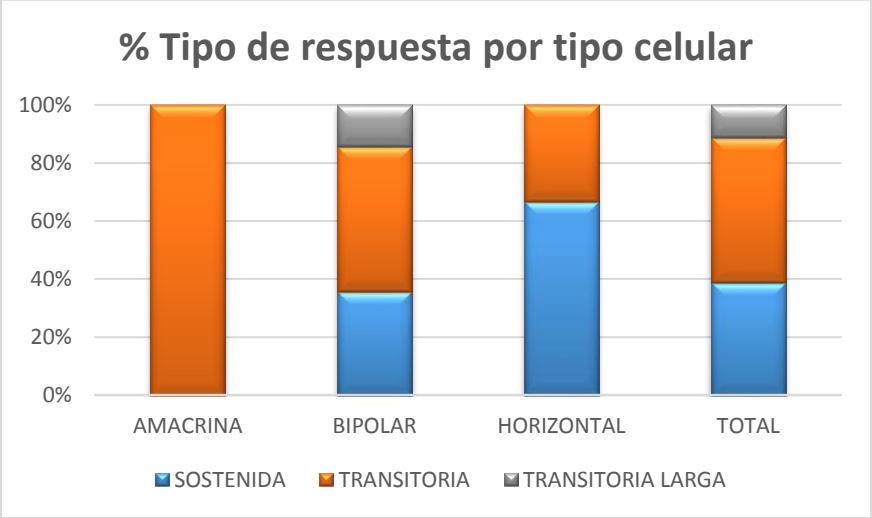


Figura 17. Relación tipo de respuesta con tipo de célula mostrado como el porcentaje del total de cada tipo de célula.

Debido a que en la inmunocitoquimica de células disociadas se observó un alto porcentaje de células de tamaño mayor a 10µm que expresan la melanopsina se relacionó las respuestas de aumento de calcio Vs el tamaño de la célula para determinar si existe también alguna relación entre el tamaño de la célula y su respuesta a la luz. En la figura 18 se agruparon las células por intervalos de tamaños, siendo estos: i) menor a 8µm; ii) entre 8 y 10µm; iii) entre 12 y 15µm; y iv) mayor a 15 µm. Parece no existir una relación clara entre el tamaño de la célula y la respuesta a la luz, estando las células que responden a la luz en el rango de los tamaños evaluados.

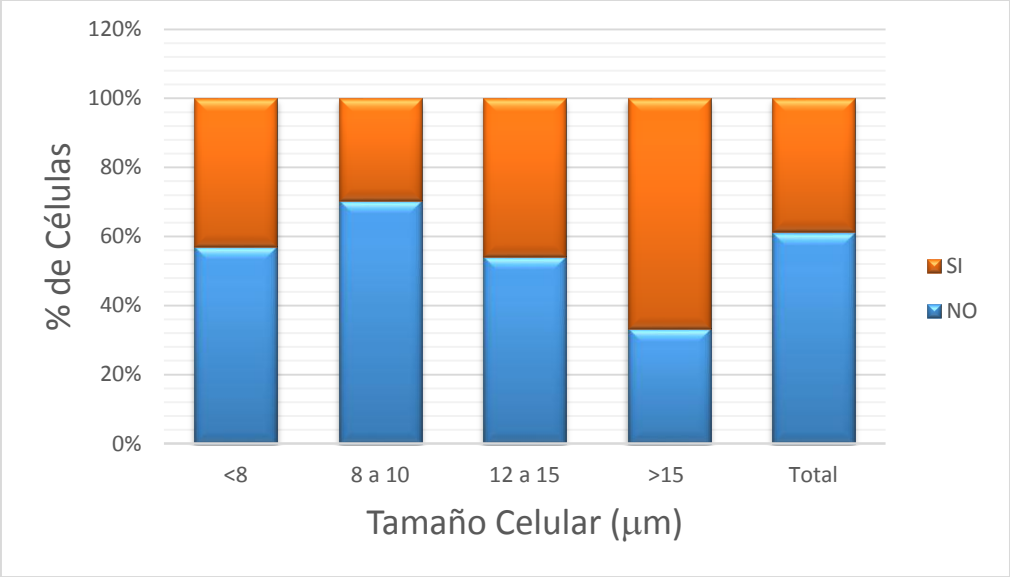


Figura 18. Relación tamaño de la célula Vs respuesta a un estímulo lumínico de 5 segundos. Graficado en porcentaje sobre el total de cada tipo de células evaluadas.

El aumento del nivel de calcio citosolico obtenido en respuesta a la luz puede provenir de dos fuentes: del calcio extracelular que ingresa a la célula a través de canales iónicos; o de calcio acumulado en organelos intracelulares, como el retículo endoplasmático. Esta consideración es importante por dos motivos: en primer lugar, si se tratara de influjo sería un evento posterior a la generación de la respuesta fisiológica (apertura de canales inducida por la iluminación) y por lo tanto no podría tener un nexo causal con ella. Por otra parte, si se tratara de liberación interna, se fortalecería la noción de que la melanopsina señaliza mediante la proteína Gq→PLC, ya que esta vía genera IP_3, el mensajero que abre canales de calcio del retículo endoplasmático. Para determinar la fuente del aumento de calcio intracelular, se compararon las respuestas a la luz en condiciones de calcio extracelular a concentración normal (2mM) y reducida. El protocolo implicaba medir una respuesta control, otra luego de cambiar la solución de perfusión a una con muy baja concentración de calcio extracelular, volver a las condiciones iniciales y registrar de nuevo la respuesta a la luz. Debido al importante rol que juega el calcio en la estabilidad de la membrana plasmática, no era aconsejable bajar el calcio extracelular a niveles nulos y se eligió en cambio utilizar una concentración muy baja en el medio extracelular (100µM). A niveles micromolares la fuerza motriz y la disponibilidad de iones no permitirían mediar un influjo apreciable. También se realizaron controles con estimulación repetitiva sin cambiar la solución de calcio, para evaluar posibles alteraciones en la respuesta debidas al simple paso del tiempo, posible de-sensibilización con estimulación múltiple, y posible deterioro del estado de salud de la célula.

La figura 19 muestra el cambio relativo en la fluorescencia (dF/F) generada por un paso de luz de 5 segundos (flechas en la región inferior del trazo). En la parte superior de la figura se observa la fluorescencia relativa medida en las tres fases del experimento. Aunque en presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} externo la respuesta disminuyó en amplitud, aún se puede ver claramente un aumento de calcio inducido por la luz, indicando una participación de la liberación de calcio desde almacenes intracelulares. Por otra parte, el cambio de fluorescencia en bajo calcio fue menor, comparado a condiciones control; en cambio en células control foto-estimuladas repetidamente (sin variar la concentración de calcio), ese fenómeno no se observó. Una plausible interpretación es que la movilización de calcio inducida por la iluminación involucra tanto un mecanismo de liberación interna como un componente de influjo (ver Discusión). Cabe observar que en las células evaluadas, al bajar la concentración de calcio extracelular disminuye también la concentración de calcio basal.

.

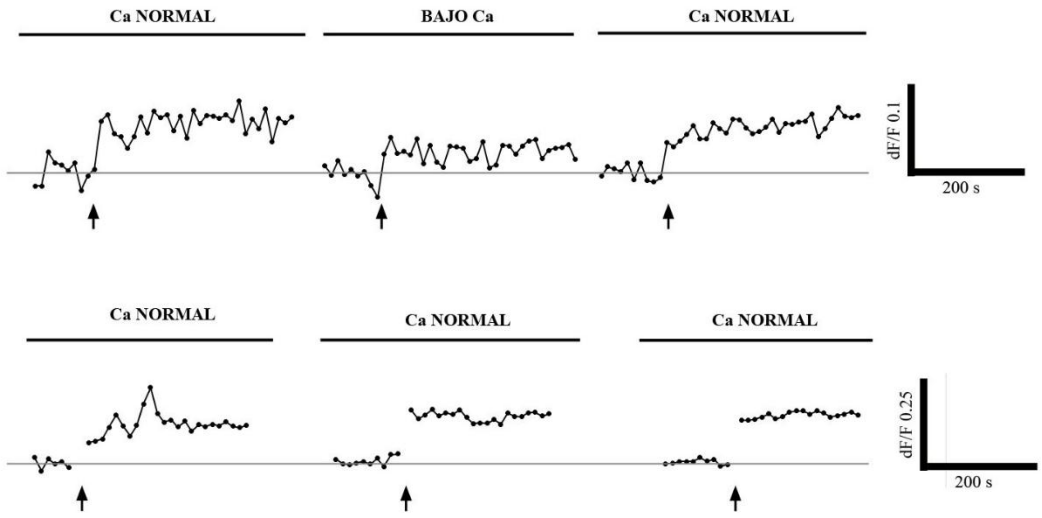


Figura 19. Cambio del nivel de calcio intracelular en baja concentración de calcio extracelular. Superior: normalización del cambio de la fluorescencia en respuesta a un estímulo lumínico de 5 segundos (flechas) en condiciones de concentración normal de Calcio extracelular (2mM) y bajo calcio extracelular (100µM). Inferior: Control en las mismas condiciones pero sin bajar la concentración de calcio extracelular. Datos obtenidos a partir de células bipolares.

Puesto que los hallazgos descritos anteriormente parecen involucrar la liberación de calcio desde compartimientos intracelulares, el siguiente paso fue determinar si el IP_3R juega un papel importante. El abanico de reactivos capaces de ejercer una acción antagonista sobre el receptor de IP3 es limitado; además, estos agentes suelen presentar problemas de especificidad y limitaciones en cuanto a la forma de aplicación. Entre los agentes permeables a la membrana y por lo tanto aptos para ser administrados sin necesidad de diálisis o inyección intracelular se encuentra el 2-APB, al cual se ha atribuido la capacidad de antagonizar el IP_3R (Maruyama *et al.,* 1997); desafortunadamente, también tiene otros efectos (Bilmen *et al.,* 2002). Se usó el fármaco 2-APB a una concentración de 100 µM, eyectándolo a presión de una micropipeta ubicada a poca distancia de la célula, técnica denominada "aplicación por puffer". El trazo superior de la figura 20 muestra que al aplicar 2-APB aumenta la fluorescencia al interior de la célula sin aplicar una luz prolongada de estimulación. Este efecto sorpresivo puede indicar una acción del fármaco sobre la concentración basal del calcio interno; los posibles mecanismos de acción del 2-APB serán considerados en la Discusión. Además, el trazo inferior muestra que en presencia del fármaco 2-APB una célula responsiva sigue respondiendo a una luz de 5 segundos.

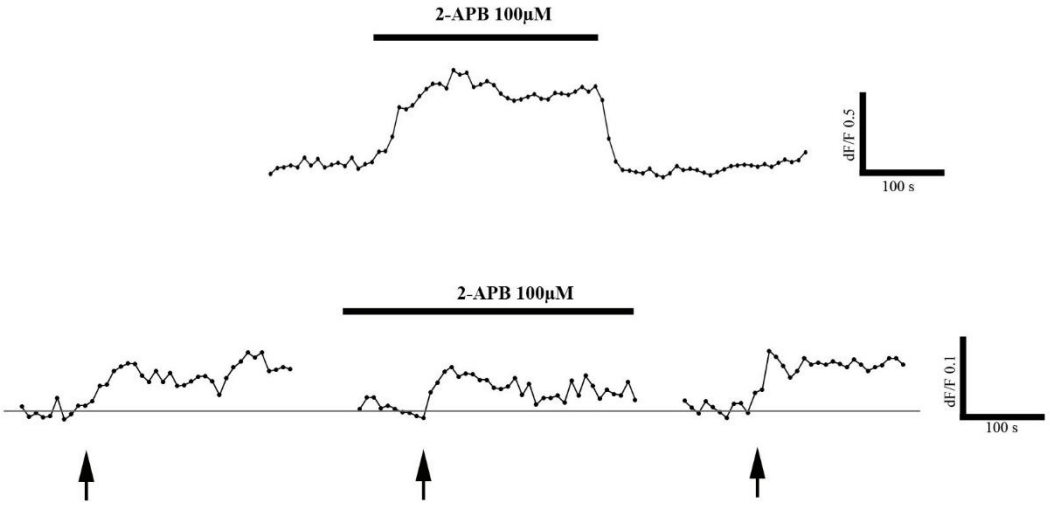


Figura 20. Cambio del nivel de calcio intracelular por efecto del 2-APB y respuesta a la luz en presencia del fármaco. Superior: Cambio de la fluorescencia en respuesta a la aplicación, por medio de "Puffer", de 2-APB en concentración de 100µM. Inferior: Respuesta a la luz antes (izquierda), durante (centro) y después de la aplicación de 2-APB en concentración 100µm. datos normalizados con el máximo dF/F. Registros tomados de una célula bipolar.

3. Discusión

3.1 Retinas de embrión de pollo como modelo para el estudio de la melanopsina.

El descubrimiento de un nuevo fotopigmento, la melanopsina, y de neuronas intrínsecamente fotosensibles entre la capa de células ganglionares de la retina de mamíferos ha cambiado radicalmente nuestro entendimiento de la fotorecepción. Anteriormente se atribuía toda función de detección de luz a los conos y bastones, y se creía que las diferentes funciones (por ejemplo, visión espacial *vs.* regulación de ciclos circadianos) eran el resultado de diferente procesamiento de la información generada por dichos foto-receptores. En cambio, se sabe hoy en día que funciones no relacionadas con visión espacial dependen de células especializadas que expresan melanopsina. Dichos hallazgos han estimulado esfuerzos para entender cuáles mecanismos de señalización acoplan la activación de la melanopsina a cambios del potencial eléctrico de la membrana celular. Algunos acercamientos se basaron en expresión heteróloga de melanopsina, pero los resultados fueron contradictorios, debido a la promiscuidad de los receptor de 7 dominios transmembrada, que pueden acoplarse a diferentes proteínas G heterotriméricas presentes en el sistema de expresión. Por lo tanto, se hace imprescindible el estudio de dichos mecanismos en sistemas nativos, pero la escasez de neuronas fotosensibles entre las células ganglionares y su difícil identificación han entorpecido el progreso. En algunas aves, incluyendo el pollo, se ha reportado que la melanopsina se expresa masivamente en otras células de la retina, pero se desconocía la identidad de esas clases específicas de neuronas, y la posibilidad de que existieran entonces aún más tipos de células directamente responsivas a la luz. El objetivo del presente estudio era identificar tipos de células retinales que expresan melanopsina, determinar si la iluminación conduce a algún cambio fisiológico que indicara que dicho fotopigmento es funcional en tales células, y empezar a bosquejar posibles mecanismos de señalización de luz. Se obtuvo evidencia de que células bipolares y horizontales expresan melanopsina y se encontró por primera vez que estas clases de células no son solamente neuronas de segundo orden que transmiten la información generada por conos y bastones, sino poseen la capacidad intrínseca de responder a la luz. Finalmente, se determinó que la fotoestimulación lleva a movilización de calcio y que en estas células

están presentes elementos de la cascada de transducción de los fosfoinositidos. Estas observaciones fortalecen la noción de un paralelismo entre los sensores de luz que utilizan melanopsina en los invertebrados y los receptores visuales 'rábdomericos' de los ojos de los invertebrados.

El trabajo se basó en el uso de neurona enzimáticamente disociadas: si bien el uso de fármacos para bloquear la actividad pre sináptica ha sido una herramienta útil para un gran número de estudios realizados en rodajas de tejido, esta técnica siempre dejará la posibilidad abierta de que el bloqueo no sea completo, conllevando a posibles interpretaciones erróneas de los resultados. Para evitar estas posibles interacciones sinápticas no deseadas, la mejor herramienta es aislar físicamente la célula, de modo que cualquier respuesta medida sea propia de la célula sin intervención sináptica. Para el estudio de la foto-transducción mediada por la melanopsina en mamíferos se han llevado a cabo estudios aislando físicamente las células de toda conexión sináptica; pero debido a que se trata de una sub-población fuertemente minoritaria estos experimentos requieren un arduo trabajo y costos elevados: por ejemplo, aislar las células que expresan melanopsina por medio de un anticuerpo "técnica de Immunopanning" (Hartwick *et al.,* 2005), marcarlas retrógradamente desde los núcleos a los cuales proyectan para posteriormente aislarlas de la retina (Berson *et al.,* 2002), o generando ratones transgénicos con proteínas fluorescentes dentro del locus de la melanopsina (Do *et al.,* 2009). Debido a estos problemas, el presente estudio postula a la retina de embrión de pollo como un modelo experimental alternativo el cual expresa abundantemente la melanopsina; una vez aisladas, sus células retienen tanto su morfología como su viabilidad fisiológica, y responden intrínsecamente a la luz, facilitando los estudios funcionales de este foto-pigmento en un sistema nativo de vertebrados. Finalmente, se trata de un modelo económico, de fácil acceso y alta eficiencia.

Los resultados obtenidos corroboran los reportes sobre la expresión del transcrito de la melanopsina en las capas nuclear interna y ganglionar de la retina de pollo (Bailey *et al.,* 2005, Tomonari *et al.,* 2005), así como los que localizaron dicha proteínas por inmuno-detección (Lima *et al.,* 2006, Guido *et al.,* 2010). Además los extienden mostrando la identidad de las células implicadas.

3.2 Melanopsina funcional en células de la capa nuclear interna de la retina.

En peces se ha reportado la expresión de la melanopsina en células horizontales y se ha registrado una respuesta de estas células a la luz (Cheng *et al.,* 2007). Pero el presente estudio se convierte en el primer reporte de sensibilidad a la luz en células bipolares, horizontales y amacrinas de la retina de embriones de pollo. Estas respuestas involucran un aumento del nivel de calcio citosólico con una latencia larga, aproximadamente 40s, y un tiempo de caída que varía entre los 40s y más de 300s. En general la forma de las

respuestas de aumento de calcio se clasificaron las respuestas en tres tipos: transitorias, transitorias largas y sostenidas. Lo que podría llevarnos a pensar que la variabilidad de respuestas está involucrando un amplio rango de acción en cuanto a la señalización de la luz, es decir, las células podrán estar involucradas en respuestas en distintas escalas de tiempo El decaimiento de calcio en diferentes tiempos podría deberse posiblemente a la expresión diferencial de proteínas que ayudan en la regulación del nivel de calcio intracelular, como por ejemplo, expresión diferencial de bombas ATPasas de calcio de la membrana plasmática (PMCA) que sacan el calcio de manera activa del interior hacia el exterior de la célula; bombas SERCA, que almacenan calcio en el retículo endoplasmático y ayudan a mantener bajos los niveles de calcio en el citosol; calmodulina, uno de los mayores reguladores de calcio en el citoplasma; entre otras, pero se hace necesario corroborar si existe alguna expresión diferencial en las células que responden a cada una de las respuestas.

Recientemente se ha postulado la acción de las células ganglionares intrínsecamente fotosensible (ipRGC) no solamente como reguladoras de la visión no espacial sino que también se les ha atribuido un papel en la regulación de la visión espacial (Schmith *et al.,* 2011, McMahon *et al.,* 2012). Sin duda, la expresión abundante del foto-pigmento melanopsina en las células bipolares, horizontales y amacrinas de la retina de embrión de pollo, podrían estar indicando que este foto-pigmento posiblemente está involucrado en la regulación de la visión espacial en estos organismos, ya que toda señal de luz captada por los conos y bastones es necesariamente conducida hacia las células ganglionares y el sistema nervioso central a través de las células bipolares, y es regulada por células horizontales y amacrinas.

Al igual que la señalización mediada por melanopsina en otros organismos (Hartwick *et al.,* 2007, Cheng *et al.,* 2007; Hankin *et al.,* 2003), la señalización por melanopsina en células de la capa nuclear interna de la retina de embrión de pollo muestra una baja sensibilidad, respondiendo solo a luces muy fuertes y prolongadas, y muestran una latencia larga, indicando que posiblemente se trata de una señalización homologa a la de otros vertebrados, como procesos de visión no espacial; además, mostraría que no está involucrada de manera directa en la visión espacial sino que posiblemente está involucrada en su regulación.

3.3 Cascada de fosfoinositidos en la señalización de melanopsina.

La vía de señalización desencadenada por la melanopsina en otros organismos involucra la activación de una cascada de fosfoinositidos conllevando la activación de una proteína Gq. En la retina de embrión de pollo se expresa la proteína Gq pero se hace necesario estudios de co-localización con la melanopsina para poder postular un posible nexo funcional. Otro de los pasos de la cascada de los fosfoinositidos involucra la activación de

un receptor de IP_3 en el retículo endoplasmático que media la liberación de calcio hacia el citoplasma. En las células aisladas de la retina de embrión de pollo se observó un aumento de calcio en respuesta a la luz, aumento de calcio que se mantuvo luego de bajar las concentraciones de calcio intracelular, lo que indicaría que se libera calcio desde el retículo endoplasmático, aunque su cambio relativo fue un poco más pequeño que en condiciones control. Si el origen del calcio citosólico fuera únicamente desde compartimientos intracelulares, al bajar el nivel de extracelular (que lleva a una concentración de calcio citosólico menor) una luz de 5 segundos que activa una misma cantidad de moléculas en la cascada de señalización, debería producir un aumento relativo de la fluorescencia mayor en condiciones de bajo calcio extracelular que en condiciones de calcio extracelular normal. Cosa que no se observó en nuestros resultados, lo que podría estar evidenciando la participación de canales iónicos permeables a calcio, los cuales se activan como consecuencia de la foto-estimulación. Alternativamente, la baja en el calcio citosólico basal podría acompañarse de una disminución en el nivel de calcio almacenado. Por esta razón se hace necesario robustecer nuestros resultados vaciando los almacenes de calcio intracelulares y observando si persiste la respuesta.

El hecho que las células de embrión de pollo que expresan melanopsina involucra un aumento de calcio citosólico y que este aumento tenga como origen en gran medida los almacenes de calcio intracelular, podría indicar que al igual que en la foto-recepción en invertebrados (Hardie 2001), el anfioxo (Angueyra *et al.,* 2012) y células ganglionares de vertebrados (Hartwick *et al.,* 2007, Contin *et al.,* 2010), la señalización por melanopsina involucra la cascada de señalización de fosfoinositidos en las células bipolares y horizontales del embrión de pollo.

En experimentos dirigidos a esclarecer el posible rol de los receptores de IP3, se encontró un aumento del calcio basal al aplicar el inhibidor l 2-APB. Sin embargo, efectos adicionales de este fármaco sobre la bomba de calcio ATPasa del retículo sarco/endoplasmático (SERCA) habían sido reportados (Bilmen *et al.,* 2002). La inhibición de las bombas SERCA evita que se recapture el calcio del citoplasma hacia retículo endoplasmático, haciendo que se eleven las concentraciones de calcio en el citoplasma; este efecto del 2-APB es más fuerte en la isoforma SERCA 2B que en la isoforma SERCA 1A, con una concentración inhibitoria media o IC_{50} de 325 y 725 µM respectivamente (Bilmen *et al.,* 2002). Podemos especular que el aumento de la concentración de calcio en el citoplasma gatillado por 2-APB en células de retina de pollo, se debe a la acción inhibitoria del 2-APB sobre las bombas SERCA; pero tampoco se puede descartar un posible efecto directo del 2APB sobre el indicador de calcio Fluo 4.

Aún en presencia de 2APB, las células aisladas responden a la luz con un aumento en la fluorescencia; por otra parte la reducción del calcio externo reduce la señal de calcio inducida por la luz. Ambos resultados pueden indicar la participación de influjo de calcio desde el exterior de la célula. Para poder esclarecer cualquiera de estas hipótesis, un

posible acercamiento sería el uso de metodologías que vacíen completamente el retículo endoplasmático (por ejemplo el fármaco tapsigargina).

Finalmente, para esclarecer en detalle la cascada de señalización involucrada en la activación de la melanopsina, se hace necesario evaluar el rol de otros elementos de la cascada de fosfoinositidos, como la PLC, el DAG y la posible activación de corrientes de membrana, posiblemente a través de canales TRP como se ha visto en anfioxo (Angueyra *et al.,* 2012).

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La retina de embrion de pollo es un buen modelo para el studio de la melanopsina en vertebrados, presenta alta expression del foto-pigmento y es funcional.

- La fotosensibilidad no es restringida unicamente a conos, bastones y algunas células ganglionares; Tambien células Bipolares y Horizontales son capaces de sensar la luz.

4.2 Recomendaciones

1. Realizar estudios farmacológicos para determinar la cascada de señalización usada por la melanopsina en las células de la retina de embrión de pollo.
2. Realizar estudios electrofisiológicos para determinar posibles cambios en las corrientes de membrana en respuesta a la luz en células bipolares y horizontales aisladas de toda conexión sináptica.

5. Bibliografía

Allen, A. E., Cameron, M. a, Brown, T. M., Vugler, A. a, & Lucas, R. J. (2010). Visual responses in mice lacking critical components of all known retinal phototransduction cascades. *PloS one*, *5*(11), e15063. doi:10.1371/journal.pone.0015063

Angueyra, J. M., Pulido, C., Malagón, G., Nasi, E., & Gomez, M. D. P. (2012). Melanopsin-Expressing Amphioxus Photoreceptors Transduce Light via a Phospholipase C Signaling Cascade. *PLoS ONE*, *7*(1), e29813. doi:10.1371/journal.pone.0029813

Bailey, M. J., & Cassone, V. M. (2005). Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. *Brain research Molecular brain research*, *134*(2), 345–348. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.11.003

Bellingham, J., Chaurasia, S. S., Melyan, Z., Liu, C., Cameron, M. a, Tarttelin, E. E., Iuvone, P. M., *et al.,*. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS biology*, *4*(8), e254. doi:10.1371/journal.pbio.0040254

Berson, D. M., Dunn, F. a, & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, *295*(5557), 1070–1073. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834835

Bilmen, J. G., Wootton, L. L., Godfrey, R. E., Smart, O. S., & Michelangeli, F. (2002). Inhibition of SERCA Ca2+ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *European Journal of Biochemistry*, *3687*(15), 3678–87. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03060.x

Biology, C. (1998). Melanopsin : An opsin in melanophores , brain , and eye, *95*(January), 340–345.

Bluhm, a. P. C., Obeid, N. N., Castrucci, a. M. L., & Visconti, M. a. (2012). The expression of melanopsin and clock genes in Xenopus laevis melanophores and their modulation by melatonin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *45*(8), 730–736. doi:10.1590/S0100-879X2012007500088

Britain, G. (1983). IONIC CURRENTS OF SOLITARY HORIZONTAL CELLS ISOLATED, 329–351.

Chaurasia, S. S., Rollag, M. D., Jiang, G., Hayes, W. P., Haque, R., Natesan, a, Zatz, M., *et al.,*. (2005). Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *Journal of Neurochemistry*, *92*(1), 158–170. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02874.x

Chen, S.-K., Badea, T. C., & Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, *476*(7358), 92–5. doi:10.1038/nature10206

Cheng, N., Tsunenari, T., & Yau, K. (2009). Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts. *Nature*, *460*(7257), 899–903. doi:10.1038/nature08175

Contin, M. A., Verra, D. M., & Guido, M. E. (2006). An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(14), 2648–50. doi:10.1096/fj.06-6133fje

Contín, M. A., Verra, D. M., Salvador, G., Ilincheta, M., Giusto, N. M., & Guido, M. E. (2010). Light activation of the phosphoinositide cycle in intrinsically photosensitive chicken retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, *51*(11), 5491–8. doi:10.1167/iovs.10-5643

Crousillac, S., LeRouge, M., Rankin, M., & Gleason, E. (2003). Immunolocalization of TRPC channel subunits 1 and 4 in the chicken retina. *Visual neuroscience*, *20*(4), 453–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14658773

Cumming, G., Fidler, F., & Vaux, D. L. (2007). Error bars in experimental biology. (P. J. B. Hart & J. D. Reynolds, Eds.) *The Journal of Cell Biology*, *177*(1), 7–11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420288

Del Pilar Gomez, M., & Nasi, E. (2009). Prolonged calcium influx after termination of light-induced calcium release in invertebrate photoreceptors. *The Journal of general physiology*, *134*(3), 177–89. doi:10.1085/jgp.200910214

Doh, S. T., Hao, H., Loh, S. C., Patel, T., Tawil, H. Y., Chen, D. K., Pashkova, A., *et al.*,. (2010). Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques. *BMC developmental biology*, *10*, 8. doi:10.1186/1471-213X-10-8

Drivenes, Ø., Søviknes, A. M., Ebbesson, L. O. E., Fjose, A., Seo, H.-C., & Helvik, J. V. (2003). Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. *The Journal of comparative neurology*, *456*(1), 84–93. doi:10.1002/cne.10523

Edqvist, P. H. D., Myers, S. M., & Hallböök, F. (2008). Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *European journal of histochemistry : EJH*, *50*(2), 147–54. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864127

Ferreira, P. a, Shortridge, R. D., & Pak, W. L. (1993). Distinctive subtypes of bovine phospholipase C that have preferential expression in the retina and high homology

to the norpA gene product of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(13), 6042–6. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Foster, R. G. (1998). Shedding light on the biological clock. *Neuron*, *20*(5), 829–32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620688

Frigato, E., Vallone, D., Bertolucci, C., & Foulkes, N. S. (2006). Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Die Naturwissenschaften*, *93*(8), 379–85. doi:10.1007/s00114-006-0119-9

Fu, Y., Zhong, H., Wang, M.-H. H., Luo, D.-G., Liao, H.-W., Maeda, H., Hattar, S., *et al.,*. (2005). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(29), 10339–44. doi:10.1073/pnas.0501866102

Gelder, R. N. Van. (2001). Review Non-visual ocular photoreception, *22*, 195–205.

Graham, D. M., Wong, K. Y., Shapiro, P., Frederick, C., Pattabiraman, K., Berson, D. M., Dm, G., *et al.,*. (2008). Melanopsin Ganglion Cells Use a Membrane-Associated Rhabdomeric Phototransduction Cascade, 2522–2532. doi:10.1152/jn.01066.2007.Melanopsin

Güler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H.-W., Barnard, A. R., *et al.,*. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, *453*(7191), 102–5. doi:10.1038/nature06829

Han, Y., Jacoby, R. a, & Wu, S. M. (2000). Morphological and electrophysiological properties of dissociated primate retinal cells. *Brain research*, *875*(1-2), 175–86. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967314

Hardie, R. C. (2001). Review Phototransduction in Drosophila melanogaster, *3409*, 3403–3409.

Hartwick, A. T. E., Bramley, J. R., Yu, J., Stevens, K. T., Allen, C. N., Baldridge, W. H., Sollars, P. J., *et al.,*. (2007). Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(49), 13468–80. doi:10.1523/JNEUROSCI.3626-07.2007

Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells : Architecture , Projections , and Intrinsic. *Science*, *295*(5557), 1065–1070. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2885915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Huang, H., Wang, Z., Weng, S.-J., Sun, X.-H., & Yang, X.-L. (2013). Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Progress in retinal and eye research*, *32*, 64–87. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.07.003

Hughes, S., Welsh, L., Katti, C., González-Menéndez, I., Turton, M., Halford, S., Sekaran, S., *et al.,*. (2012). Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PloS one*, *7*(4), e34531. doi:10.1371/journal.pone.0034531

Jenkins, A., Mun, M., Tarttelin, E. E., Bellingham, J., Foster, R. G., & Hankins, M. W. (2003). VA Opsin , Melanopsin , and an Inherent Light Response within Retinal Interneurons, *13*, 1269–1278. doi:10.1016/S

Kasahara, T., Okano, T., Haga, T., & Fukada, Y. (2002). Opsin-G11-mediated signaling pathway for photic entrainment of the chicken pineal circadian clock. *Journal of Neuroscience*, *22*(17), 7321–7325. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12196552

Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y., & Terakita, A. (2005). Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Current biology : CB*, *15*(11), 1065–9. doi:10.1016/j.cub.2005.04.063

Kumbalasiri, T., Rollag, M. D., Isoldi, M. C., Castrucci, a M. D. L., & Provencio, I. (n.d.). Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochemistry and photobiology*, *83*(2), 273–9. doi:10.1562/2006-07-11-RA-964

Lagerström, M. C., Hellström, A. R., Gloriam, D. E., Larsson, T. P., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2006). The G protein-coupled receptor subset of the chicken genome. *PLoS computational biology*, *2*(6), e54. doi:10.1371/journal.pcbi.0020054

Lee, C. W., Park, D. J., Lee, K. H., Kim, C. G., & Rhee, S. G. (1993). Purification, molecular cloning, and sequencing of phospholipase C-beta 4. *The Journal of biological chemistry*, *268*(28), 21318–27. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407970

Lima, L. H. R. G., Scarparo, A. C., Isoldi, M. C., Visconti, M. a., & Castrucci, A. M. L. (2006). Melanopsin in chicken melanocytes and retina. *Biological Rhythm Research*, *37*(5), 393–404. doi:10.1080/09291010600870230

Lucas, R J, Hattar, S., Takao, M., Berson, D. M., Foster, R. G., & Yau, K.-W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*, *299*(5604), 245–247. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522249

Lucas, Robert J. (2006). Chromophore regeneration: melanopsin does its own thing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(27), 10153–4. doi:10.1073/pnas.0603955103

Malchow, R. P., Qian, H. H., Ripps, H., & Dowling, J. E. (1990). Structural and functional properties of two types of horizontal cell in the skate retina. *The Journal of general physiology*, *95*(1), 177–98. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2216294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Nayak, S. K., Jegla, T., & Panda, S. (2007). Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, *64*(2), 144–154. doi:10.1007/s00018-006-5581-1

Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., & Jegla, T. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5709), 600–4. doi:10.1126/science.1105121

Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., Pletcher, M. T., *et al.,*. (2000). Melanopsin Is Required for Non – Image-Forming Photic, (Table 1), 24–26.

Peirson, S., & Foster, R. G. (2006). Melanopsin: another way of signaling light. *Neuron*, *49*(3), 331–9. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.006

Perez-Leighton, C. E., Schmidt, T. M., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., & Kofuji, P. (2011). Intrinsic phototransduction persists in melanopsin-expressing ganglion cells lacking diacylglycerol-sensitive TRPC subunits. *The European journal of neuroscience*, *33*(5), 856–67. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07583.x

Pires, S. S., Hughes, S., Turton, M., Melyan, Z., Peirson, S. N., Zheng, L., Kosmaoglou, M., *et al.,*. (2009). Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(39), 12332–42. doi:10.1523/JNEUROSCI.2036-09.2009

Programme, N. T. (1998). Changes in the Pupillary Light Reflex of Pigmented Royal College, 719–730.

Provencio, I, Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*, *20*(2), 600–605. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632589

Provencio, Ignacio, & Warthen, D. M. (2012). Melanopsin , the photopigment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. doi:10.1002/wmts.29

Receptor, T., & Channels, P. (2002). Transient receptor potential channels, *1616*.

Schmidt, T. M., Chen, S.-K., & Hattar, S. (2011). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends in neurosciences*, *34*(11), 572–80. doi:10.1016/j.tins.2011.07.001

Schmidt, T. M., Do, M. T. H., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011). Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(45), 16094–101. doi:10.1523/JNEUROSCI.4132-11.2011

Snyder, S. H., & Biology, S. (2010). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells, 1547–1581. doi:10.1152/physrev.00013.2010.

Terakita, A., Tsukamoto, H., Koyanagi, M., Sugahara, M., Yamashita, T., & Shichida, Y. (2008). Expression and comparative characterization of Gq-coupled invertebrate visual pigments and melanopsin. *Journal of neurochemistry*, *105*(3), 883–90. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05184.x

Tomonari, S., Migita, K., Takagi, A., Noji, S., & Ohuchi, H. (2008). Expression patterns of the opsin 5-related genes in the developing chicken retina. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *237*(7), 1910–22. doi:10.1002/dvdy.21611

Tomonari, S., Takagi, A., Akamatsu, S., Noji, S., & Ohuchi, H. (2005). A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, *234*(3), 783–790. doi:10.1002/dvdy.20600

Torii, M., Kojima, D., Okano, T., Nakamura, A., Terakita, A., Shichida, Y., Wada, A., *et al.,*. (2007). Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity. *FEBS letters*, *581*(27), 5327–31. doi:10.1016/j.febslet.2007.10.019

Tu, D. C., Batten, M. L., Palczewski, K., & Van Gelder, R. N. (2004). Nonvisual photoreception in the chick iris. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5693), 129–31. doi:10.1126/science.1101484

Van Hook, M. J., & Berson, D. M. (2010). Hyperpolarization-activated current (I(h)) in ganglion-cell photoreceptors. *PloS one*, *5*(12), e15344. doi:10.1371/journal.pone.0015344

Verra, D. M., Contín, M. A., Hicks, D., & Guido, M. E. (2011). Early onset and differential temporospatial expression of melanopsin isoforms in the developing chicken retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, *52*(8), 5111–20. doi:10.1167/iovs.11-75301

Walker, M. T., Brown, R. L., Cronin, T. W., & Robinson, P. R. (2008). Photochemistry of retinal chromophore in mouse melanopsin. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, *105*(26), 8861–5. doi:10.1073/pnas.0711397105

Warren, E. J., Allen, C. N., Brown, R. L., & Robinson, D. W. (2006). The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *The European journal of neuroscience*, *23*(9), 2477–87. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04777.x

Xue, T., Do, M. T. H., Riccio, a, Jiang, Z., Hsieh, J., Wang, H. C., Merbs, S. L., *et al.*,. (2011). Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature*, *479*(7371), 67–73. doi:10.1038/nature10567

Yamashita, M., & Wässle, H. (1991). Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *11*(8), 2372–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714492

Zele, A. J., Feigl, B., Smith, S. S., & Markwell, E. L. (2011). The circadian response of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *PloS one*, *6*(3), e17860. doi:10.1371/journal.pone.0017860

Zhang, D.-Q., Belenky, M. a, Sollars, P. J., Pickard, G. E., & McMahon, D. G. (2012). Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. *PloS one*, *7*(8), e42647. doi:10.1371/journal.pone.0042647