



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

EFFECTOS DEL CANNABINOIDE HU210 Y LA NICOTINA  
EN UN MODELO DE DEGENERACIÓN DE LA RETINA

Cesare Altavilla



Tesis **Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología**

Facultad de Ciencias

EFFECTOS DEL CANNABINOIDE HU210 Y LA NICOTINA EN UN MODELO  
DE DEGENERACIÓN DE LA RETINA

Autor:

**Cesare Altavilla**

Memoria presentada para aspirar al grado de  
**DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

Doctorado en Biología experimental y aplicada

Dirigida por:

Doctor Pedro Lax Zapata

Doctor Nicolás Cuenca Navarro

Septiembre 2015





# Universitat d'Alacant Universidad de Alicante

## Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología

El Dr. **Pedro Lax Zapata**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante,

El Dr. **Nicolás Cuenca Navarro**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante,

### CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria, presentada por D. Cesare Altavilla para optar al título de Doctor en Biología, titulada "Efectos del cannabinoide HU210 y la nicotina en un modelo de degeneración de la retina", ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante.

Conforme

Conforme

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Firmado: Pedro Lax Zapata

Firmado: Nicolás Cuenca Navarro



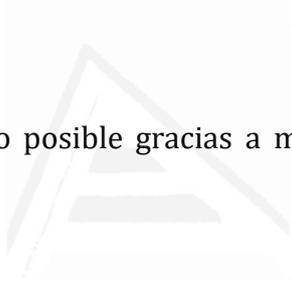
## Agradecimientos:

Quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis directores de Tesis, el Doctor Pedro Lax Zapata y el Doctor Nicolás Cuenca Navarro, los cuales permitieron la realización de este trabajo y, por haberme brindado la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación.

Agradezco a las personas que me han ayudado en la redacción de este trabajo, a todas, en particular a las que han gastado su tiempo y me han ayudado con el castellano, el cual no es mi idioma nativo.

Quiero agradecer y “felicitar” a mi perra Floe: mi familia en España, siempre presente en todos los momentos, durmiendo a mi lado, saludando a cada vuelta a casa y por haber sabido levantarme el ánimo como nadie.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a mi trabajo “externo” al mundo de la investigación.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## INDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA VISUAL .....	1
1.1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA RETINA .....	4
1.1.1.1 CAPAS Y TIPOS CELULARES DE LA RETINA.....	8
1.1.1.2 ENTRAMADO SINÁPTICO VISUAL.....	19
1.1.1.3 TRANSDUCCIÓN VISUAL.....	23
1.2. ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA.....	27
1.2.1 RETINOSIS PIGMENTARIA: CARACTERÍSTICAS Y ETIOLOGIA .....	29
1.2.1.1 ALTERACIONES FUNCIONALES Y CELULARES DE LA RETINA ASOCIADAS A LA RETINOSIS PIGMENTARIA .....	32
1.3. EL MODELO P23H: CARACTERÍSTICAS .....	37
1.4. LOS CANNABINOIDES .....	40
1.4.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y SU FUNCIÓN .....	43
1.4.1.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA RETINA .....	47
1.4.2 HU210: CARACTERÍSTICAS.....	49
1.5. EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA, CONSUMO DE ALIMENTO, CONSUMO DE AGUA Y PESO CORPORAL .....	52
1.6. LA NICOTINA Y LOS RECEPTORES NICOTINICOS.....	54
1.6.1 EFECTOS MODULADORES DE LOS RECEPTORES NICOTINICOS EN LA RETINA .....	57
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN .....	59
2.2. OBJETIVOS.....	61
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
3.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS .....	62
3.2. MICROSCOPÍA DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	65
3.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPÍA.....	65
3.2.1.1 SECCIONES VERTICALES DE RETINA .....	65
3.2.2 INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS .....	65
3.2.2.1 TINCIÓN DE NÚCLEOS.....	67
3.2.2.2 OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIO CONFOCAL .....	67
3.3. ELECTRORETINOGRAMAS (ERGs) .....	69
3.3.1 PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES PARA LOS ERGs .....	69
3.3.2 REGISTROS ELECTRORETINOGRÁFICOS.....	69
3.4. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA .....	72
3.5. MEDIDAS DE INGESTA, HIDRATACIÓN Y PESO CORPORAL .....	74
3.6. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS .....	75
3.6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO .....	75

3.6.1.1 MEDICIÓN DEL ESPESOR DE LAS CAPAS Y DEL NÚMERO DE FILAS DE FOTORECEPTORES.....	75
3.6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS CONOS .....	75
3.6.1.3 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD.....	77
3.7. ANÁLISIS DE LOS ELECTRORETINOGRAMAS (ERGs) .....	78
3.7.1 CURVA DOSIS-RESPUESTA.....	78
3.8. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA .....	80
3.8.1 ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE HU210 SOBRE EL APETITO, LA INGESTA DE AGUA Y EL PESO CORPORAL ..	80
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	80
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
4.1. CAMBIOS EN LA RESPUESTA VISUAL DE LAS RATAS P23H.....	81
4.2. ALTERACIONES CELULARES EN LAS RATAS P23H .....	85
4.2.1 ALTERACIONES LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS BIPOLARES Y HORIZONTALES EN LAS RATAS P23H. ....	89
4.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LAS RATAS P23H. ....	96
4.3.1 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LA RESPUESTA VISUAL DE LAS RATAS P23H .....	96
4.3.2 HU210 RALENTIZA LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES. ....	101
4.3.2.1 HU210 PRESERVA LA MORFOLOGÍA DE LOS FOTORRECEPTORES.....	107
4.3.2.2 HU210 PRESERVA LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS .....	110
4.3.2.3 HU210 PRESERVA LAS CÉLULAS BIPOLARES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS EN AMBAS CAPAS PLEXIFORMES. ....	112
4.3.2.4 HU210 PREVIENE LA PÉRDIDA DE CÉLULAS HORIZONTALES, DE SUS DENDRITAS Y CONTACTOS SINÁPTICOS CON LOS FOTORRECEPTORES .....	114
4.4. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA POR LA ADMINISTRACIÓN DE HU210. ....	117
4.5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON HU210 SOBRE LA INGESTA Y EL PESO. ....	120
4.5.1 CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL DE LAS RATAS TRATADAS CON HU210.....	120
4.5.1.1 CAMBIOS EN LA INGESTA Y EL CONSUMO DE AGUA DE LAS RATAS TRATADAS CON HU210. ....	124
4.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA SOBRE LA RESPUESTA VISUAL EN RATAS P23H. ....	129
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
5.1. CAMBIOS FUNCIONALES EN LA RETINA DE RATAS P23H Y EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CANNABINOIDE HU210 .....	133
5.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA RETINA DE RATAS P23H Y EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CANNABINOIDE HU210 .....	135
5.2.1 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LOS FOTORRECEPTORES.....	135
5.2.2 CAMBIOS EN LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS BIPOLARES, EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210.....	138
5.2.3 CAMBIOS EN LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS HORIZONTALES, EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 .....	142
5.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE HU210 EN LA RETINA DE RATAS P23H .....	145

5.4. EFECTOS DE HU210 SOBRE EL PESO CORPORAL, EL CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA Y LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA .....	150
5.5. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA SOBRE LA FUNCIÓN VISUAL EN RATAS P23H.....	157
5.6. EPIGENÉTICA ASOCIADA A LA RETINOSIS PIGMENTARIA.....	159
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<i>2AG</i>	<i>2-ARAQUIDONILGLICEROL</i>
<i>ACH</i>	<i>ACETILCOLINA</i>
<i>AMD</i>	<i>DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA LA EDAD (AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION)</i>
<i>AMPA</i>	<i>ÁCIDO A-AMINO-3-HIDROXI-5-METIL-4-ISOXAZOL-PROPIÓNICO</i>
<i>CB</i>	<i>CALBINDINA</i>
<i>CBs</i>	<i>CANNABINOIDES</i>
<i>CBCs</i>	<i>CANNABICROMENOS</i>
<i>CBDS</i>	<i>CANNABIDIOLES</i>
<i>CBGs</i>	<i>CANNABIGEROLES</i>
<i>CBNs</i>	<i>CANNABINOLES</i>
<i>CBNDs</i>	<i>CANNABINODIOLES</i>
<i>CBRS</i>	<i>RECEPTORES DE CANNABINOIDES (CANNABINOIDS RECEPTOR)</i>
<i>CB1R</i>	<i>RECEPTOR CANNABINOIDE TIPO 1</i>
<i>CB2R</i>	<i>RECEPTOR CANNABINOIDE TIPO 2</i>
<i>CNTF</i>	<i>FACTOR NEUROTROFICO CILIAR (CILIARY-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR)</i>
<i>DNA</i>	<i>ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO</i>
<i>DR</i>	<i>RETINOPATÍA DIABÉTICA (DIABETIC RETINOPATHY)</i>
<i>ECBs</i>	<i>ENDOCANNABINOIDES</i>
<i>EPOC</i>	<i>ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA</i>
<i>ERG</i>	<i>ELECTRORETINOGRAMA</i>
<i>EPR</i>	<i>EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA</i>
<i>FAAH</i>	<i>ENZIMA HIDROLASA DE AMIDAS Y ÁCIDOS GRASOS</i>
<i>GABA</i>	<i>ÁCIDO GAMMA-AMINO BUTÍRICO</i>
<i>GCAP</i>	<i>PROTEÍNA ACTIVADORA DE LA GUANILATO CICLASA</i>
<i>GCL</i>	<i>CAPA DE CELULAS GANGLIONARES (GANGLIONAR CELL LAYER)</i>
<i>GDP</i>	<i>GUANOSINDIFOSFATO</i>
<i>GLY</i>	<i>GLICINA</i>
<i>GLU</i>	<i>GLUTAMATO</i>
<i>GMPC</i>	<i>GUANOSINMONOFOSFATO CÍCLICO</i>
<i>GDNF</i>	<i>FACTOR NEUROTROFICO GLIAL (GLIAL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR)</i>

<i>GNB3</i>	<i>PROTEÍNA DE UNIÓN A NUCLEOTIDO GUANINA 3 (GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN 3)</i>
<i>GTP</i>	<i>GUANOSINTRIFOSFATO</i>
<i>GPR55</i>	<i>RECEPTOR ACOPLADO A PROTEINA G 55</i>
<i>iGLUR</i>	<i>RECEPTOR IONOTROPICO DE GLUTAMATO</i>
<i>I.P.</i>	<i>INTRAPERITONEAL</i>
<i>IPRGC</i>	<i>CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINIANA INTRÍNSECAMENTE FOTOSENSIBLES</i>
<i>IL</i>	<i>INTERLEUCINA</i>
<i>ILAR</i>	<i>INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO</i>
<i>ILM</i>	<i>MEMBRANA LIMITANTE INTERNA (INNER LIMITING LAYER)</i>
<i>INL</i>	<i>CAPA NUCLEAR INTERNA (INNER NUCLEAR LAYER)</i>
<i>IPL</i>	<i>CAPA PLEXIFORME INTERNA (INNER PLEXIFORM LAYER)</i>
<i>IS</i>	<i>SEGMENTOS INTERNOS (INNER SEGMENTS)</i>
<i>mACHR</i>	<i>RECEPTOR MUSCARÍNICO DE ACETILCOLINA</i>
<i>MAPK</i>	<i>MAP QUINASAS O PROTEÍNAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS</i>
<i>mGLUR</i>	<i>RECEPTOR METABOTROPICO DE GLUTAMATO</i>
<i>miRNA</i>	<i>MICRORNA</i>
<i>nACHR</i>	<i>RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA</i>
<i>NFL</i>	<i>CAPA DE FIBRAS DEL NERVIÓ ÓPTICO (NERVE FIBER LAYER)</i>
<i>NMDA</i>	<i>N-METIL-D-ASPARTATO</i>
<i>NO</i>	<i>ÓXIDO NÍTRICO</i>
<i>NOS</i>	<i>ÓXIDO NÍTRICO SINTASA</i>
<i>OLM</i>	<i>MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA (OUTER LIMITING MEMBRANE)</i>
<i>OMS</i>	<i>ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD</i>
<i>ONL</i>	<i>CAPA NUCLEAR EXTERNA (OUTER NUCLEAR LAYER)</i>
<i>ON</i>	<i>NERVIÓ ÓPTICO (OPTIC NERVE)</i>
<i>OPL</i>	<i>CAPA PLEXIFORME EXTERNA (OUTER PLEXIFORM LAYER)</i>
<i>OS</i>	<i>SEGMENTOS EXTERNOS (OUTER SEGMENTS)</i>
<i>PB</i>	<i>TAMPÓN FOSFATO</i>
<i>PBX</i>	<i>TRITON X -100 AL 1% EN PB</i>
<i>PKC-A</i>	<i>PROTEÍNA KINASA C ISOFORMA A</i>
<i>RCS</i>	<i>ROYAL COLLEGE SURGEON</i>
<i>RHO</i>	<i>RODOPSINA</i>
<i>ROS</i>	<i>ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (REACTIVE OXYGEN SPECIES)</i>

<i>RP</i>	<i>RETINOSIS PIGMENTARIA</i>
<i>RPAD</i>	<i>RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICA DOMINANTE</i>
<i>RPAR</i>	<i>RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICA RECESIVA</i>
<i>RPX</i>	<i>RETINOSIS PIGMENTARIA LIGADA AL CROMOSOMA X</i>
<i>RPGR</i>	<i>RETINOSIS PIGMENTARIA, GEN REGULADOR DE ACTIVIDAD GTPASA</i>
<i>SNC</i>	<i>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</i>
<i>SiRNA</i>	<i>RNA DE INTERFERENCIA (SHORT INTERFERING RNA)</i>
<i>SYP</i>	<i>SINAPTOFISINA</i>
<i>THCs</i>	<i>TETRAHIDROCANNABINOLES</i>
<i>TRPV1</i>	<i>RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITORIO VANILLOID 1</i>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## RESUMEN

La retina es un tejido sensible a la luz que recubre la superficie interna del ojo. La complejidad estructural y funcional de la retina hacen de este tejido uno de los más vulnerables a alteraciones provocadas por todo tipo de lesión o enfermedad. Las enfermedades del sistema visual conllevan para los sujetos afectados una mengua en la calidad de vida. Entre las enfermedades degenerativas de tipo genético del sistema visual, la retinosis pigmentaria (RP) es una de las más importantes por incidencia y porque al día de hoy no existe terapia curativa efectiva.

La RP comprende un conjunto de enfermedades neurodegenerativas de la retina que afectan principalmente a los fotorreceptores, produciendo una pérdida gradual de la visión y desembocando paulatinamente en ceguera. Sin embargo, son varias las alternativas terapéuticas que se están investigando en la actualidad con el fin curar la enfermedad. La terapia génica, las células encapsuladas, la optogenética, el trasplante de células madre y, por último, los chips electrónicos, son estrategias con un futuro esperanzador en la curación de la enfermedad. Mientras tanto, con el objetivo de retardar la evolución de la enfermedad y la degeneración del sistema visual, se ha planteado estudiar otros posibles tratamientos que puedan retrasar la evolución de la RP y mejorar la calidad de vida de los sujetos afectados. La investigación en los últimos 20 años, gracias a las nuevas tecnologías disponibles, ha demostrado que las sustancias antiapoptóticas, antioxidantes, factores tróficos y neuroprotectores influyen la degeneración retiniana. El presente trabajo persigue estudiar 2 sustancias, una de origen natural y otra sintética, con el objetivo de encontrar agentes capaces de enlentecer el curso degenerativo de la retina en el modelo murino de retinosis pigmentaria P23H, siempre teniendo en cuenta la inquietud de encontrar un tratamiento terapéutico aplicable a seres humanos en el futuro. El objetivo de este trabajo es determinar el posible potencial terapéutico, en tratamiento crónico, de las sustancias elegidas.

El Cannabinoide sintético HU210 podría retrasar o prevenir la degeneración y la muerte de los fotorreceptores y del entramado sináptico de la retina. En anteriores estudios publicados, HU210 protege las células neuronales en varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el estrés isquémico. Además, se han descrito efectos sobre la reducción de la presión intraocular en relación con el glaucoma.

La nicotina podría retrasar o prevenir la degeneración y la muerte de los fotorreceptores y otras neuronas de la retina, actuando sobre los receptores nicotínicos. En este caso la

bibliografía es un poco más escasa y ambigua, pero quisimos comprobar si la administración crónica de nicotina podría tener algún efecto positivo sobre el transcurso de la enfermedad retiniana.

La eficacia de los tratamientos fue evaluada mediante registros electrorretinográficos, con objeto de medir la actividad funcional de la retina.

También se utilizaron métodos de inmunohistoquímica con el objetivo de caracterizar los efectos de HU210 sobre la morfología y conectividad sináptica de la retina. A la vez, evaluamos eventuales efectos de HU210 sobre el peso, apetito y consumo de agua de los animales objeto de investigación.

Se espera con estos estudios esclarecer el posible potencial terapéutico de estas sustancias. Este trabajo se ha realizado sobre ratas de la línea P23H-3, pero todos los resultados esperamos sean, con el tiempo necesario, aplicables a seres humanos afectados por la RP.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# *1. INTRODUCCIÓN*

## *1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA VISUAL*

Los sentidos son el mecanismo fisiológico de la percepción, y permiten detectar lo que está a nuestro alrededor, así como determinados estados internos del organismo. Los receptores sensoriales son los encargados de captar los estímulos externos e internos. El estudio y clasificación de los sentidos se lleva cabo por muchas ciencias como la neurociencia, la psicología cognitiva y la filosofía de la percepción. Hay muchas clasificaciones de los sentidos, tradicionalmente se dividen en 5 sentidos, aunque no hay univocidad en la comunidad científica. La visión es uno de los sentidos que la evolución ha desarrollado para permitir al organismo adaptarse continuamente a su entorno. Existen especies de mamíferos donde este sentido es complementario a otros más utilizados. En el ser humano, la visión es de suma trascendencia, quizás el sentido más utilizado, y la degeneración de sus estructuras conlleva un deterioro importante de la calidad de vida de los individuos.

La visión, o sentido de la vista, es una función compleja, en la que intervienen numerosas estructuras. Para las personas en general, ojos y visión son sinónimos. Pero este concepto es erróneo, ya que los ojos son sólo la parte visible de un amplio sistema que se extiende hasta la porción más posterior del cerebro. Es decir, que el ojo es simplemente la primera etapa de un sistema complejo y maravilloso.

El sistema visual es parte del sistema nervioso central (SNC) y permite detectar estímulos luminosos e interpretarlos con el fin de construir una representación del entorno. La visión se caracteriza por cumplir diferentes y complementarias funciones que incluyen: la percepción de la luz y del movimiento, la percepción e identificación de objetos, la percepción de la distancia a través la binocularidad, etc. Además, el sistema visual influencia de manera importante procesos fisiológicos como ritmos circadianos, emociones y comportamiento (Carlson 2012).

El sistema visual está formado por diferentes partes y cada una desempeña su función específica. Principalmente se compone del ojo, el nervio óptico, el quiasma óptico, el tracto visual, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual (Figura 1). El ojo funciona como una cámara que proyecta imágenes sobre la retina, y básicamente se compone de la cornea, la pupila, una cámara anterior con humor acuoso, el iris, una cámara posterior con humor acuoso, el musculo y cuerpo ciliar, el cristalino, el humor vítreo, la retina, el coroides y la esclera. Todas las estructuras enumeradas son importantes, pero la fina capa de tejido

nervioso llamada retina es la estructura del ojo que capta los estímulos lumínicos e imágenes del mundo exterior y los convierte en informaciones eléctricas interpretables por el SNC (Kolb H. et al. 2013),

En humanos el globo ocular u ojo es una estructura esférica de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. La parte exterior, denominada cubierta, se compone de varias capas de tejido: la capa más externa o esclera tiene una función protectora y un color característico blanco, cubre unos cinco sextos de la superficie ocular total y se diferencia y prolonga en la parte anterior con la córnea (Figura 1A).

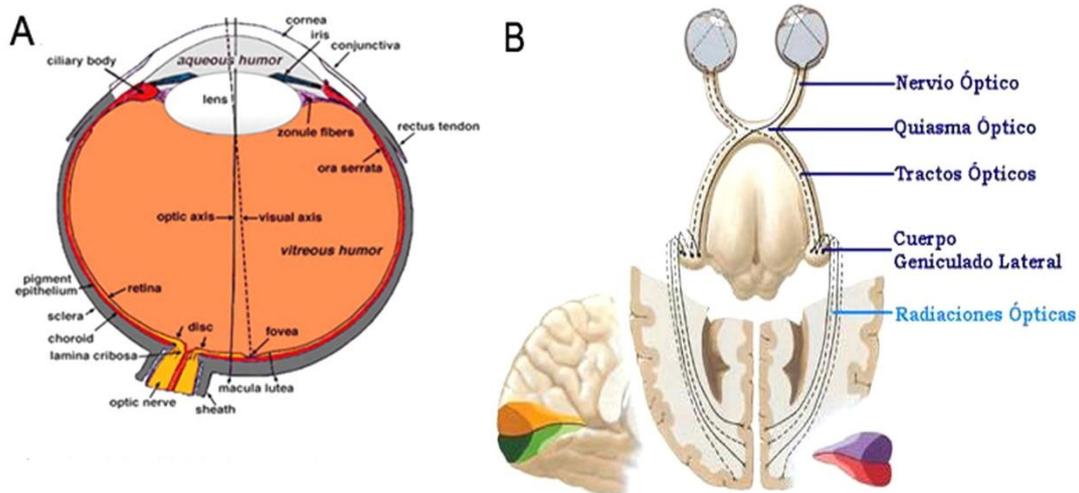
La córnea es una membrana transparente a través de la cual la luz penetra en el interior del ojo. Tiene un espesor medio de 550  $\mu\text{m}$ . La cornea está compuesta por 5 o 6 capas, según interpretaciones. Las capas constan de: la película lagrimal, que se puede considerar una parte más de la córnea, porque en un ojo normal y sano siempre hay una capa de lágrima cubriendo, lubricando y protegiendo el epitelio. El epitelio, que está compuesto de varias capas de células, en condiciones normales es totalmente transparente y está constantemente humedecido por la película lagrimal. La membrana de Bowman, que actúa de membrana basal del epitelio y entre otras tiene la función de unir el epitelio corneal al estroma. El estroma, que forma la mayor porción del espesor corneal y está compuesto básicamente de fibras de colágeno. La membrana de Descemet, que es la membrana que une el estroma con la capa celular más profunda de la córnea. El endotelio, que forma la capa más interna de la córnea en contacto con el humor acuoso. A diferencia del epitelio, esa estructura sólo consta de una capa de células, y su capacidad de regeneración es prácticamente nula. Por detrás, hay una cámara llena de un fluido claro (el humor acuoso) que separa la córnea de la lente del cristalino. La lente está conectada con el músculo ciliar mediante unos ligamentos que la rodean.

La capa media, o úvea, tiene a su vez tres partes diferenciadas: una parte posterior, la coroides o sistema vascular, que reviste las tres quintas partes posteriores del globo ocular. Esta estructura continúa en una estructura anterior formada por el cuerpo ciliar y, a continuación, el iris, que se extiende por la parte frontal del ojo. El músculo ciliar y los tejidos circundantes forman el cuerpo ciliar, y esta estructura modula la concavidad de la lente, cambiando su longitud focal.

El iris es una estructura pigmentada, maravillosamente coloreada, suspendida entre la córnea y el cristalino, y tiene una abertura circular en el centro, la pupila. El tamaño de la pupila depende de músculo radial y circular, que aumenta o disminuye el diámetro. Así se controla la cantidad de luz que entra en el ojo. Por detrás de la lente, el cuerpo principal del ojo está lleno

de una sustancia transparente y gelatinosa, el humor vítreo, encerrado en un saco delgado que recibe el nombre de membrana hialoidea. La presión del humor vítreo mantiene distendido el globo ocular. La lente del cristalino permite el paso de la luz y la formación en la retina de una imagen invertida de los objetos que enfoca, y la retina puede cumplir su función de transducción y transmisión de la información eléctrica. Toda la información transducida por los fotorreceptores de la retina llega a través de una red neural a las células ganglionares de la retina, y los axones de estas células se unen formando haces que a su vez forman el nervio óptico.

El nervio óptico, o par craneal II, es un nervio sensitivo encargado de transmitir la información visual desde la retina hasta el quiasma óptico. Se origina en la capa de células ganglionares de la retina, mide aproximadamente 4 cm de longitud, y se orienta en sentido anteroposterior. Su descripción incluye 4 segmentos: un segmento intraocular, en el cual los axones de las células ganglionares de la retina se organizan en haces y convergen en la invaginación del nervio óptico o papila óptica, que sale del globo ocular atravesando la lámina cribosa escleral. Un segundo segmento intraorbitario, en el cual el nervio queda comprendido en un cono formado por los músculos rectos del ojo y se sumerge en la grasa retroocular, que confiere protección y aislamiento eléctrico. Un tercer segmento intracanalicular, donde el nervio óptico atraviesa el foramen óptico acompañado por la arteria oftálmica. Un cuarto segmento intracraneal, el cual mide aproximadamente 1 cm y está comprendido entre el foramen óptico y el quiasma óptico. En el quiasma óptico, las fibras provenientes de las hemiretinas temporales se mantienen en las cintillas ópticas ipsilaterales, mientras que las fibras de las hemiretinas nasales cruzan a la cintilla óptica contralateral correspondiente. Ambas cintillas se dirigen a través del haz visual al núcleo geniculado lateral, localizado en la cara posterior del tálamo, y se reúnen nuevamente en el haz geniculocalcarino, el cual se dirige hacia la corteza visual, localizada en el lóbulo occipital (Figura 1B).



**Figura 1.** Esquema del ojo humano y estructura general del sistema visual

A) Sección sagital del ojo humano tomado de (Kolb H. et al. 2013). B) Estructura general del sistema visual, tomado de: *Vía visual, apuntes, Neuroanatomía UFRO* (<http://www.med.ufro.cl>).

En su recorrido, algunas fibras del nervio óptico se ramifican innervando varias zonas cerebrales, en particular en dirección al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, donde se regulan los ritmos biológicos (Carlson 2012).

### 1.1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA RETINA

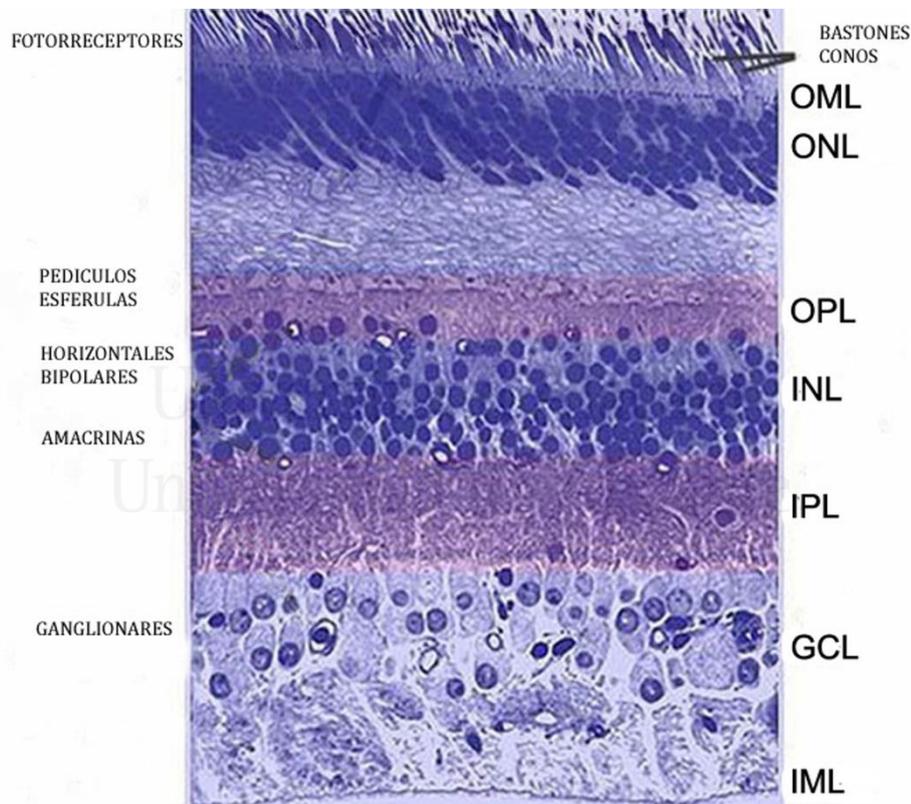
La retina es un tejido neural especializado. Es parte del sistema nervioso central y, como otras partes del SNC, deriva del tubo neural, en concreto del neuroectodermo. En el desarrollo embrionario, la retina procede de una evaginación bilateral del prosencéfalo llamada vesícula óptica primaria que, tras una invaginación local, se transforma en la vesícula óptica secundaria con forma de copa. Cada copa óptica permanece conectada con el cerebro mediante un tallo, el futuro nervio óptico. La retina es un tejido muy fino, de un espesor aproximado de 0.5 mm y un área circular total de 30-40 mm de diámetro (Kolb 1991), localizado en el interior del globo ocular, que permite la fundamental etapa de la fototransducción en el proceso visual. La retina tiene una microestructura compleja compuesta principalmente por células nerviosas que forman la red neural. Tiene una estructura laminar donde se alternan capas de somas celulares y capas de neuropilo, constituidas por los procesos de las numerosas poblaciones neuronales. Las capas y tipos celulares están bien definidos después de muchos años de investigación (Figura 2). Las células fotorreceptoras sensibles a la luz se encuentran en su superficie exterior, por debajo de una

capa celular llamada epitelio pigmentario de la retina (EPR). Todas las retinas de vertebrados tienen EPR y parte neural o neuroretina. Esta última se caracteriza por encontrarse en la parte más interna del ojo, donde la luz filtra a través de todas sus estructuras. Situada detrás de la pupila, la retina tiene una pequeña mancha de color amarillo, denominada mácula lútea que aloja en su centro la fovea central. Esta zona de la fovea tiene mayor agudeza visual y tiene una población celular de fotorreceptores exclusivamente compuesta por conos, mientras que alrededor de ella se encuentran poblaciones mixtas de células con conos y bastones. Alejándose paulatinamente la población celular de conos se vuelve más escasa y aumenta la de bastones. En los bordes exteriores de la retina sólo existen las células de la población de bastones. Dentro de la retina de mamíferos, con un criterio amplio, se pueden distinguir microscópicamente las capas laminares celulares que se estructuran de la siguiente manera:

- Epitelio pigmentario de la retina: Esta capa no se considera parte de la retina neural y separa esta última del sistema vascular retiniano, la coroides. El EPR se constituye por células epiteliales pigmentadas ricas en melanina.
- Segmentos externos (*OS, outer segments*): Contienen los discos membranosos en los que se localizan las opsinas de las células fotorreceptoras de la retina.
- Segmentos internos (*IS, inner segments*): Constituida por los elipsoides de las células fotorreceptoras de la retina.
- Capa nuclear externa (*ONL, outer nuclear layer*): Formada por los somas de las células fotorreceptoras.
- Capa plexiforme externa (*OPL, outer plexiform layer*): Constituye la región donde se establecen las conexiones sinápticas y formada por los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.
- Capa nuclear interna (*INL, inner nuclear layer*): Formada por los somas de células bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas, así como por los cuerpos de las células de Müller.
- Capa plexiforme interna (*IPL, inner plexiform layer*): Está compuesta por los axones de las células bipolares, y por las dendritas de las células ganglionares y amacrinas. Es la capa en la que células bipolares, amacrinas y ganglionares establecen sinapsis. A este nivel encontramos numerosas prolongaciones de las células amacrinas, que modulan la información luego transmitida a las células ganglionares. La IPL se divide en 2

subláminas, la sublámina superior contacta e interacciona con la INL. La sublámina inferior contacta e interacciona con la capa de las células ganglionares.

- Capa de las células ganglionares (GCL, *ganglion cell layer*): En esta capa se ubican los cuerpos celulares de las células ganglionares y de algunas células amacrinas desplazadas. Estas células neuronales desempeñan el papel de transmitir al cerebro la información que reciben de las células bipolares y amacrinas.
- Capa de fibras del nervio óptico (NFL, *nerve fiber layer*): Formada por los axones de las células ganglionares que constituyen una serie de haces axónicos que salen de la retina formando el nervio óptico (ON, *optic nerve*). En esta capa también se encuentran astrocitos, los cuales se encargan de aspectos básicos de mantenimiento de la estructura y función neuronal.



**Figura 2.** Capas de la retina

*Microscopía óptica de sección vertical de retina de humano con detalles de las capas (Kolb H. et al. 2013).*

Algunos autores también detallan unas estructuras de la retina denominadas membranas limitantes externa e interna. La membrana limitante externa (OLM, *outer limiting membrane*), aunque se denomina así, no es una membrana, sino una serie de uniones intercelulares del tipo zónula adherente formadas entre las células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores. La membrana limitante interna (ILM, *inner limiting membrane*) define el límite entre la retina y el humor vítreo, y está formada por los pies de las células de Müller, astrocitos y la membrana basal.

La retina, como toda estructura biológica, necesita un suministro de nutrientes y oxígeno. El sistema vascular tiene un papel sistémico importante para la retina, aporta agua, macronutrientes y micronutrientes; participa indirectamente en la regulación de la presión intraocular, elimina los desechos del metabolismo celular retiniano, entre otras cosas. Existen dos fuentes de suministro sanguíneo en la retina de los mamíferos: los vasos sanguíneos coroideos y la arteria retinal central. Los vasos coroideos son esenciales para el mantenimiento de la retina externa y en particular de los fotorreceptores, llevan entre el 65-85% del flujo sanguíneo de la retina (Henkind, Hansen et al. 1979). Las arterias coroideas penetran en la esclera alrededor del nervio óptico y se diseminan para formar las tres capas vasculares de la coroides: la capa más externa o escleral, y las capas medial e interna, cercanas a la membrana de Bruch del EPR. El resto del flujo sanguíneo es llevado por la arteria retinal central, que nutre las capas internas de la retina. Como todos los sistemas vasculares de mamíferos, además de arterias están presentes las venas. Los lóbulos venosos drenan en vénulas y venas que discurren hacia el ecuador del globo ocular para constituir las venas que drenan cada uno de los cuatro cuadrantes del globo ocular. Las venas vórtice penetran en la esclera y se fusionan para constituir la vena oftálmica que lleva fuera del globo ocular la sangre venosa desoxigenada. Su función es drenar la sangre de los capilares venosos hacia venas mayores fuera del ojo.

El EPR en todos los vertebrados se encuentra entre el segmento externo de los fotorreceptores y la coroides, que suministra flujo sanguíneo, y se compone de una capa de células epiteliales cúbicas empaquetadas. El EPR interacciona con la capa de fotorreceptores, existiendo una interdependencia con ellos. El EPR es una capa de células pigmentadas, ricas en pigmentos melanínicos. El pigmento melanínico absorbe el exceso de luz, impidiendo así que se produzcan reflejos lumínicos que perjudicarían a la formación correcta de la imagen (Geneser 2000). Además, estas células cumplen otras funciones especializadas como el almacenamiento, transporte y conversión del retinol, transporte glucosa, modulación de la

respuesta inmune local y fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores apoptóticos. Además, transportan agua y son selectivamente permeables a iones, nutrientes y metabolitos. En este sentido el EPR forma parte de la barrera hemato-retiniana.

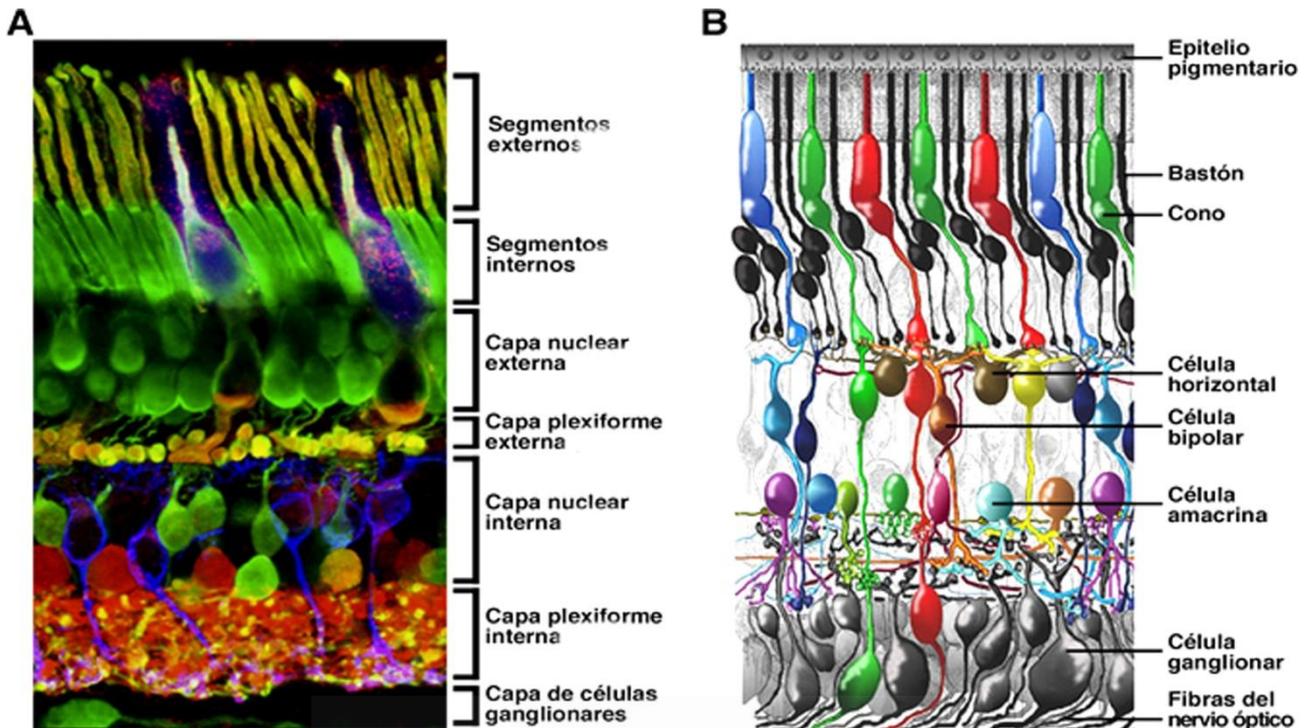
Existen evidencias de que el EPR juega un papel en la etiología de numerosas distrofias retinianas. En la retinosis pigmentaria la histopatología se caracteriza por la migración de células del EPR a regiones perivasculares dentro de la retina interna tras la muerte de los fotorreceptores.

### *1.1.1.1 CAPAS Y TIPOS CELULARES DE LA RETINA*

En la retina se encuentran seis tipos de células neuronales distribuidos en las distintas capas: los fotorreceptores, que a su vez se componen de conos y bastones, células horizontales, interplexiformes, bipolares, amacrinas y ganglionares (Figura 3). Cabe mencionar otros tipos de células que ayudan a las funciones de las células neuronales. Son células que suministran soporte estructural, de organización y mantenimiento de funciones. Destacan los astrocitos, células de Müller y microglía. Las células de Müller constituyen un tipo de glía específica de la retina.

De acuerdo con su función, las células neurales de la retina se pueden clasificar en: células fotorreceptoras: conos y bastones; células nerviosas de segundo orden o neuronas secundarias, que comprenden todas las células que forman la red sináptica, incluidas células bipolares, horizontales, amacrinas, e interplexiformes; y las células neuronales de proyección, las células ganglionares, que con sus axones forman los haces constitutivos del nervio óptico.

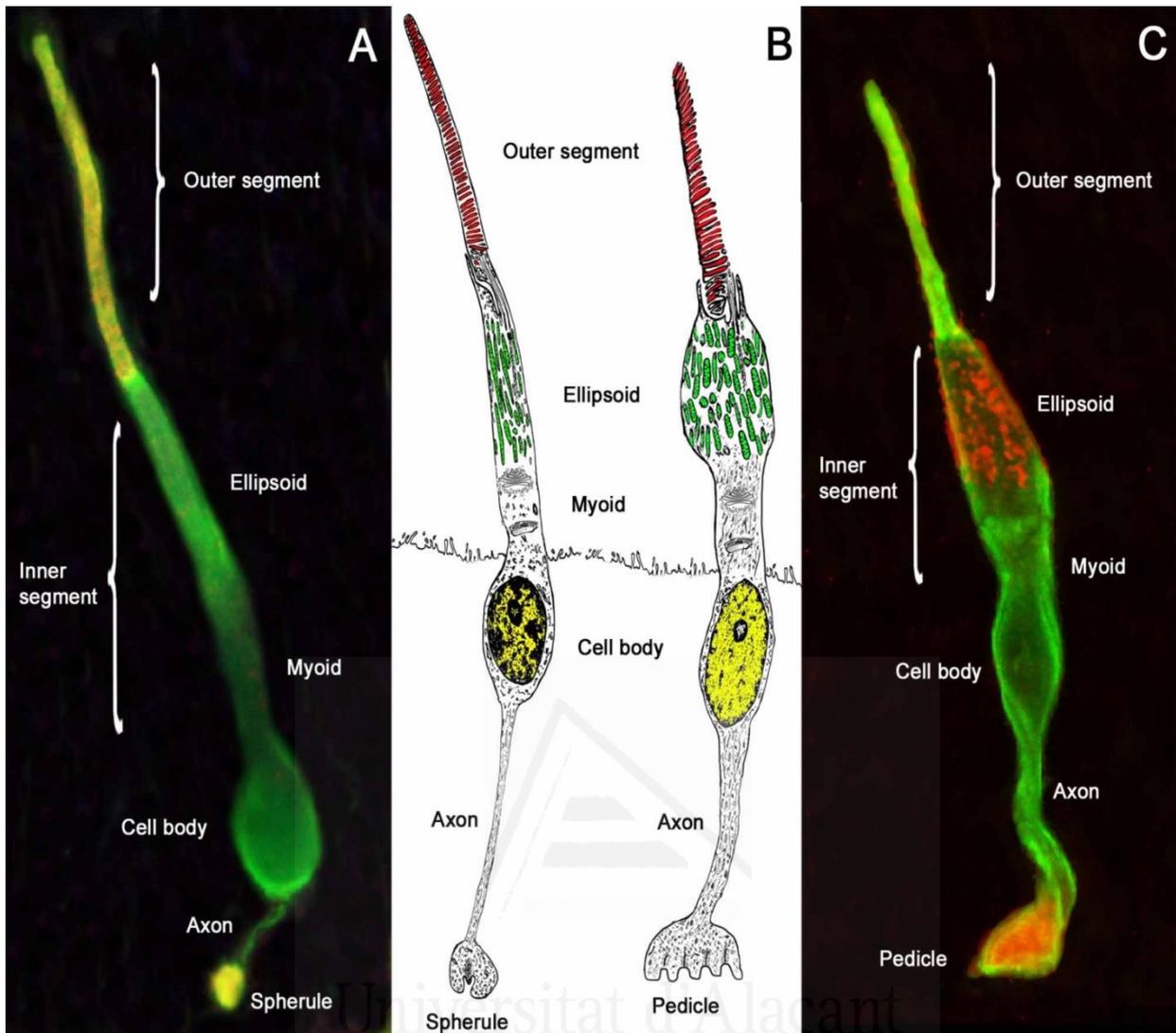
Como se ha mencionado, las células fotorreceptoras son de dos tipos: bastones y conos. Se estima que la retina humana contiene unos 6.5 millones de células tipo cono y unos 120 millones de células tipo bastón. Las células tipo cono expresan un ftopigmento llamado opsina de cono o conopsina. Este pigmento se puede dividir en tres subtipos de pigmentos sensibles respectivamente a la luz azul (cianopsina,  $\lambda \sim 435$  nm), verde (cloropsina,  $\lambda \sim 535$  nm) y roja (eritropsina,  $\lambda \sim 565$  nm). Los conos están concentrados en la región central o foveal de la retina, y son responsables de la agudeza visual y la visión diurna o fotópica. Los tipos de opsinas en conjunto constituyen la base para la discriminación y la percepción del color. Los fotorreceptores de tipo cono, los cuales son la población más numerosa de la fovea, presentan un segmento externo afilado y corto, y un segmento interno con un diámetro entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la excentricidad del cono en la retina.



**Figura 3.** Células neuronales de la retina de mamíferos

A) *Microscopia confocal de retina de mono.* Tomada de N. Cuenca, <http://www.retinalmicroscopy.com>. B) *Distribución esquemática de los tipos de células neuronales de la retina* (Kolb H. et al. 2013).

Los fotorreceptores tipo bastón son la población más numerosa de la retina. Se caracterizan por presentar un segmento externo de forma cilíndrica mucho más largo que el de conos, y un segmento interno con un diámetro aproximado de 6 a 10  $\mu\text{m}$ . El pigmento de los bastones se llama rodopsina, y su sensibilidad máxima se fija a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm. Los bastones son responsables de la visión con luz tenue. Por ende, estas células son muy sensibles, capaces de detectar la energía de un solo fotón, y son las responsables, por tanto, de que sea posible la visión en condiciones de escasa luminosidad o escotópicas. Normalmente, son los primeros fotorreceptores afectados por el desarrollo de la retinosis pigmentaria. Cada uno de los fotorreceptores está formado por: segmento externo, segmento interno, cuerpo celular, axón y terminal sináptico. El segmento externo está constituido por una serie de membranas o discos membranosos que contienen los pigmentos sensibles a la luz (Figura 4).



**Figura 4.** Fotorreceptores de la retina

*Imágenes de microscopía confocal (A, C) y dibujo esquemático (B) de una célula tipo bastón (izquierda) y cono (derecha). Se muestran las principales partes que componen la célula fotosensible. El inmunomarcaje con anticuerpo para recoverina (verde) fue utilizado para marcar células de conos y bastones. El inmunomarcaje para  $\alpha$ -sinucleína se utilizó para marcar los segmentos externos y los terminales axónicos. Imagen tomada y modificada de Cuenca y cols. (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014).*

El segmento interno contiene toda la maquinaria “productiva” de las células: mitocondrias para la producción de energía, ribosomas para la producción proteica, además de estructuras membranosas donde se ensamblan las moléculas de opsina. El cuerpo celular de los fotorreceptores o soma celular ubica el núcleo de la célula. El axón y terminal sináptico son aquellas estructuras encargadas de transmitir la información a las neuronas de segundo orden que componen la red sináptica de la retina. La terminal sináptica de los conos se

denomina pedículo, mientras que en el caso de los bastones se denomina esférula, y ambos se encuentran en la OPL. Ambas terminales sinápticas son de tipo glutamanérgico.

Las células horizontales son interneuronas. El alcance de sus prolongaciones permite vías de comunicación neuronal de tipo local y entre capas. Tienen su cuerpo celular en la INL, e interconectan a través de sus prolongaciones entre sí y con los fotorreceptores a nivel de la OPL. Se caracterizan principalmente por conexiones de resolución horizontal, y por sus conexiones de inserción lateral con los fotorreceptores. En la retina de vertebrados, se suelen dividir en 2 grandes grupos: tipo A, sin axón, y tipo B, con axón. La retina de la rata posee solo células horizontales de tipo B. En la retina de humanos, las células horizontales se suelen subdividir en tres subtipos de acuerdo con su morfología: H1, H2 y H3 (Kolb H. et al. 2013).

Las células horizontales liberan en sus sinapsis con los fotorreceptores un solo tipo de neurotransmisor, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Las células horizontales H1 no poseen axón, son de tipo A, y se caracterizan por sus terminales dendríticos, que finalizan como elementos laterales de sinapsis en cinta con los pedículos de los conos rojos y verdes. Contactan también con bastones. Los conos azules prácticamente no reciben contactos de estas dendritas. Las células horizontales H2 poseen axón, que parece contactar exclusivamente con los pedículos de los conos azules, y se caracterizan por una profunda inervación, aunque con sus dendritas contactan también con conos rojos y verdes. Las células horizontales H3 parecen caracterizarse por eludir totalmente a los conos azules, y ser complementarias a las células H1, caracterizándose por un árbol dendrítico mucho mayor, hasta 3 veces más grande que el resto de células horizontales, sobre todo en zonas periféricas de la retina, ricas en bastones.

Las células bipolares se caracterizan por ser la vía de comunicación más directa entre fotorreceptores y células ganglionares. Las células bipolares presentan una morfología característica, conforme al tipo de conexiones que llevan a cabo. Su morfología presenta dos ramificaciones, que parten en direcciones opuestas desde el cuerpo celular ubicado en la INL; las ramificaciones son postsinápticas a los fotorreceptores y presinápticas a las células ganglionares y amacrinas. La ramificación externa, de carácter dendrítico, se dirige hacia la OPL, donde interaccionan con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores. La ramificación interna, de carácter axónico, más larga, interacciona a nivel de la IPL y contacta con las células ganglionares y células amacrinas. Las células bipolares en primates se subdividen en 11 subtipos diferentes, y se clasifican en base a su morfología, patrón de dendritas, y número y tipo de células con las que contactan. Diez subtipos hacen sinapsis con

los conos y uno con los bastones (Boycott, Wassle 1991, Chan, Martin et al. 2001). Dado que en la retina de mamíferos, salvo en la zona foveal, predominan los bastones, el número total de neuronas bipolares de bastones es mayor que el de bipolares de conos. Las células bipolares que contactan con los conos hacen conexiones directamente con las células ganglionares, mientras que las células bipolares que contactan con bastones conectan con células amacrinas. Con más detalle, las dendritas de las células bipolares de bastones se ramifican en la OPL, y cada una de éstas tiene un árbol dendrítico que conecta con 15-20 bastones en la retina central. En la retina periférica, siendo los bastones mucho más abundantes, el árbol dendrítico es mayor, unos 30  $\mu\text{m}$ , y puede contactar con hasta 40-50 bastones (Hopkins, Boycott 1995). De entre las células bipolares de conos se distinguen las “células bipolares de conos difusas”, de las que encontramos de 7 subtipos diferentes, con la función de integrar la señal de varios conos, principalmente rojos y verdes. Hay algunas células bipolares de conos difusas que tienen un árbol dendrítico enorme, de hasta 100  $\mu\text{m}$ . No hay muchas informaciones sobre su papel fisiológico pero, teniendo en cuenta el tamaño del árbol dendrítico, se podrían considerar como “centros de actividad” sinápticos de conos, aunque ulteriores investigaciones son necesarias de cara a esclarecer el motivo de tal tamaño. Las restantes células bipolares de conos establecen sinapsis con un único cono azul, y se denominan “células bipolares enanas planas o específicas de conos azules”. Todas las células bipolares se caracterizan por responder al neurotransmisor glutamato (Glu) en sus terminales presinápticas (Kolb H. et al. 2013, Hopkins, Boycott 1995).

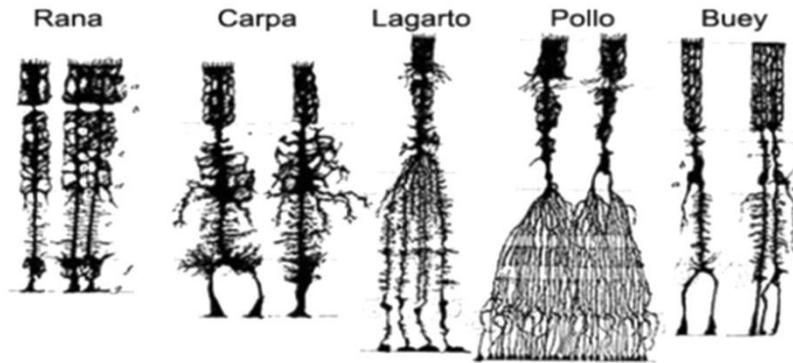
Las células amacrinas poseen morfología y funciones propias. Desde los albores de la investigación en neurología por los prestigiosos anatomistas Ramón y Cajal y Dogiel, se pensaba que las células amacrinas carecían totalmente de prolongaciones axónicas. En las últimas décadas, se ha descubierto que algunos tipos de células amacrinas presentan largos procesos que pueden actuar como axones. Estas neuronas contactan a nivel de la IPL con los axones de las células bipolares, mayoritariamente de bastones, y las dendritas de las células ganglionares procedentes de la GCL. Existen al menos 25 subtipos de células amacrinas identificadas, pero algunos autores han llegado a identificar más de 40 subtipos. En línea general, se clasifican en base a sus características morfológicas, tales como el tamaño de su árbol dendrítico, tipo de ramificación y estratificación en la IPL (Mariani 1990). Estas células también se pueden clasificar en base al neurotransmisor que segregan, el cual puede ser glicina (Gly), GABA, dopamina, óxido nítrico (NO), sustancia P, acetilcolina y/o serotonina (Kolb H. et al. 2013). Entre estas, las células amacrinas dopaminérgicas corresponden a las

células amacrinas de tipo A18. Su densidad en la retina de mamíferos es bastante baja, de 10 a 100 células/mm<sup>2</sup>, y sus dendritas se ramifican de manera extensa y prácticamente exclusiva en el estrato superior de la IPL, donde forman una plana y densa red neuronal.

Las neuronas dopaminérgicas de la retina participan en la adaptación de la visión a la luminosidad del entorno, tanto a nivel de la IPL como de la OPL, favoreciendo la transición de la vía de transmisión de los bastones hacia la de los conos. En la OPL, la dopamina actúa principalmente sobre las células horizontales, favoreciendo un aumento de la sensibilidad al contraste espacial (Xin, Bloomfield 1999). En la IPL las neuronas dopaminérgicas modulan principalmente la actividad de las células amacrinas AII. La dopamina reduce el acoplamiento eléctrico entre estas células amacrinas mediante activación de receptores D1. Adicionalmente, la activación de los contactos sinápticos GABAérgicos entre células dopaminérgicas y AII reduce la respuesta de estas últimas ante un estímulo evocado por luz. Por tanto, las neuronas dopaminérgicas de la retina intervienen en la modulación de la transmisión de la señal visual tanto por la vía de los bastones como por la de los conos, y la dopamina juega un papel crucial como mensajero químico en la adaptación de la visión a la luminosidad del entorno. Las células interplexiformes de la retina se consideran como un tipo especial de células amacrinas. Tienen un papel interneuronal e integrador de la información sináptica. Su cuerpo celular se localiza en la INL y de éste parten una serie de propagaciones que interconectan las estructuras de la INL, extendiéndose hasta la IPL. Estructuralmente se caracterizan por las ramificaciones, que son bastante largas y salen del propio soma celular o desde una de las ramificaciones primarias.

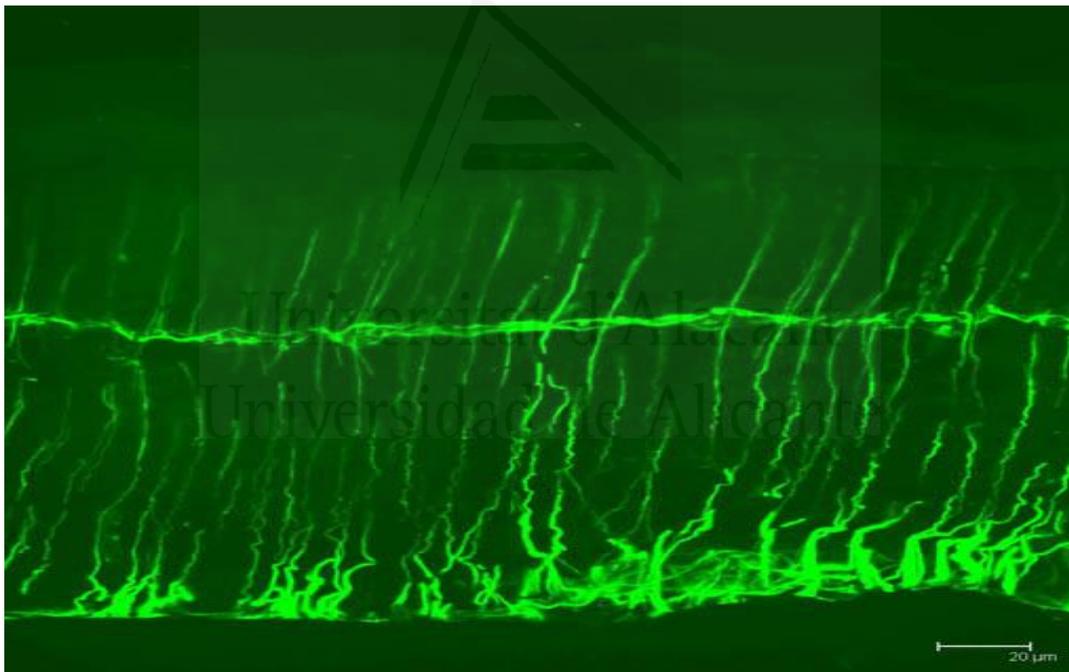
Las células ganglionares son el último "eslabón" neuronal en las rutas de transmisión de la señal visual en la retina. Las células ganglionares poseen un soma celular voluminoso ubicado mayoritariamente en la GCL. Sin duda, de todas las células neuronales de la retina son las de mayor tamaño. Sus ramificaciones dendríticas forman sinapsis en la IPL con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas, como se ha descrito anteriormente. Los millones de axones de las células ganglionares se van uniendo formando haces que constituyen el nervio óptico, el cual lleva al encéfalo, en forma de potenciales de acción, toda la información recibida y transducida por la retina. Se han descrito unos 25 subtipos morfológicos de células o neuronas ganglionares en la retina humana, clasificados en base a criterios similares a los utilizados para las células amacrinas (árbol dendrítico, soma celular y ubicación). Las células ganglionares humanas presentan un patrón de distribución parecido a la capa de fotorreceptores, con un cambio desde la fóvea a la periferia; o sea, las células ganglionares

cambian su morfología y subtipo según su excentricidad. La extensión del árbol dendrítico es el signo característico de la diferente morfología de las células ganglionares. De acuerdo con el tamaño del árbol dendrítico se pueden clasificar en: células ganglionares grandes, difusas pequeñas y enanas. También, las células ganglionares se han clasificado por la complejidad del árbol dendrítico (Jelinek, Ristanovic et al. 2011), pero más interesante es la clasificación en base a las proyecciones hacia al encéfalo. Se distinguen células ganglionares pequeñas o “células de tipo P”, que proyectan hacia las capas parvocelulares del cuerpo geniculado lateral, y células ganglionares grandes o “células de tipo M”, que proyectan hacia las capas magnocelulares del cuerpo geniculado lateral. Se ha descrito una posible tercera vía visual ganglionar. Esta se refiere a proyecciones hacia las células koniocelulares, o “células de tipo K”, del núcleo geniculado lateral. Las células tipo K son neuroquímicamente diferentes a las M y P (Casagrande 1994). El rol del sistema koniocelular dentro de la percepción visual no está del todo claro, sin embargo, se ha ligado con la integración de la información somatosensorial sistemática y propioceptiva con la percepción visual, y posiblemente está involucrada en la percepción de los colores. En el ratón, se han descrito tres tipos principales de células ganglionares en función de la estratificación en la GCL, tamaño del soma y del campo dendrítico. Se subdividen en células tipo I, con somas y campos dendríticos de gran tamaño, células tipo II, con somas pequeños o medianos y campos dendríticos pequeños y tipo III, con somas pequeños o medianos y grandes campos dendríticos. Un subgrupo de células ganglionares sintetiza melanopsina, un fotopigmento que les permite transformar la luz en un impulso nervioso de manera homóloga a los fotorreceptores. Se conoce a estas células con melanopsina como células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). Se conoce aún poco sobre las posibles interacciones celulares de las ipRGCs, pero se conoce su importante papel en la sincronización de los ritmos circadianos (Lucas, Freedman et al. 1999, Perez-Leon, Warren et al. 2006, Esquiva, Lax et al. 2013, Berson, Dunn et al. 2002, Berson 2007). El descubrimiento de las ipRGCs y de su participación en las funciones extravisuales de la retina ha generado una nueva línea de investigación en la fisiología retiniana. En la retina de los mamíferos, pueden identificarse tres tipos de células gliales: las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía. Las células de Müller son unas células muy especializadas de la retina. El cuerpo celular de estas células se sitúa en la INL y tiene procesos dirigidos a ambos extremos de la retina (Figura 5 y 6).



**Figura 5.** Células de Müller

*Células de Müller con tinción de Golgi en diferentes especies. Muestra la amplia diferenciación morfológica de estas células. Modificado de Ramon y Cajal, 1892.*



**Figura 6.** Células de Müller en retina de rata

*Imagen de microscopía confocal de células de Müller de retina rata marcadas para vimentina, barra de escala 20 μm. Tomada y modificada de N. Cuenca, <http://www.retinalmicroscopy.com>.*

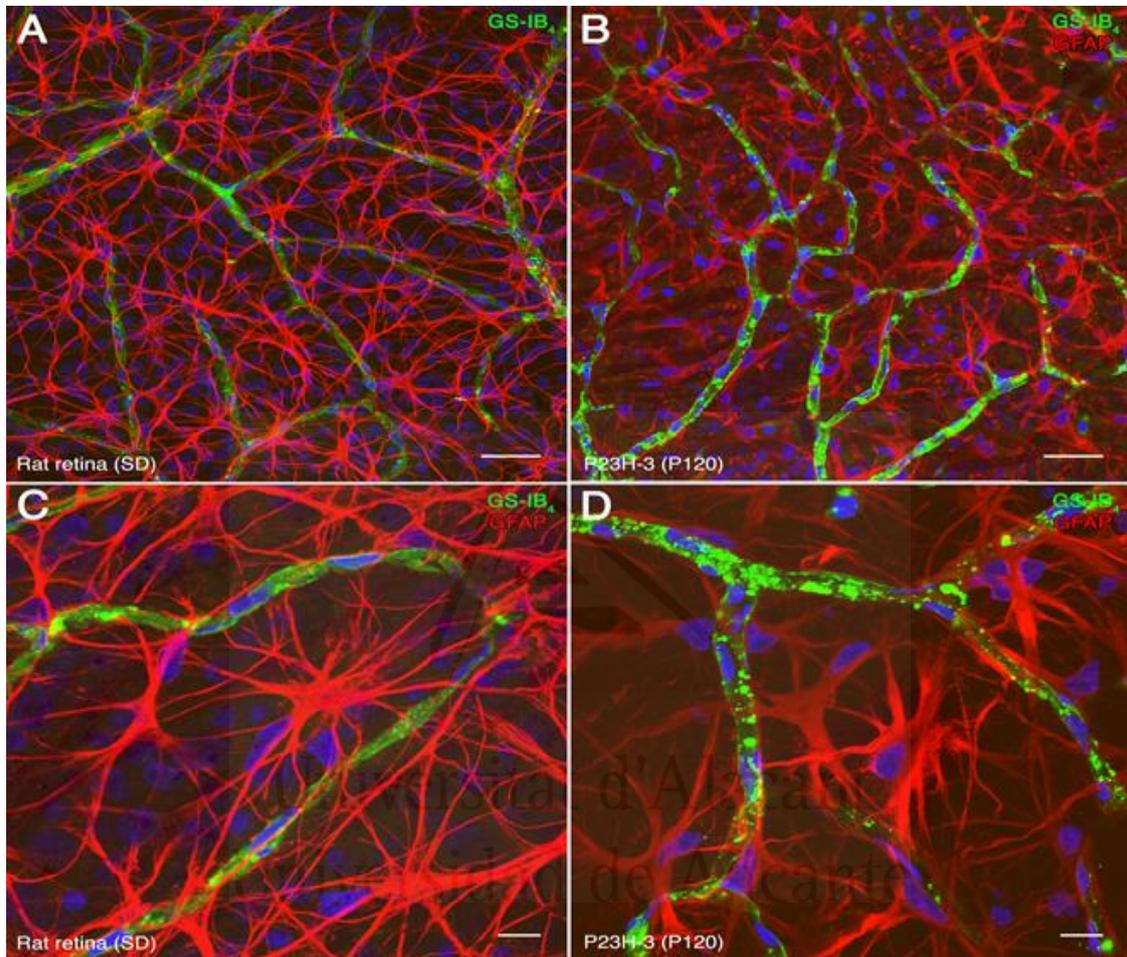
Según las capas retinales que vayan atravesando los procesos, se comportan de manera diferente. En las capas plexiformes envuelven los procesos neuronales, lo que podría indicar una integración con la red sináptica, mientras que en las capas nucleares se intercalan entre

los somas de las neuronas. Siendo células muy especializadas, han adquirido variaciones morfológicas importantes en función de las especies (Kolb H. et al. 2013). En mamíferos, las células de Müller constituyen los límites de la retina y forman con sus procesos las membranas limitantes externa e interna. Tienen rol de soporte en la arquitectura de la retina, contienen glucógeno y suministran nutrientes a las neuronas de primer y segundo orden, mantienen la homeostasis iónica actuando en el secuestro de ion  $K^+$ , tienen un papel neuroprotector contra excitotoxicidad por glutamato y drenan residuos metabólicos de origen aminoacídico. Los astrocitos, o astrogliá, son un tipo glial que en la retina se encuentra casi exclusivamente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico (Figura 7). Se caracterizan por su cuerpo aplanado y un abanico de procesos radiales muy pronunciados. En humanos, su morfología y número se modifica según la excentricidad de la retina. En la retina periférica adquieren forma estrellada y son una población menos numerosa, mientras que cerca de la invaginación del nervio óptico aparecen con forma alargada y son muy numerosas. Los astrocitos en la retina humana no están presentes en la fovea avascular ni en la ora serrata, sea temporal o nasal (Kolb H. et al. 2013), de manera que su densidad está relacionada con la del sistema vascular. Estas células se disponen casi en forma de vaina sobre los haces nerviosos de las células ganglionares. Las funciones de los astrocitos son múltiples: protegen los haces nerviosos de las células ganglionares, nutren y mantienen las fibras nerviosas, aseguran la homeostasis iónica, y regulan en parte el metabolismo de la neurotransmisión y/o del metabolismo energético (Kolb H. et al. 2013). De acuerdo con el papel protector de los astrocitos, éstos poseen un alto contenido en sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos y pueden regenerar metabolitos antioxidantes como glutatión o ascorbato. En varias patologías retinianas, se han detectado cambios en los astrocitos. En muchos casos son más numerosos, de forma inusual, más grandes, con intensa actividad fagocítica y ocupan otras capas retinianas donde normalmente no aparecen (Ramirez, Ramirez et al. 2001).

Las células de microglía tienen un origen embrionario diferente a la mayoría de poblaciones celulares retinianas. No derivan del neuroectodermo, sino que derivan de células precursoras de la médula ósea y entran en el sistema nervioso central a través de los vasos sanguíneos durante las primeras fases de la embriogénesis (Grossmann, Stence et al. 2002). El término microglía es atribuido al doctor Rio-Hortega, un discípulo de Santiago Ramón y Cajal que acuñó el término “microglía” alrededor de 1920.

El SNC es inmuno-privilegiado debido a la barrera hematoencefálica. La defensa inmunitaria del SNC está representada principalmente por las células gliales, entre las cuales la microglía

representa un 20%. La microglía se caracteriza por tener una actividad intensa y una vida media bastante corta. Debido a su particular función, no son reemplazadas constantemente, sino que se mantienen quiescentes hasta su activación, y luego proliferan (Figura 8) (Aloisi 2001).

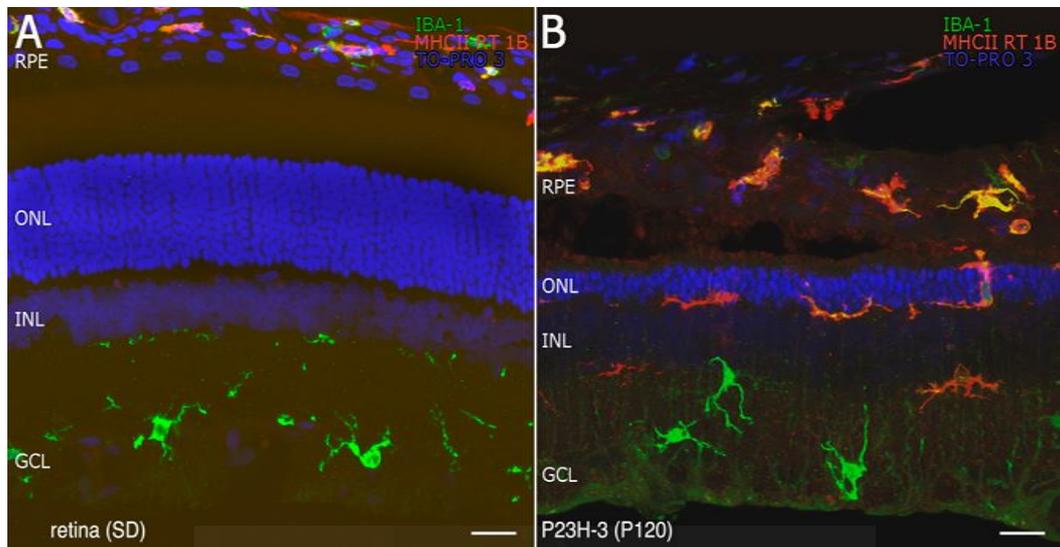


**Figura 7.** Astrocitos de la retina de rata

Se muestran cambios morfológicos en los astrocitos durante el proceso de degeneración retiniana. (A, B) imágenes de una retina de ratas SD y P23H-3 marcadas con anticuerpo para GFAP (rojo). Los vasos sanguíneos son marcados con Griffonia simplicifolia lectin (verde). Las imágenes C y D son magnificaciones respectivamente de las imágenes A y B. Los núcleos son marcados para TO-PRO3. Se puede notar como los astrocitos activados, en la rata P23H, se vuelven menos ramificados e hipertróficos (D), barra escala (A, B) 40  $\mu$ m; (C,D) 10  $\mu$ m. Imagen tomada y modificada de Cuenca y cols. (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014).

En la retina, la microglía se sitúa principalmente alrededor del sistema vascular retiniano, utiliza mecanismos de fagocitosis y excitotoxicidad para destruir sustancias indeseadas. Las células de la microglía son muy sensibles a variaciones de la homeostasis y responden de manera brusca y violenta con migraciones e instauración, incluso, de procesos neuro-

inflamatorios. En esta situación, la microglía cambia de forma y se denominada microglía reactiva (Kolb H. et al. 2013).



**Figura 8.** Microglía de la retina

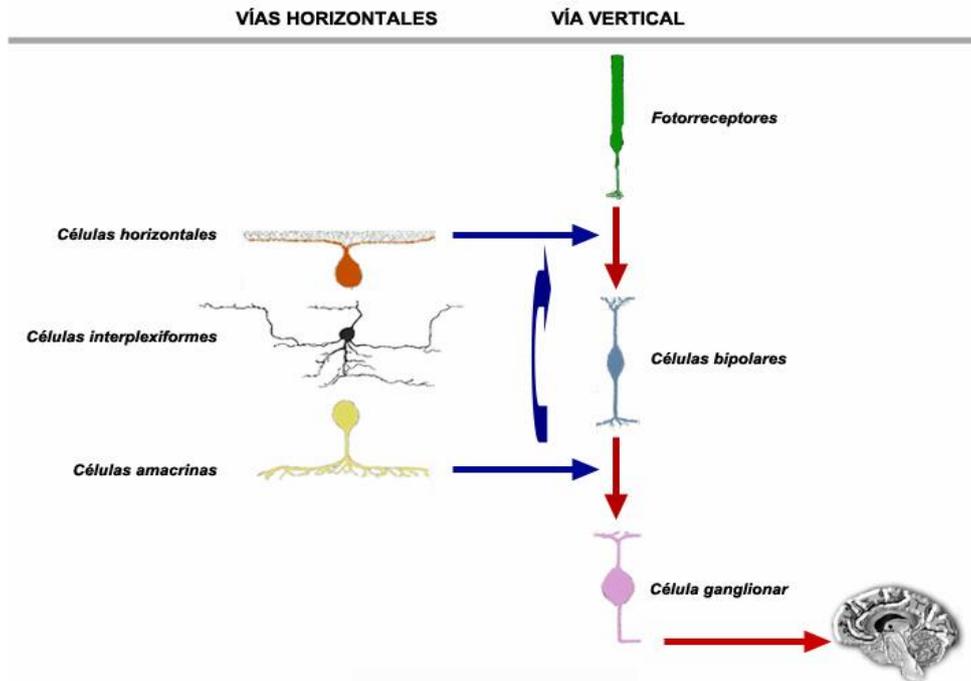
Imágenes de microscopio confocal de secciones verticales de retinas de una rata SD (A) y P23H (B). Las células de la microglía son teñidas con anticuerpo para IBA-1 (verde). El anticuerpo para MHC class-II RT1B marca microglía reactivas (rojo). Los núcleos son teñidos con TO-PRO 3. En la foto (B) se nota el aumento de microglía reactiva y los cambios morfológicos. Imagen tomada y modificada de Cuenca y cols. (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014).

La respuesta de la microglía tiene consecuencias duales. Si, por un lado libera factores neurotróficos como GDNF (*Glial-derived neurotrophic factor*) y CNTF (*Ciliary-derived neurotrophic factor*) (McGee Sanftner, Abel et al. 2001), los cuales pertenecen a una familia de factores de crecimiento que mantienen y potencian la supervivencia de los fotorreceptores. Por otro lado, puede inducir o secretar moléculas con efectos adversos sobre la supervivencia de las células fotorreceptoras, como NO, ROS (especies reactivas de oxígeno, *reactive oxygen species*), citoquinas proinflamatorias y proteasas.

### *1.1.1.2 ENTRAMADO SINÁPTICO VISUAL*

Para esclarecer cómo se desarrolla el proceso visual es fundamental conocer el rol y la red sináptica de las neuronas de segundo orden de la retina. Todas estas neuronas postsinápticas a los fotorreceptores no se limitan a ser meras vías eferentes o aferentes de conducción de estímulos nerviosos sino, combinando vías de transmisión verticales con vías de transmisión horizontales, modulan, integran, elaboran y afinan la información visual. Como anteriormente descrito, estas células están interconectadas entre sí y entre capas en un entramado de conexiones, el cual permite el paso modulado de la información nerviosa. En las vías verticales, más directas y rápidas, la información visual pasa de los fotorreceptores por las células bipolares y de éstas a las células ganglionares, cuyos axones se juntan en el nervio óptico, que lleva el mensaje eléctrico al encéfalo. A la vez, toda esta información desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares está modulada por las vías horizontales, compuestas por la interacción de los fotorreceptores con las células bipolares, las células horizontales, amacrinas e interplexiformes (Figura 9).

Dependiendo de las condiciones de los estímulos lumínicos, el proceso visual pasa por rutas de transmisión fotonerviosas diferentes. La operatividad de las rutas depende de los fotorreceptores estimulados. En la visión fotópica predomina la ruta de los conos, mientras que en la visión escotópica predomina la ruta de los bastones, cuya señal eléctrica atraviesa más elementos sinápticos y se considera más articulada (Figura 10) (Kolb H. et al. 2013). La ruta fotópica, a partir de la excitación del fotorreceptor cono, utiliza sinapsis principalmente con células bipolares de conos, las cuales directamente transmiten a las células ganglionares de conos, es decir, una vía directa y más rápida. La ruta escotópica, a través de la cual se procesa la señal de los bastones, parece tener una interacción eléctrica horizontal de mayor importancia. A partir de la excitación del fotorreceptor bastón se realizan sinapsis con células bipolares de bastones y con las células amacrinas AII y A17.



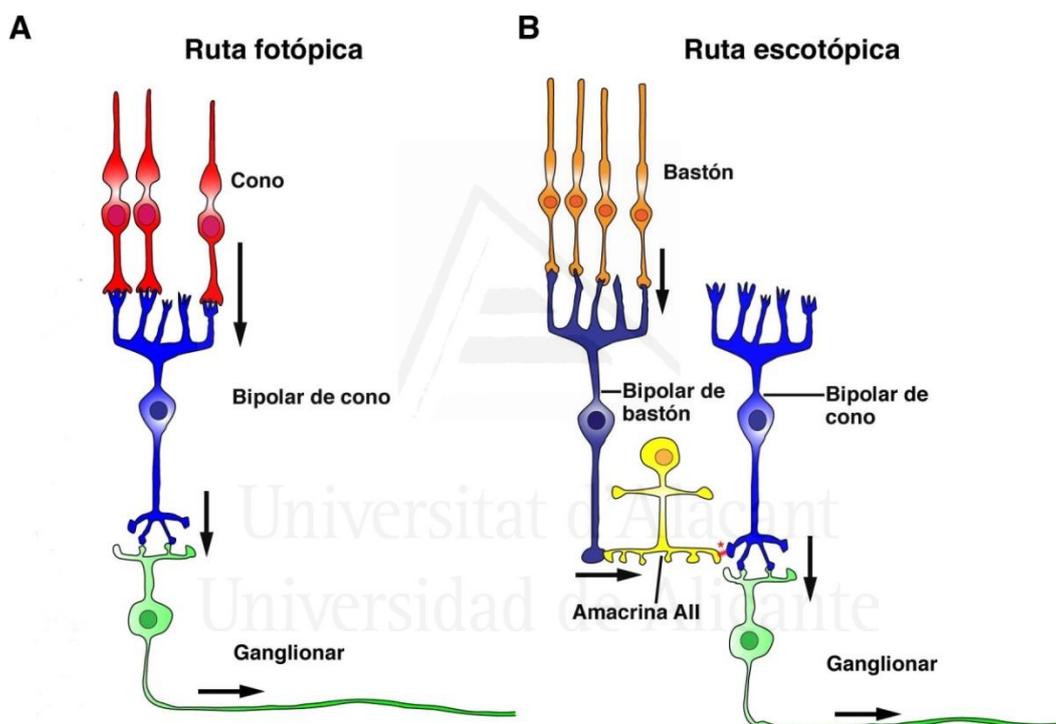
**Figura 9.** Esquema de las vías visuales

La señal eléctrica producida por los fotorreceptores recorre la llamada vía vertical. Durante el recorrido se produce la modulación de la señal a través de las neuronas secundarias, en lo que se conocen como vías horizontales del procesamiento de la señal visual. Cortesía de Julián Esteve Rudd: Tesis doctoral "Alteraciones moleculares y celulares en la retina de animales modelo de la enfermedad de Parkinson".

Las células amacrinas A17, neuronas gabaérgicas, establecen sinapsis recíprocas con las células bipolares, mientras que las neuronas amacrinas AII contactan en la IPL postsinápticamente con las células dopaminérgicas (no descritas) y con las bipolares de bastón de tipo ON, que a su vez establecen contactos sinápticos glutamatérgicos excitatorios con las AII. Estas últimas responden a un estímulo evocado por luz mediante una despolarización, la cual se transmite a las bipolares de cono ON de subtipo CB5, a través de uniones en hendidura (*gap junctions*) constituidas por la proteína denominada conexina-36. Estas células bipolares de cono excitan a células ganglionares de tipo ON, permitiéndoles procesar información proveniente de la vía de los bastones. Por otra parte, las células amacrinas AII establecen sinapsis glicinérgicas inhibitorias con células ganglionares de tipo OFF. La importancia de las células amacrinas AII radica, por tanto, en que constituyen un componente integral de la vía de transmisión de las señales procedentes de los bastones. Ambas rutas, aun con importantes diferencias, integran informaciones verticales y horizontales en continua elaboración. Las informaciones nerviosas denominadas "de primera

sinapsis” son determinadas por las células bipolares, mientras que las interacciones horizontales, denominadas de segunda sinapsis, son determinadas por la interacción entre las células bipolares y el resto de neuronas de segundo orden.

Las células bipolares se subdividen en bipolares ON y OFF y, entre ellas, existen muchos subtipos. Su diversidad se relaciona con el tipo de neurotransmisor segregado y conexión sináptica que realizan con los fotorreceptores y con las diferentes neuronas postsinápticas. Además, se pueden observar diversidades morfológicas y fisiológicas de axones y dendritas entre ellas. Algunas células bipolares son postsinápticas sólo de conos, otras sólo de bastones y algunas reciben información nerviosa de bastones y conos.



**Figura 10.** Esquemas de las rutas fotópica y escotópica

A) Esquema de la vía de transmisión visual fotópica o de los conos. B) Esquema de la vía de transmisión visual escotópica o de los bastones. Cortesía de Julián Esteve Rudd: Tesis doctoral "Alteraciones moleculares y celulares en la retina de animales modelo de la enfermedad de Parkinson".

Entre las células bipolares selectivas de conos, además podemos encontrar diferentes morfologías e inervaciones para los subtipos de conos con opsina azul, verde o roja; y cada subtipo expresa diferentes receptores. Hay también algunas células bipolares no selectivas, o también llamadas "difusas", que realizan conexiones con todos los tipos de fotorreceptor y presentan una arborización mayor. Las diferencias de estratificación en la INL y de

arborización en la IPL sugiere diferentes tipos de inervaciones con células amacrinas y ganglionares.

En las sinapsis de la OPL entre fotorreceptores y sus células postsinápticas, sean bipolares u horizontales, se observan estructuras electrodensas al microscopio electrónico denominadas cintillas sinápticas (*synaptic ribbons*) o sinapsis en cinta. La primera interacción ocurre a nivel de pedículos y esférulas, donde cada elemento alarga procesos laterales intercelulares denominados telodendrias para formar sinapsis eléctricas horizontales entre pedículos y esférulas y entre ellos, formándose uniones en hendidura.

Cada pedículo de los conos forma aproximadamente 30 sinapsis en cinta (Ahnelt, Keri et al. 1990), mientras que las esférulas de los bastones únicamente forman 2 sinapsis. En las sinapsis en cinta de los conos se organizan estructuras denominadas triadas, compuestas por dos terminaciones dendríticas laterales de células horizontales y una terminación dendrítica central de una célula bipolar. En las cintillas sinápticas de los bastones se forman diadas, compuestas por una terminación dendrítica de una célula horizontal y de una célula bipolar.

Una vez que el fotorreceptor, en respuesta a la luz, se hiperpolariza cesa la liberación de glutamato. A esta condición las células bipolares responden de dos formas, con una hiperpolarización o con una despolarización de su membrana. La célula bipolar que se hiperpolariza al cesar la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores se denomina célula bipolar OFF, que da lugar a lo que se conoce como vía OFF. Gracias a este mecanismo se detectan imágenes oscuras sobre fondos claros. La célula bipolar que se despolariza en respuesta al cese de la liberación de Glu se denomina célula bipolar ON, y como respuesta libera Glu, que da lugar a lo que se conoce como vía ON, mediante la cual se detectan las imágenes claras sobre fondos oscuros y se caracteriza también por un aumento de conductancia debido a la liberación de Glu (Kolb H. et al. 2013). Normalmente, los receptores de Glu en células bipolares tipo OFF son ionotrópicos (iGluR) y los más frecuentes son del tipo glutamatérgico de AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), mientras que en células bipolares tipo ON los receptores son metabotrópicos (mGluR) con transportadores vesiculares específicos.

Las células horizontales responden a la estimulación por la luz con una hiperpolarización, reciben sinapsis de fotorreceptores a nivel de OPL y envían información de retorno. Estas sinapsis son generalmente denominadas “elementos laterales”, postsinápticos a las cintillas sinápticas. Las células horizontales establecen un extenso y frondoso entramado en la OPL, acoplado entre sí a través de aéreas especializadas de “*gap junctions*” muy extensas. Este

entramado está compuesto por interacciones selectivas entre dendritas, interacciones entre axones y, ocasionalmente, con cuerpos celulares; y es fuertemente especializado en la transmisión sináptica. La “*gap junction*” está formada por la interacción de membranas de procesos de células horizontales. A pesar de la complejidad, la “*gap junction*” se comporta de manera muy selectiva, y los entramados interconectan células horizontales del mismo tipo (H1 con H1, etc.). Todo este entramado y continuo intercambio de información nerviosa horizontal permite integrar los estímulos nerviosos y, por consiguiente, la organización centro-periferia de los campos receptores de las células ganglionares. Las células horizontales influyen sinápticamente, como es de esperar, las células bipolares, lo cual favorece el contraste de las imágenes y potencia el contraste cromático. No es completamente conocido el papel funcional de las sinapsis entre células horizontales y bastones.

Los terminales axónicos de las neuronas bipolares establecen contactos sinápticos en la IPL con los diferentes subtipos de células amacrinas y con dendritas de células ganglionares. Para permitir todo este entramado hay una estratificación espacial funcional de las sinapsis. De igual manera que en la OPL, en esta capa las neuronas de segundo orden establecen sinapsis para formar el entramado que permite afinar la modulación de la señal nerviosa. Las células amacrinas no reciben inervaciones directas de los fotorreceptores, sino que establecen sinapsis recíprocas con las células bipolares, además de contactos sinápticos entre sí y con las células ganglionares. Así, las células amacrinas también participan, al igual que las células horizontales, en la organización centro-periférica de los campos receptores de las células ganglionares. En la retina de los vertebrados, la mayoría de las células amacrinas son neuronas inhibitorias y contienen como neurotransmisores GABA o glicina. Estos neurotransmisores son normalmente utilizados en potenciales inhibitorios en todo el sistema nervioso central, en este caso inhiben a las células ganglionares. Un 50% de las células amacrinas son glicinérgicas, un 40% segregan GABA, y pequeñas poblaciones segregan un segundo neurotransmisor como, dopamina, serotonina, acetilcolina o sustancia P. El GABA es un neurotransmisor muy común en las sinapsis inhibitorias de la retina de mamíferos.

### 1.1.1.3 TRANSDUCCIÓN VISUAL

La transducción visual o fototransducción es el proceso mediante el cual un fotón genera una respuesta nerviosa en los fotorreceptores y luego, a través de la red sináptica y del nervio óptico, ésta información llega al cerebro. En resumen la luz penetra en el globo ocular a través de la córnea y, tras atravesar la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo, llega a la

retina. Debe entonces atravesar todas sus capas antes de interactuar con los fotorreceptores, donde tiene lugar la fototransducción o conversión de la señal luminosa en impulsos eléctricos. Este proceso se produce de forma muy similar en ambos tipos de fotorreceptores (Figura 11).

El sistema visual es el único sentido en el cual el mecanismo de transducción implica en la membrana plasmática una hiperpolarización en vez de una despolarización, lo que significa que su potencial de membrana se vuelve más negativo, entre -70 y -80 mV (Baylor 1987).

Los fotorreceptores, en condiciones de oscuridad escotópica se encuentran parcialmente despolarizados y liberan tónicamente Glu en sus terminales axónicos. En estas condiciones, la concentración citoplásmica de guanosinmonofosfato cíclico (GMPC) es elevada, lo cual permite mantener abiertos los canales iónicos de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y, por consiguiente, la célula se encuentra en estado despolarizado, aproximadamente entre -30 y -40 mV. El GMPC es una molécula central en la transducción visual que actúa como segundo mensajero y su balance, continuamente modulado, permite el cambio de potencial de membrana, es decir la respuesta nerviosa. La proteína encargada de la producción constante de GMPC es el enzima guanilatociclasa. La despolarización de los fotorreceptores respecto al potencial de membrana en reposo de una neurona típica (-65 mV) está causada principalmente por el flujo de entrada constante del ion  $\text{Na}^+$  a través de los canales de la membrana del segmento externo.

La respuesta a la luz se inicia por la absorción de la radiación electromagnética por el fopigmento (opsina) en la membrana de los segmentos externos. Cuando un fotón alcanza el segmento externo de un fotorreceptor (cono o bastón) se produce un cambio de conformación en el retinal, este cambio activa a la opsina (fenómeno conocido también como "blanqueamiento"). En los conos, el cromóforo 11-cis-retinal, unido covalentemente a la opsina presente en los discos membranosos, se fotoisomeriza a todo-trans-retinal. En los bastones, en cambio, la fotoisomerización produce un cambio conformacional de la rodopsina a metarrodopsina II, la cual es inestable y se disocia en todo-trans-retinal y opsina. Ésta última activa a la proteína G heterotrimérica reguladora denominada transducina que intercambia GDP por GTP, el cual disocia la subunidad  $\alpha$  de las otras subunidades, y la subunidad  $\alpha$  disociada activa la fosfodiesterasa PDE6 de GMPC. Esta enzima cataliza la conversión de GMPC a 5'-GMP, por consiguiente la concentración intracelular de GMPC disminuye y se desactiva la corriente oscura. La desactivación produce un cambio en el potencial de membrana debido al cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de GMPC.

La célula fotorreceptora se hiperpolariza en respuesta a la luz y así cesa la liberación axónica de Glu.

La cascada catalítica activada por la luz debe estar compensada por una reacción de inactivación, con el fin de devolver el fotorreceptor a su estado de reposo. Este tiempo, denominado de recuperación, es esencial para que el fotorreceptor pueda generar respuestas ante nuevos estímulos luminosos. Eso conlleva una serie de reacciones que conducen a la reactivación de la corriente oscura. La reactivación de la corriente oscura ocurre debido a la recuperación de los niveles de GMPc intracelulares. La desactivación del proceso de la cascada de transducción visual y la recuperación de los niveles de GMPc requeridos para la liberación de Glu se produce mediante diferentes mecanismos moleculares. La subunidad  $\alpha$  de la transducina hidroliza el GTP a GDP gracias a su actividad GTPasa intrínseca, eso conduce a la inhibición de la isoenzima fosfodiesterasa PDE6, y con ello se revierte la concentración de GDP. A la vez, el cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de GMPc también impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que la concentración en el citosol de este catión clave también disminuye. Esto desencadena una cascada de señales, se activa la proteína activadora de la guanilato ciclasa (GCAP), la cual es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que a su vez activa a la guanilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de GTP a GMPc y, por tanto, permite la recuperación de los niveles normales de GMPc, así como la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  controlados por GMPc.

En la fototransducción de conos se produce la desactivación de la metarrodopsina II mediante su fosforilación por la rodopsina quinasa. La recoverina, que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mantiene inactiva a la rodopsina quinasa, se disocia de ella cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares disminuyen. Cuando la recoverina se disocia de la rodopsina quinasa, esta enzima fosforila a la metarrodopsina II, lo cual disminuye su afinidad por la transducina.

Finalmente, la S-arrestina se une a la metarrodopsina II fosforilada, inactivándola por completo y, con ello, la cascada de la fototransducción, restaurándose la "corriente oscura" y la liberación de Glu en los terminales axónicos. Este mecanismo de fosforilación e inactivación de la metarrodopsina II participa en la adaptación a la oscuridad tras estímulos luminosos de intensidad muy elevada.



## 1.2. ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA

La estructura y la complejidad funcional de la retina rinden este tejido vulnerable a muchos tipos de patologías y/o lesiones. Dejando a un lado las lesiones de tipo traumático, la etiología de las enfermedades degenerativas es variada.

El paso del tiempo es un factor de riesgo importante. No podemos clasificar lo que conlleva morfo-fisiológicamente la edad como una enfermedad, sin embargo, el avance de la edad comporta un deterioro de la estructura y funcionalidad de la retina. La enfermedad que más se vincula con la edad es la degeneración macular asociada a la edad (*age-related macular degeneration*, AMD). Ésta conlleva un proceso degenerativo que afecta principalmente la visión central. La degeneración macular perjudica la mácula, la parte del ojo que permite ver los detalles pequeños, y es la causa principal de la pérdida de visión en los mayores de 60 años.

El glaucoma es un grupo de enfermedades que llevan a ceguera. Se caracteriza por la degeneración de las células ganglionares y, sucesivamente, del nervio óptico. Suele estar asociado a aumentos de la presión intraocular. Es la enfermedad donde más se han investigado los efectos de los cannabinoides que trataremos más adelante.

La retinopatía diabética (*diabetic retinopathy*, DR) se refiere a un grupo de manifestaciones patológicas y problemas funcionales del ojo relacionados con la diabetes. Se caracteriza por alteraciones en el sistema vascular que desembocan en pérdida funcional del tejido neural retiniano.

La retinosis pigmentaria (*retinitis pigmentosa*, RP) es un grupo de enfermedades de origen genético que causa la degeneración paulatina retinal. Las formas más comunes de retinosis se caracterizan por afectar prioritariamente a los bastones, llegando a afectar a los conos sólo en fases degenerativas avanzadas. Dado que los bastones están concentrados en la zona periférica de la retina, la RP se caracteriza por manifestaciones sintomáticas típicas que incluyen: progresivas dificultades de adaptación a la oscuridad (visión o ceguera nocturna) a la que sigue una pérdida progresiva de campo visual de tipo concéntrico que dibuja a lo largo del tiempo un esquema degenerativo de túnel que, en algunos casos, lleva a una ceguera total. Es interesante destacar que todo este conjunto de enfermedades degenerativas cursa con algunos patrones de respuesta patológica celular comunes. Los patrones comunes son la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la activación de las vías apoptóticas (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014).

Todas estas manifestaciones patológicas se caracterizan por tener efectos de remodelación de la retina, con cambios morfológicos y funcionales adaptativos a los procesos degenerativos. Los fenómenos de remodelación incluyen: alteraciones en la vascularización, en la estructura retiniana y alteraciones en la respuesta celular.

Muchas sustancias neuroprotectoras del sistema nervioso central podrían ser útiles como terapias en patologías degenerativas retinianas. Por consiguiente, se han desarrollado y se están desarrollando toda una serie de investigaciones sobre la neuroprotección, potencialmente aplicables a los fenómenos neurodegenerativos de la retina, aunque las enfermedades difieran en etiología, signos y síntomas.

En general, las enfermedades neurodegenerativas son de difícil curación, y la degeneración retiniana, al día de hoy, es incurable y una vez empezada es irreversible. Las terapias utilizadas en el tratamiento de las distrofias retinianas logran retrasar el avance de la degeneración, pero no hay terapias disponibles para recuperar las células perdidas y restaurar la visión. La investigación científica ha estimulado el desarrollo de un amplio número de modelos animales que reproducen los diferentes modelos de patologías retinianas humanas; se han definido líneas de cultivo celular retiniano, importantes de cara al conocimiento de las vías celulares involucradas, que deberían ser aún más potenciadas.

Actualmente los esfuerzos investigadores para encontrar un remedio contra la degeneración retiniana se orientan sobre tres principales líneas de acción. La primera se centra en la búsqueda de estrategias preventivas para contrarrestar los mecanismos que subyacen a la enfermedad. La línea de acción se basa en el uso de compuestos farmacológicos, silenciamientos o sustituciones de carácter genético. La segunda línea se basa en la obtención y administración de antiapoptóticos, antiinflamatorios y factores neurotróficos que puedan retrasar los efectos de la degeneración. La tercera línea se basa en sustituir y/o reponer células retinianas por células madre o por células retinianas en diferentes estados de desarrollo (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014). En los últimos años se ha implementado la investigación con otras estrategias como la ontogénesis y los chips visuales. A pesar de este esfuerzo científico, el conocimiento actual de estas enfermedades necesita ser implementado para llegar a terapias eficaces y resolutorias. El futuro pasa, de momento, por implementar todas las facetas terapéuticas, y el tratamiento de las enfermedades retinianas se orienta hacia la combinación de varias líneas de acción. En mi modesta opinión la integración entre tecnología y biología es la vía más esperanzadora.

### 1.2.1 RETINOSIS PIGMENTARIA: CARACTERISTICAS Y ETIOLOGIA

Como ya se ha mencionado, se denomina retinosis pigmentaria a un conjunto de degeneraciones retinianas progresivas de origen hereditario que afectan, en primera instancia, a las funciones de las células fotorreceptoras. El primer término documentado referente a esta enfermedad fue acuñado por el Doctor Donders en 1857 en una carta a H. Von Helmholtz, un pionero en la investigación del sistema visual, en la que describía fenómenos degenerativos de la retina como retinitis. Al igual que otras denominaciones antiguas de enfermedades, es un nombre incorrecto, ya que el término -itis presupone un estado inflamatorio o componente infeccioso de la enfermedad.

La RP es una de las causas de degeneración más frecuente de la retina (Tabla 1). Existen distintas anomalías genéticas subyacentes a los trastornos clasificados como RP. La clasificación de la RP según su modalidad de herencia es la siguiente: autosómica recesiva (20-30% de los casos), autosómica dominante (15-20%), la ligada al cromosoma X. Esa última fue puesta de manifiesto por primera vez en el 1985 (Bhattacharya, Clayton et al. 1985), tiene una incidencia menor (6-10%), es más rara y menos estudiada. En general la mayoría de los casos de RP son monogénicos, aunque se han identificado casos de RP multigénicas. Hasta la fecha, se han mapeado e identificado muchos genes y loci que causan la patología. El gen (RHO) rodopsina puede causar hasta un 25% de la retinosis pigmentaria autosómica dominante (RPad), el gen USHA2A puede causar hasta un 20% de la retinosis pigmentaria autosómica recesiva (RPar) y el gen RPGR causa alrededor del 70% de la retinosis pigmentaria relacionada con el cromosoma X. En conjunto, estos 3 genes pueden llegar a predeterminar alrededor del 30% de los casos de RP (Tabla 2) (Hartong, Berson et al. 2006). En este contexto, es necesario mencionar la amplia diversidad de funciones que las proteínas implicadas desempeñan. Algunas codifican la expresión de proteínas implicadas en la fototransducción, incluyendo la rodopsina, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosfodiesterasa dependiente del GMPc, la arrestina, etc. Otras intervienen en el ciclo de la vitamina A y están involucradas en los procesos de transporte e isomerización del 11-cis-retinal a todo-trans-retinal, bien en el interior del fotorreceptor o bien en el EPR. Otras participan en los procesos de fagocitosis etc.

Otra clasificación usada es la que distingue la RP en: retinosis típica y atípica; ambas se caracterizan por limitar sus manifestaciones clínicas al órgano visual. En la RP típica el proceso degenerativo afecta *in primis* a la zona periférica de la retina, en concreto a los fotorreceptores tipo bastón. Esta degeneración conlleva la pérdida de visión a partir de la

periferia y, paulatinamente, se manifiesta como visión denominada “en túnel”. La RP atípica se caracteriza por afectar *in primis* a los fotorreceptores tipo cono. En este caso, siendo la posición de los conos foveal en la retina, la pérdida de visión es central y los sujetos afectados para ver los objetos utilizan la retina periférica.

La tercera categoría de RP se denomina sindrómica, abarca más de 30 síndromes diferentes y se denomina así porque las manifestaciones clínicas son de carácter visual y extra-visuales. Se estima que afecta a un 20–30% de los pacientes con RP y la calidad de vida y esperanza de los sujetos afectados es menor. En el Síndrome de Usher, la RP está acompañada de manifestaciones clínicas como defectos en el sistema auditivo y disfunciones vestibulares (El-Amraoui, Petit 2014, Bernal, Ayuso et al. 2003, Hartong, Berson et al. 2006). En el síndrome de Bardet-Biedl, síndrome con carácter marcadamente multisistémico, la RP cursa desde los primeros estadios de la enfermedad con cuadros clínicos de obesidad, polidactilia post-axial, disfunciones renales asociadas a cuadro poliquístico, hipogenitalismo y problemas neuronales relacionados con el aprendizaje (Kute, Vanikar et al. 2013, Hartong, Berson et al. 2006). Existen otras formas sindrómicas: el síndrome de Bassen-Kornzweig caracterizado por abetalipoproteinaemia, y otras aún más raras.

País	Proporción de población afectada
España	1/4.000
China	1/4.016
EE.UU.	1/3.700
Israel	1/4.500
Noruega	1/4.400
Suiza	1/7.000

**Tabla 1.** Prevalencia de la RP

*La tabla muestra la prevalencia de la RP en algunos países de diferentes continentes. Tabla tomada y modificada de Flores-Rodríguez y cols. (Flores-Rodríguez, Loma Serrano et al. 2013).*

La prevalencia media de RP es de entre 1/3.000 y 1/5.000 aproximadamente, se calcula que existen alrededor de 1.5 millones de personas afectadas por esta enfermedad en el mundo, siendo más frecuente en hombres que en mujeres. En su mayoría la RP se manifiesta de forma bilateral y simétrica en ambos ojos.

En España, una de cada 80 personas es portadora de genes de la RP, y, en total, existen 15.000 afectados por esta enfermedad. La RP es la cuarta causa más frecuente de ceguera en el mundo (Flores-Rodríguez, Loma Serrano et al. 2013). En Japón es la mayor causa de hándicap visual o ceguera, con una incidencia del 25% de los pacientes (Hata, Yonezawa et al. 2003). En Kuwait esta patología encabeza la clasificación de las enfermedades que causan problemas visuales en personas de menos de 60 años (Al-Merjan, Pandova et al. 2005). En Dinamarca la RP y neuropatías ópticas encabezan con el 29% las causas de ceguera en personas entre 20 y 64 años (Hartong, Berson et al. 2006, Buch, Vinding et al. 2004).

La RP tiene manifestaciones clínicas muy variables que pueden manifestarse en edades tempranas o permanecer asintomáticas hasta la edad adulta. Independientemente del momento de aparición de los síntomas, se sabe que la RP cursa con el proceso degenerativo del sistema visual ya desde la infancia. El curso típico de la RP es la pérdida paulatina del campo visual, de la agudeza visual y de la actividad electroretinográfica a lo largo del tiempo; la función central de la retina disminuye más lentamente que la de la retina periférica y, de la misma manera, la agudeza visual se deteriora más lentamente que la pérdida del campo visual. La evolución del campo visual, agudeza visual y actividad electroretinografica está relacionada con los fotorreceptores afectados. Los bastones, los cuales normalmente son de las primeras células afectadas, están presentes sobre todo en la zona periférica de la retina. De ahí que los individuos afectados cursan con la visión en túnel y la progresiva muerte celular reduce paulatinamente el campo visual. La pérdida de respuesta electroretinografica depende de la muerte de estas células, que ya no producen potencial eléctrico. La presencia de lesiones maculares en la presentación inicial se asocia con una mayor pérdida de la agudeza visual (Delgado-Pelayo 2012).

Las técnicas de modificación genética han permitido crear animales genéticamente modificados con genes asociados a la RP, con el fin de estudiar los efectos y las manifestaciones de las mutaciones asociadas a dicha enfermedad. Con una repartición diferente de los recursos científicos, podrían abrirse nuevas vías de investigación sin animales en el futuro, pero al día de hoy la realidad es que estos modelos son útiles en determinar los procesos neurodegenerativos asociados a la RP.

<b>Categoría enfermedad</b>	<b>Mapa Locus/I (no identificados)</b>	<b>Mapa y genes identificados</b>
Retinitis pigmentosa, X-cromosoma	RP6, RP24, RP34	OFD1, RP2, RPGR
Retinitis pigmentosa, autosómica recesiva	RP22, RP29, RP32	ABCA4, ARL2BP, BEST1, C2orf71, C8orf37, CERKL, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, IDH3B, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, PRCD, PROM1, RBP3, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RPE65, SAG, SLC7A14, SPATA7, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF513
Retinitis pigmentosa, autosómica dominante	RP63	BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SEMA4A, SNRNP200, TOPORS

**Tabla 2.** *Locus y genes identificados*

*La tabla muestra los loci y genes identificados. La tabla ha sido tomada y modificada de <https://sph.uth.edu/retnet>.*

### **1.2.1.1 ALTERACIONES FUNCIONALES Y CELULARES DE LA RETINA ASOCIADAS A LA RETINOSIS PIGMENTARIA**

Los mecanismos celulares y moleculares patológicos subyacentes a la RP guardan parecido con otras enfermedades de carácter neurodegenerativo. Cada patología degenerativa tiene sus propias características y etiología, las cuales sin embargo no impiden buscar modelos comunes de degeneración que puedan favorecer el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares comunes que subyacen en la degeneración de las células de la retina. La variedad de los síntomas y signos clínicos en la RP depende de la combinación de dos factores; la heterogeneidad genética de la enfermedad y la complejidad del tejido afectado. En cuanto al desarrollo de la enfermedad, la RP se caracteriza por tener un amplia variabilidad tanto de los signos y síntomas en el tiempo como de un sujeto a otro. Las manifestaciones clínicas visuales se relacionan fundamentalmente con los dos tipos de fotorreceptores

mayoritarios presentes en la retina, los bastones y los conos. Cerca del 90% de las proteínas presentes en el segmento externo de los fotorreceptores son opsinas, localizadas en los discos membranosos y en la zona plasmática circunstante (Ferrari, Di Iorio et al. 2011).

La retina, debido a su complejidad, requiere una fina modulación de los procesos de proliferación, diferenciación, funcionalidad y apoptosis. Los defectos morfológicos pueden derivar de lesiones mecánicas, de la incorrecta expresión genética, o de los procesos inflamatorios u oxidativos que destruyen las estructuras de la retina a lo largo del tiempo. Cualquier incidencia en estos procesos conlleva problemas a nivel celular.

Las mutaciones genéticas inciden en los fotorreceptores provocando la incorrecta expresión proteica y la sucesiva falta de correcta funcionalidad. Las alteraciones de las vías apoptóticas impiden el control de la tasa de muerte celular programada, los procesos inflamatorios u oxidativos impiden el correcto funcionamiento celular y en todos estos casos el estado de estrés celular conlleva que el fotorreceptor no puede llevar a cabo su función transductora.

En la RP los fotorreceptores son las células más afectadas, pierden sus características morfológicas y la funcionalidad mengua paulatinamente. En general, los fotorreceptores no puede reemplazar correctamente las opsinas, los discos membranosos pierden la alineación con la membrana del segmento externo, y morfológicamente el fotorreceptor se vuelve más corto y sus segmentos no son bien reconocibles al microscopio. A menudo, se observa la pérdida de la conexión sináptica entre fotorreceptores y neuronas secundarias. Esta pérdida de conexión puede derivar de dismorfia o de muerte del fotorreceptor y de las neuronas secundarias (bipolares, horizontales, amacrinas etc.). Los fotorreceptores degenerados normalmente cambian a formas menos regulares, y a nivel de capa se observa pérdida del empaquetamiento ordenado de los segmentos externos. Las restantes células "sanas" intentan compensar con cambios reorganizativos que se manifiestan a través de la extensión de sus prolongaciones o bien con brotes de neuritas. Esta adaptación no se observa en la zona macular (Vugler 2010). Los neo-neuroprocesos se dirigen a la OPL e INL, este fenómeno se observa también en AMD (Gupta, Brown et al. 2003). El número de filas empaquetadas de núcleos de fotorreceptores de la ONL disminuye notablemente y la capa pierde tanto en espesor como en linealidad.

Cualquier proceso degenerativo conlleva importantes cambios en la estructura general de la retina, en la barrera hematoretiniana y en el sistema vascular. Un patrón muy común a nivel celular, el cual se repite en la mayoría de enfermedades retinianas, se manifiesta con la pérdida de regularidad de las formas celulares y en el empaquetamiento de sus estructuras.

Aunque algunos estudios indican que no siempre la degeneración de un tipo celular afecta a la arquitectura de la retina y de las demás neuronas (Cuenca, Pinilla et al. 2010, Gregory-Evans, Wallace et al. 2013, Hoon, Okawa et al. 2014).

Cada proceso patológico pone en marcha sistemas adaptativos que conllevan una intensa actividad metabólica. A nivel de fotorreceptores, esta intensa actividad metabólica conlleva estrés oxidativo, con producción de agentes oxidantes, los cuales no sólo afectan a la salud del fotorreceptor, sino que desencadenan también efectos devastadores a nivel local. Estos efectos locales se cree que ocurren gracias a señales que se transmiten por las “gap junctions”. En general, el estrés oxidativo lleva a la muerte celular por disfunciones derivadas de la oxidación de proteínas, lípidos y DNA (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014). En algunos casos, se ha observado que el sistema visual compensa la muerte de bastón favoreciendo la proliferación de conos o viceversa. Para explicar dicha proliferación, se barajan dos hipótesis: que la señal pase por las “gap junctions” de una célula a otra y desencadene el proceso adaptativo, o que este efecto sea predeterminado genéticamente (Saade, Alvarez-Delfin et al. 2013, Mohand-Said, Deudon-Combe et al. 1998).

En estados patológicos, se han observado además procesos de neurogénesis. Las células de Müller son, no sólo el principal tipo de célula glial en la retina, sino que, en condiciones patológicas, pueden des-diferenciarse a un fenotipo neuronal de células madre o progenitoras latentes y podrían regenerar neuronas perdidas en la retina. Varias vías de transducción de señales podrían inducir esta des-diferenciación de las células de Müller maduras. Una sustancia que estimula este fenómeno es el glutamato. Así la excitotoxicidad por glutamato podría retroalimentar la recuperación de nuevas neuronas. Además, la retina tiene células madre presentes en la *pars plana* y en la *pars plicata*, pudiendo ser las encargadas del proceso de renovación neuroepitelial (Coles, Angenieux et al. 2004).

A nivel de OPL se forma una estructura muy especializada denominada cintilla sináptica, la cual, observada al microscopio electrónico de transmisión, tiene una estructura electrodensa (Sterling, Matthews 2005). En la retina de ratas y ratones con RP se ha observado la alteración en el número y en la estructura de las cintillas sinápticas. Esto se manifiesta con un acortamiento de los procesos de los fotorreceptores, que llegan a perder las sinapsis con las neuronas secundarias (bipolares y horizontales) (Fariss, Li et al. 2000, Sullivan, Woldemussie et al. 2007a, Regus-Leidig, Fuchs et al. 2014). Estas manifestaciones patológicas en los tipos celulares las encontramos también en AMD, glaucoma, en retinas con problemas isquémicos y en el caso de desprendimiento de retina, con algunas diferencias. Una proteína muy

importante en las sinapsis es el Bassoon. El Bassoon es una proteína presináptica que se localiza en la terminal de los fotorreceptores. Se caracteriza por no expresarse postsinápticamente en células bipolares (Brandstatter, Fletcher et al. 1999). La disminución de esta proteína presináptica confirma la merma de las conexiones a causa de la degeneración en las ratas del modelo P23H.

Las distrofias asociadas a los fotorreceptores afectan a la señal en cascada de la fototransducción y, posteriormente, a la retina interna. La afectación de la cascada puede derivar de la muerte de los fotorreceptores o de la red neuronal secundaria. En las células bipolares de conos se han observado cambios en las dendritas de la OPL, cambios morfológicos en los axones, y reducciones del número de sinapsis, fundamentalmente con fotorreceptores en la OPL y células amacrinas AII en la IPL del modelo P23H. En ratones afectados de RP, las células bipolares ON de bastones pierden capacidad de respuesta al glutamato. Este fallo se debe a la pérdida de fotorreceptores y a la disminución paulatina de la expresión de mGluR6 en células bipolares, que conlleva la desensibilización al glutamato (Puthussery, Gayet-Primo et al. 2009). Este receptor metabotrópico es crucial en la hiperpolarización de la célula bipolar ON, y conlleva el cierre del canal regulado por  $Ca^{2+}$  intracelular (Nawy 2000), de manera que la variación de expresión de los receptores de glutamato (mGluR e iGluR) podría estar enlazada con el mantenimiento de la actividad sináptica.

En varios modelos animales, durante la degeneración, se ha observado que la retina intenta crear vías aberrantes a través de brotes de neodendritas secundarias o extensiones hacia la ONL de células bipolares y amacrinas (Cuenca, Pinilla et al. 2005). En el modelo animal P23H, no se ha observado hasta ahora este efecto adaptativo. El motivo de tal diferencia sigue desconocido, aunque el prof. N. Cuenca hipotetiza que en tal modelo la falta de brotes aberrantes puede ser determinada genéticamente o impedido por la velocidad de la degeneración (Cuenca, Pinilla et al. 2004).

Las células horizontales también se ven afectadas por los procesos degenerativos. A partir de un grado de degeneración, aparece retracción de dendritas y desensibilización, a pesar de que los somas celulares siguen poco alterados y con normal densidad. Las células horizontales tienen un comportamiento parecido a las células bipolares, ya que en presencia de pérdida de conexiones se puede observar la reorganización de la red sináptica horizontal, para intentar mantener la modulación de la cascada de señales transductoras, y se observan neodendritas con nuevas conexiones (Cuenca, Pinilla et al. 2004, Cuenca, Pinilla et al. 2005).

La pérdida de conexiones acarrea la pérdida de sensibilidad por parte de las células. Esta menor sensibilidad, a veces se traduce en alteraciones de la percepción del movimiento y, probablemente, es debido a un excesivo acoplamiento lateral de carácter adaptativo, establecido mediante “gap junctions” entre células horizontales en la OPL, aunque podría relacionarse también con la reorganización de las conexiones vía “gap junction” entre células amacrinas AII en la IPL (Pierelli, Stanzione et al. 1988, Djamgoz, Hankins et al. 1997, Bodis-Wollner 1990). Las células amacrinas evidencian cambios morfológicos en las ratas P23H y ratones rd10, mostrando pérdida de apéndices lobulares en la IPL con el avance del proceso degenerativo (Barhoum, Martinez-Navarrete et al. 2008, Cuenca, Pinilla et al. 2004).

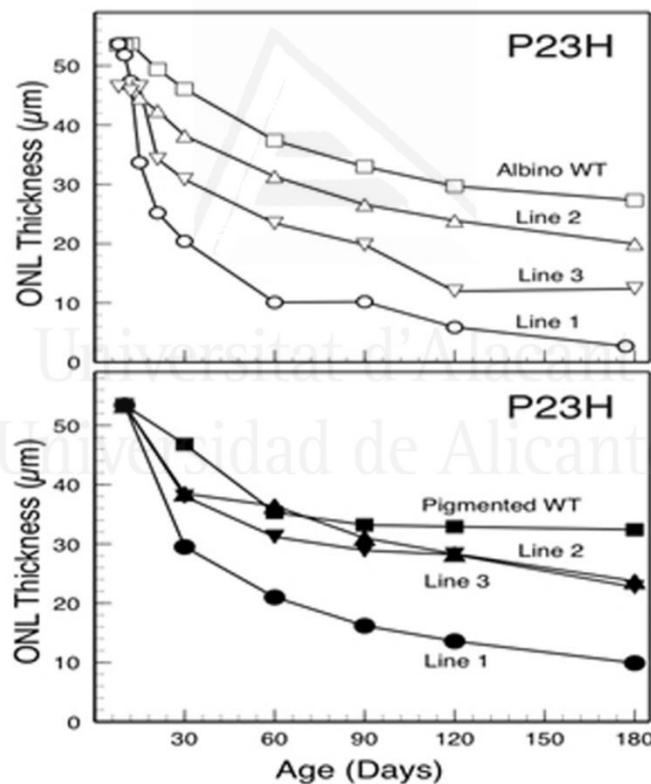
La última capa neuronal de la retina interna es la capa de las células ganglionares. El proceso que lleva a la muerte y pérdida de las células ganglionares, por norma general, empieza por cambios axónicos seguidos de retracciones dendríticas y cambios morfológicos, hasta llegar a la muerte celular. Se ha observado además, que pérdida de conexiones a nivel de células ganglionares afectan también a la retina externa, y que hay una relación entre pérdida de conexiones entre ganglionares y células bipolares y cambios en las conexiones entre las células bipolares y los fotorreceptores en un modelo murino de glaucoma (Hoon, Okawa et al. 2014). Aunque la degeneración retinal de las células ganglionares no presente alteraciones morfológicas visibles, sí que algunos estudios han evidenciado alteraciones en la funcionalidad de las conexiones (Sekirnjak, Jepson et al. 2011, Stasheff, Shankar et al. 2011).

### 1.3. EL MODELO P23H: CARACTERÍSTICAS

En el ámbito científico se utilizan modelos animales para la investigación. Aunque las implicaciones éticas de esta utilización no serán objeto de esta tesis, son un nudo significativo que la ciencia debe tener en cuenta para buscar, de cara al futuro, alternativas viables al dolor de otros seres vivos, con el objetivo último de adquirir y transferir conocimiento, el mismo objetivo que tiene el DNA de una célula.

*“Una vez que aceptamos que una criatura viva siente dolor, si deliberadamente la hacemos sufrir, somos igual de culpables. Sea humana o animal, nos embrutecemos a nosotros mismos.”*

*Jane Goodall*



**Figura 12.** Tasa de degeneración de las ratas P23H y comparación entre rata albina y pigmentada

Imagen tomada y modificada de <http://www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml>.

Una de las estrategias más utilizadas en investigación para estudiar la RP en humanos, es utilizar modelos animales con un patrón de degeneración funcional y estructural parecido a los seres humanos. Existen diferentes modelos animales de enfermedades retinianas, en los

cuales la tasa de pérdida de los fotorreceptores varía considerablemente (Figura 12) (Berson 1990, Humphries, Rancourt et al. 1997, D'Cruz, Yasumura et al. 2000, Machida, Kondo et al. 2000a). Los diversos modelos animales utilizados actualmente han sido objeto de numerosos estudios pormenorizados.

Estos animales poseen una mutación dominante que corresponde a un cambio entre nucleótidos de una citosina por una adenina (CCC a CAC), en el codón 23 de la secuencia codificante del gen de la rodopsina. Eso implica la sustitución del aminoácido prolina por histidina en el residuo 23 de la secuencia de la proteína. Es importante resaltar que la prolina en esa posición se encuentra por lo general altamente conservada (Figura 13).

Aunque el primer modelo transgénico de roedor portador de esta mutación fue desarrollado en ratón y expresaba la rodopsina humana P23H, el modelo transgénico P23H más utilizado actualmente ha sido desarrollado en ratas albinas. Este modelo es portador del alelo P23H de la rodopsina de ratón y fue desarrollado mediante inyección pronuclear (Steinberg, Flannery et al. 1996).

**TABLE I: CONSERVATION OF RHODOPSIN AMINO ACID 23 AMONG OPSINS**

OPSINS	AMINO ACID*												
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Human rhodopsin	Thr	Gly	Val	Val	Arg	Ser	Pro	Phe	Glu	Tyr	Pro	Gln	Tyr
Bovine rhodopsin	Thr	Gly	Val	Val	Arg	Ser	Pro	Phe	Glu	Ala	Pro	Gln	Tyr
Human blue cone opsin	Ser	Ser	Val	—	—	Gly	Pro	Trp	Asp	Gly	Pro	Gln	Tyr
Human red cone opsin	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Gly	Pro	Phe	Glu	Gly	Pro	Asn	Tyr
Human green cone opsin	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Gly	Pro	Phe	Glu	Gly	Pro	Asn	Tyr
Drosophila R1-6 rhodopsin	Met	Ala	His	Leu	Ile	Ser	Pro	Tyr	Trp	Asn	Gln	Phe	Pro
Drosophila R8 rhodopsin	Met	Ala	His	Leu	Val	Asn	Pro	Tyr	Trp	Ser	Arg	Phe	Ala

\*The codon numbers for amino acids are for the normal human rhodopsin protein.

**Figura 13.** Conservación Prolina (Pro) en el codon 23

La imagen muestra la conservación en el codón 23 del gen de la rodopsina del aminoácido prolina en varias especies (Bersol 1990).

La mutación P23H en el gen de la rodopsina es la causa más frecuente de RP, representando aproximadamente el 12% de los casos de RP autosómica dominante en Estados Unidos (Dryja, McGee et al. 1990, Dryja, McEvoy et al. 2000). La mutación produce un plegamiento anormal de la proteína, la cual se acumula en el retículo endoplasmático rugoso. Se ha demostrado que esta proteína mal plegada interactúa de manera incorrecta con el sistema proteosoma-ubiquitina impidiendo su reciclaje. La ubiquitina es una pequeña proteína modificadora

involucrada en la homeostasis celular, cuya función es la de marcar otras proteínas para su degradación. La ubiquitina se une covalentemente al sustrato proteico, formando cadenas oligoméricas de poliubiquitina que actúan como una etiqueta.

En el modelo P23H se han caracterizado 3 cepas animales albinas (<http://www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml>). El nombre oficial otorgado a estas cepas por el Instituto de investigación de animales de laboratorio (ILAR) responde a Tg(P23H)1Lav, Tg(P23H)2Lav y Tg(P23H)3Lav, aunque convencionalmente se usan las abreviaturas P23H Línea 1 o P23H-1, P23H Línea 2 o P23H-2, P23H Línea 3 o P23H-3 (Figura 12). El modelo P23H se caracteriza por afectar en su estado inicial a los bastones con pérdida de la visión periférica y nocturna, y posteriormente a los conos con pérdida de visión central. El modelo animal utilizado en esta Tesis doctoral fue la línea albina P23H línea 3 (P23H-3), derivada de las ratas albinas Sprague-Dawley. Se eligió este modelo porque el proceso degenerativo de la RP es parecido al de los humanos.

A nivel histológico, la retina de las ratas del modelo P23H se caracteriza por una pérdida temprana y progresiva de los fotorreceptores tipo bastón. Los fotorreceptores sufren mayor afectación en las zonas periféricas de la retina. La merma de fotorreceptores acarrea una pérdida de regularidad, de espesor y, de empaquetamiento de la ONL.

## 1.4. LOS CANNABINOIDES

Los cannabinoides son un grupo de sustancias bien conservadas en el mundo vegetal y animal, los cuales determinan múltiples efectos moduladores en el organismo. Estos efectos incluyen analgesia, modulación del apetito y náusea, efecto neuroprotector, efecto antiinflamatorio, además de sus conocidos efectos psicotrópicos. Actualmente, se consideran tres tipos generales de cannabinoides: los cannabinoides herbarios, o fitocannabinoides, sintetizados naturalmente por las plantas del género *Cannabis*; los cannabinoides endógenos, o endocannabinoides (eCBs), producidos por mamíferos animales y humanos; y los cannabinoides sintéticos, compuestos similares generados en laboratorio.

*Cannabis sativa*, popularmente conocida como cannabis o marihuana, ha sido cultivado durante miles de años en muchas zonas geográficas del mundo. A partir de la mitad del siglo XIX, esta planta estaba presente geográficamente en todos los continentes, debido a su gran capacidad de adaptación climática. Debido a su amplia versatilidad, ha sido utilizada como producto de manufactura (cáñamo), comida (semillas) o elemento recreacional, debido a sus efectos psicotrópicos. Su uso en ámbito médico también se remonta a tiempos lejanos. En Europa y Asia se utilizaba como remedio paliativo contra el dolor, por sus efectos antiinflamatorios y sedantes. A inicios del siglo XX, en el mundo occidental adquirió una connotación negativa de droga peligrosa. En el 1924 fue declarado un narcótico, en 1941 se retiró de la farmacopea de Estados Unidos de América y en 1971 la división de narcóticos de la ONU declaró el cannabis una sustancia de alto potencial de abuso y sin efectos terapéuticos. Esta declaración y sus efectos psicotrópicos dificultaron y siguen parcialmente dificultando la investigación de los CBs, a pesar de que su potencial e interés terapéutico parece interesante. La postura de carácter político, con toda probabilidad, limitó el conocimiento del sistema endocannabinoide y el desarrollo científico de posibles programas terapéuticos asociados a estas sustancias durante muchas décadas. A pesar de que la planta y sus efectos fueran conocidos antes del desarrollo de la ciencia moderna, fue solo en el 1964 que empezó la investigación moderna sobre los CBs. En 1964 fue aislado el componente psicoactivo de *Cannabis sativa*, el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), por el Prof. Mechoulam, sin duda el padre de la investigación sobre CBs (Mechoulam, Gaoni 1965).

Los CBs son ácidos grasos derivados de terpenofenoles, bien conservados en el mundo vegetal. Todos los mamíferos están provistos de un extenso sistema endocannabinoide y, por tanto, tiene una importancia filogenética y evolutiva. Los indicios y las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora indican que este grupo de sustancias tiene un papel sistémico en

el organismo, importantes efectos terapéuticos relacionados con el sistema eCB, y efectos directos no mediados.

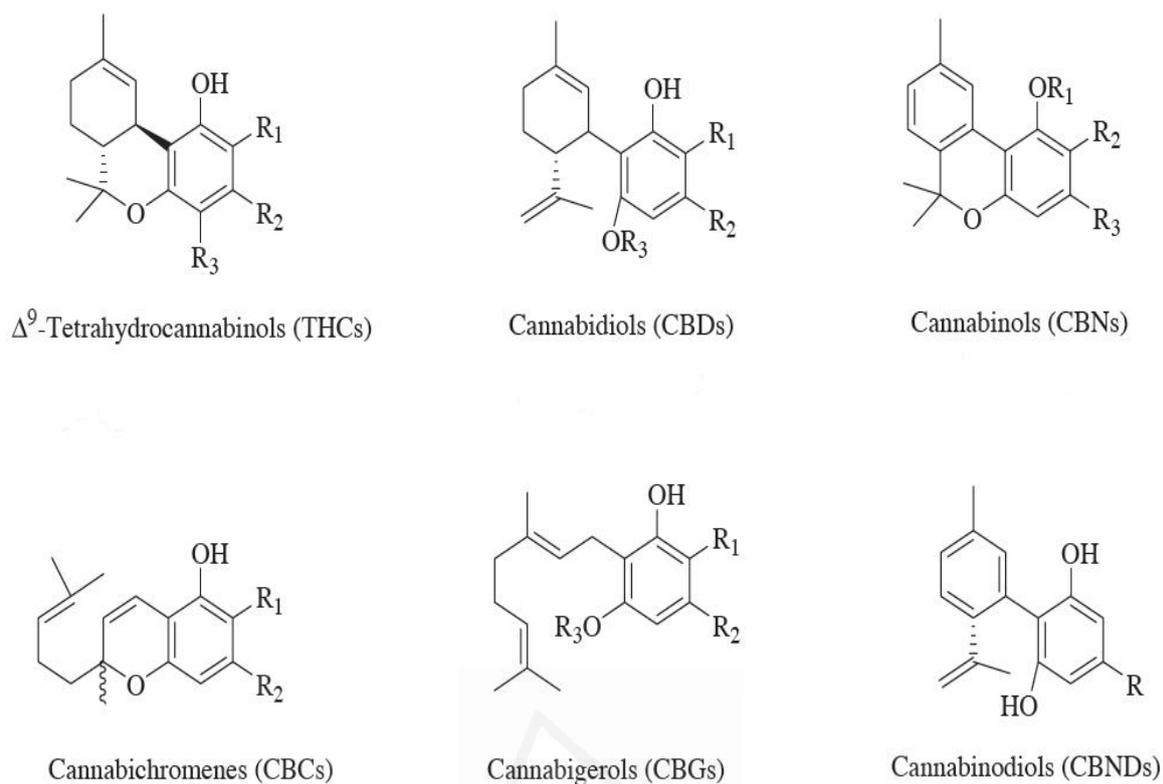
*Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos, de los cuales aproximadamente 60 se recogen y se clasifican químicamente como CBs, aunque los últimos datos los amplían a 525 compuestos químicos distintos sintetizados por esta planta, 70 de ellos clasificados como CBs (Brenneisen 2007), y los datos están en continua evolución.

Los cannabinoides endógenos, o endocannabinoides, se sintetizan a través de enzimas principalmente relacionadas con el metabolismo lipídico como: N-acetiltransferasa, fosfolipasas A, C y D, y diacilglicerolipasa, las cuales, a partir de lípidos de membrana como fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolina, o diacilglicerol, sintetizan el eCB correspondiente. Es un proceso dependiente de calcio y normalmente la síntesis responde a la demanda fisiológica del compuesto en cada momento. Es decir, que los eCBs se sintetizan cuando el organismo los pide. Existen evidencias de la síntesis de eCB a nivel neuronal, que ocurre en el soma neuronal y dendritas (Egertova, Giang et al. 1998, Levenes, Daniel et al. 1998). Aunque, últimamente, algunas investigaciones indican la posibilidad de un fenómeno de parcial almacenamiento lipídico residual de eCBs.

Los CBs exógenos son un grupo de sustancias con características farmacológicas, y posible eficacia terapéutica. Los exocannabinoides de origen botánico más relevantes son: los tetrahidrocannabinoles (THCs), los cannabidiolos (CBDs), los cannabinoles (CBNs), los cannabigeroles (CBGs), los cannabicromenos (CBCs) y los cannabinodiolos (CBNDs) (Figura 14).

El continuo desarrollo de procesos de síntesis artificial ha permitido sintetizar compuestos análogos a los CBs de varios tipos, como el HU210, utilizado en nuestra investigación, además de análogos bicíclicos y tricíclicos del THC que carecen de anillo pirano como el CP55.940 (Qureshi, Saady et al. 1998). Otros compuestos sintéticos son el levonantradol y desacetilevantradol. También se han sintetizado compuestos cannabimiméticos como los aminoalquilindoles, cuyo principal representante es el WIN 55.212-2. Su estructura proviene de la pravadolina y difiere de los compuestos antes mencionados. Los últimos avances están encaminados a la síntesis de análogos de compuestos eCBs.

Todos estos compuestos, endógenos, naturales o análogos de diferente origen comparten la característica de tener efectos en el organismo mediados por los receptores de cannabinoides (CBrs).



**Figura 14.** Estructura química de los principales cannabinoides

Los efectos moduladores de los CBs son mayoritariamente mediados a través de receptores metabotrópicos. Se conocen principalmente dos tipos de receptores de CBs en el organismo, el receptor CB1 (también CB1r) descubierto por Devane en 1988 (Devane, Dysarz et al. 1988) y el receptor CB2 (también CB2r) identificado por Munro en 1993 (Munro, Thomas et al. 1993). Estos receptores están distribuidos en todo el sistema nervioso central, sistema inmunitario y en los órganos periféricos. La variabilidad y la densidad de la distribución espacial de los receptores responden a exigencias funcionales.

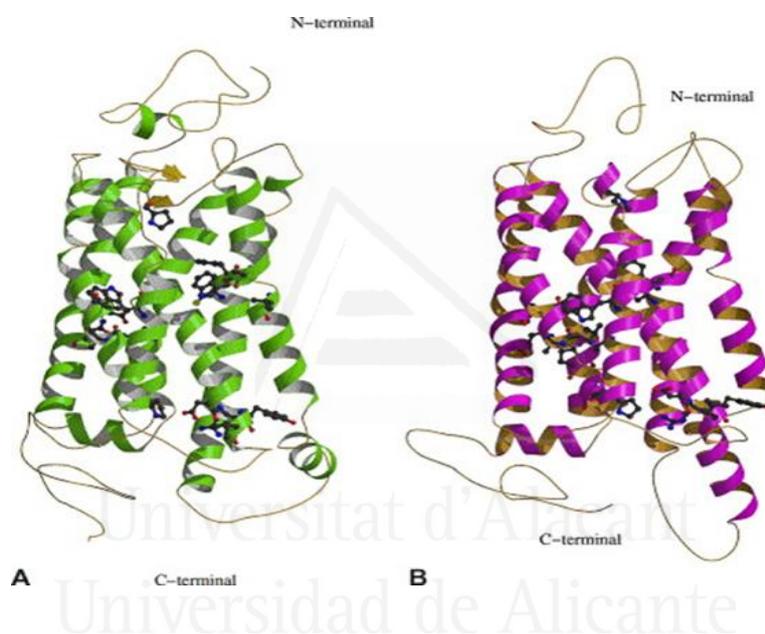
En las últimas décadas, la investigación científica ha centrado su atención en los CBs y en el sistema endocannabinoide por su importante papel sistémico-fisiológico. Debido a su amplia versatilidad de funciones, se han desarrollado importantes investigaciones en el campo del dolor, del cáncer y antiemesis, del apetito, de la obesidad, de la osteoporosis, de la fertilidad, de las enfermedades neurodegenerativas, del desarrollo embrionario, del control motor y, en los últimos años, el sistema visual. Durante estos años se han evidenciado similitudes entre

los cannabinoides exógenos y los endocannabinoides (Salzet, Breton et al. 2000). Éstas incluyen efectos neuromoduladores, a través de los cuales los CBs influyen en el comportamiento motor, la memoria, el aprendizaje y las respuestas neuroendocrinas. Los CBs también se relacionan con hipotensión, bradicardia, con la inhibición del crecimiento celular, afectan el metabolismo de la energía, y modulan las respuestas inmunes e inflamatorias (Onaivi, Chakrabarti et al. 1996, Martin, Mechoulam et al. 1999, Salzet, Breton et al. 2000, Sugiura, Waku 2000). Los CBs, a día de hoy, se sabe que poseen interesantes efectos terapéuticos como antiemético, estimulador del apetito en enfermedades debilitadoras como cáncer y SIDA y son actualmente utilizados en el tratamiento de la esclerosis múltiple, lesiones a la medula espinal, síndrome de Tourette, epilepsia y glaucoma. En este sentido según una revisión realizada por científicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington (EE.UU) existen suficientes datos científicos para respaldar la realización de ensayos clínicos con cannabis en la esclerosis lateral amiotrófica. Señalan que "los datos preclínicos indican importantes efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores del cannabis" (Carter, Abood et al. 2010).

#### *1.4.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y SU FUNCIÓN*

El sistema endocannabinoide comprende los receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos y las enzimas necesarias para su biosíntesis y degradación (Howlett, Barth et al. 2002, Onaivi, Chakrabarti et al. 1996). El sistema endocannabinoide está restringido en su distribución filogenética. Al día de hoy, su existencia sólo se ha establecido en especies de vertebrados (Elphick 2012, Elphick, Egertova 2001). En una primera etapa, debido a la alta liposolubilidad del THC y otros fitoCBs, se pensó que sus propiedades farmacológicas derivaban de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Después del descubrimiento de los CBs, el conocimiento del sistema endógeno de cannabinoides se completó con la demostración de la existencia de ligandos endógenos, denominados endocannabinoides, y la identificación de los receptores cannabinoides (Devane, Dysarz et al. 1988, Devane, Hanus et al. 1992, Munro, Thomas et al. 1993). El conocimiento sobre el sistema eCB fue ampliado por estudios detallados de relación estructura-actividad, por el cual se mostraban mecanismos mediados por el receptor unido a los cannabinoides (Seltzman 1999). El conocimiento de la biología de los cannabinoides ha avanzado de manera importante en las últimas décadas con la caracterización de los receptores cannabinoides en una gran variedad de tejidos.

La mayoría de las acciones farmacológicas producidas por los cannabinoides se deben a su interacción con dos tipos diferentes de proteínas específicas, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores de cannabinoides se caracterizan por un dominio aminoterminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular y siete dominios transmembrana altamente conservados (Figura 15). En los últimos años, se ha demostrado que los ligandos cannabinoides son capaces de interactuar con otros tipos de receptores como el “transient receptor potential vanilloid 1” (TRPV1) y el “G protein coupled receptor 55” (GPR55), entre otros. La distribución de los CBr se encuentra en estrecha relación con los efectos fisiológicos que producen.



**Figura 15.** Estructura 3D de los receptores de cannabinoides

A) Estructura del receptor CB1. B) Estructura del receptor CB2, (Montero, Campillo et al. 2005).

La estructura molecular de los CBr se ha caracterizado en humanos y ratas (Gerard, Mollereau et al. 1991, Matsuda, Lolait et al. 1990). Además, se han descrito en primates, cerdos, perros y ratones. En general, se sugiere que estén presentes en todos los mamíferos terrestres y en un amplio abanico de órganos. El receptor CB1 es un polipéptido de 475-476 aminoácidos, se expresa principalmente en el SNC y su distribución es heterogénea (Figura 15A) (Matsuda, Lolait et al. 1990, Egertova, Elphick 2000, Herkenham, Lynn et al. 1991, Montero, Campillo et al. 2005). Este receptor ha sido clonado en ratas, ratones y humanos. En el SNC muestra un 97-99% de coincidencia en la secuencia aminoacídica entre varias especies. En general, se expresa a nivel presináptico, modula la actividad neuronal, y protege de fenómenos de

excitotoxicidad por sobre-estimulación o por sobre-inhibición. El CB1r interfiere en la liberación de neurotransmisores como serotonina, GABA, acetilcolina (ACh), dopamina, histamina, glutamato y algunas catecolaminas. Es el responsable de los efectos psicotrópicos y de adicción, y participa entre otras funciones en la nocicepción, el movimiento y procesos cognitivos complejos. La expresión del CB1r se asocia principalmente con la coordinación motora y el movimiento, y se expresa en particular en zonas como el cerebelo, los ganglios basales y la sustancia negra. También se relaciona con la atención y funciones cognitivas, el aprendizaje, la memoria y las emociones, y se expresa en particular en zonas como la amígdala e hipocampo (Biegon, Kerman 2001, Glass, Faull et al. 1997). Además, se ha localizado en un gran número de tejidos periféricos como el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular, el sistema reproductor, el sistema ventilatorio y otros órganos (Croci, Manara et al. 1998, Giacoppo, Mandolino et al. 2014). El CB1r se relaciona también con la producción de óxido nítrico a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta activación podría explicar en parte los efectos de los CBs en el sistema vascular del ojo. El CB2r, es un polipéptido de 360 aminoácidos y muestra una homología del 44% en su secuencia de aminoácidos con el receptor CB1r (Figura 15B) (Munro, Thomas et al. 1993), porcentaje que aumenta hasta el 68% en los segmentos transmembrana (Lutz 2002). El CB2r se expresa principalmente a nivel periférico. Se ha localizado en bazo, amígdalas y en diferentes células del sistema inmune como: leucocitos, células mieloides, macrófagos y monocitos, y en tejidos hematopoyéticos (Munro, Thomas et al. 1993, Giacoppo, Mandolino et al. 2014, Berdyshev 2000). Este receptor también se ha detectado en células gliales del SNC, aunque en bajas concentraciones (Van Sickle, Duncan et al. 2005, Carlisle, Marciano-Cabral et al. 2002), y en otros sitios del SNC, pero su papel en estas células aún no ha sido bien establecido (Onaivi, Ishiguro et al. 2008). También se encuentra implicado en el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia de células (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007). El CB2r se asocia con las respuestas a fenómenos de neuroinflamación y liberación de citoquinas, con la migración celular, y en respuesta a condiciones hipóxicas e isquémicas (Maresz, Carrier et al. 2005, Ashton, Rahman et al. 2007, Lunn, Fine et al. 2006).

Ambos receptores, CB1r y CB2r, a nivel celular, regulan la enzima adenilatociclasa. Ésta enzima cataliza la conversión de ATP a cAMP, que es un importante mensajero secundario. Como resultado final, inhiben canales de  $Ca^{2+}$  y activan canales de  $K^{+}$  (Mackie 2008). Este efecto ocasiona una hiperpolarización de la célula y disminución de la liberación de neurotransmisores de las terminaciones pre-sinápticas. Estos efectos conducen a una menor

excitabilidad en poblaciones neuronales. La adenilato ciclasa activa además la cascada de activación de MAPK (MAP quinasas o proteínas activadas por mitógenos), que activa la c-JUN amino terminal kinasa, que regula, entre otras funciones, la respuesta a estímulos de estrés, y está involucrada en procesos apoptóticos. Los CBs producen efectos también a nivel endocrino. En el páncreas la activación de CBr produce una inhibición de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  intracelular reduciendo la liberación de hormonas (Nakata, Yada 2008). El sistema endocannabinoide está muy difundido en el organismo. Pese a su importante presencia, los eCB se encuentran en muy escasa cantidad en los fluidos del cuerpo como suero sanguíneo o líquido cerebroespinal. Esto porque el sistema eCB metaboliza las sustancias en el mismo tejido donde las sintetiza “on demand”, y el mecanismo de acción es local, de carácter celular o paracelular, y no de carácter hormonal.

Se han propuesto dos posibles nuevos receptores cannabinoides: receptor “CB2-like” y “No-CB1/No-CB2”. Estos nuevos receptores podrían estar implicados en la modulación de la transmisión sináptica (Di Marzo, Goparaju et al. 2001, Breivogel, Griffin et al. 2001).

Por último, algunos estudios evidencian que los CBs podrían unirse a otros receptores afines NoCBr. Algunos estudios confirman la posibilidad de actividad cannabinoide no mediada por CB1r/CB2r (Di Marzo, Breivogel et al. 2000). Además, algunas acciones de los cannabinoides parecen estar mediadas por otros receptores: TPRV1, y algunos receptores huérfanos de la familia G como GPR55, GPR118, GPR119 y otros como 5-HT1A, y PPAR. (Cristino, de Petrocellis et al. 2006, Mezey, Tóth et al. 2000, Brown 2007, O'Sullivan 2007).

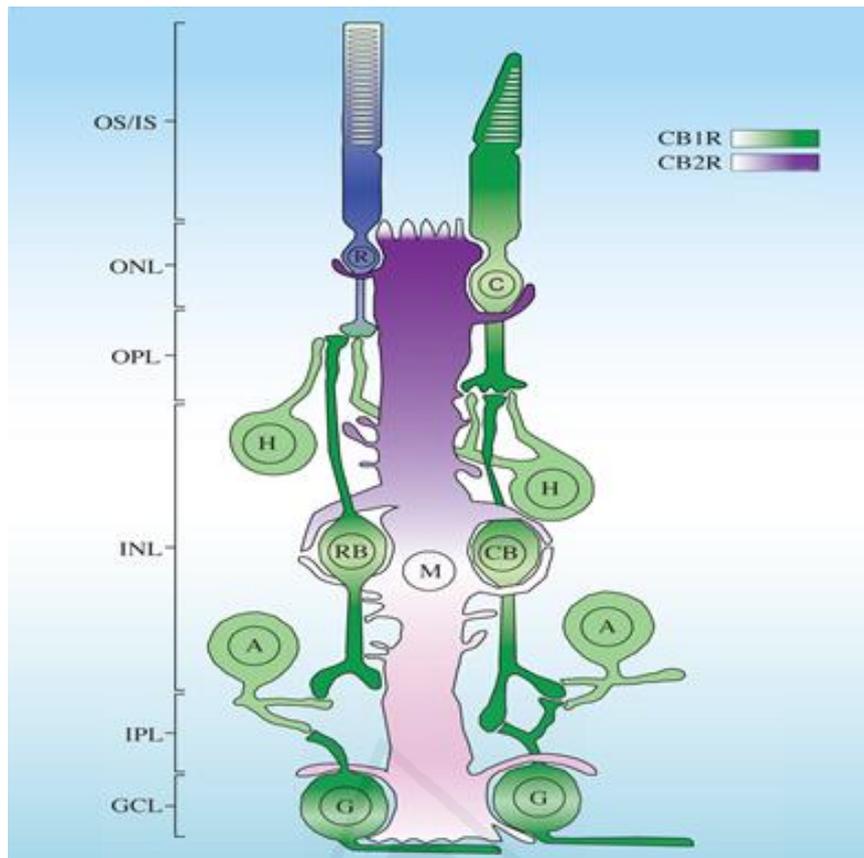
Resumiendo, el sistema eCB asume un papel primordial en el SNC, y está presente en el sistema inmune y en órganos periféricos (Járai, Wagner et al. 1999). La activación del sistema eCB, en general, responde a situaciones de alteración de la homeostasis por daños de varios orígenes. Su acción fisiológica asume cada vez más un papel modulador más importante. Sus posibilidades terapéuticas parecen muy interesantes, y la síntesis de sustancias afines a CBr amplía la posibilidad de estudiar dianas terapéuticas efectivas.

### *1.4.1.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA RETINA*

Los CBs tienen efectos sobre el sistema visual, lo cual no es un concepto nuevo. En Jamaica, entre los pescadores, los efectos de los CBs sobre la visión escotópica durante la pesca nocturna son conocidos desde hace mucho tiempo. Los primeros investigadores conocidos que hicieron propia, a fines científicos, esta observación fueron el Dr. West y el Dr. Reese, ambos en el 1991 (West 1991, Reese 1991). En la correspondencia de West en la revista *Nature* se afirmaba que los pescadores jamaicanos utilizaban una mezcla de alcohol y cannabis, a través de la cual mejoraban sensiblemente su visión nocturna y la navegación, por lo cual la pesca resultaba más provechosa. Sucesivamente, este efecto fue estudiado por otros científicos. Los profesores Abderramán Merzouki, de la Universidad de Tetuán, y Joaquín Molero, de la Universidad de Granada, evidenciaron que varios pescadores del norte de Marruecos aseguraban ver mejor por la noche tras haber fumado 'kif' (Russo, Merzouki et al. 2004, Merzouki, Molero Mesa 1999). Un relato en una noche de verano sobre pescadores, cannabis y visión nocturna con unos amigos de vuelta de un viaje a Jamaica, me llevó a reflexionar y proponer los CBs como posible grupo de sustancias con efectos terapéuticos en la patología de la retinosis pigmentaria.

La presencia del sistema eCB en la retina de muchas especies evidencia la posibilidad de un sistema de señalización filogenéticamente conservado entre las especies (Straiker, Stella et al. 1999, Bouskila, Burke et al. 2012). Además, la presencia de los CBr en la retina ha sido demostrada en varias especies, y parece tener influencia en muchos de los pasos de procesamiento de la transducción retinal (Straiker, Stella et al. 1999, Hu, Arnold et al. 2010, Zabouri, Bouchard et al. 2011, Yazulla 2008). En primates y humanos la información es escasa (Straiker, Stella et al. 1999, Bouskila, Burke et al. 2012, Bouskila, Javadi et al. 2013a, Bouskila, Javadi et al. 2013b).

En roedores, los CBr se expresan en fotorreceptores tipo cono y tipo bastón (Straiker, Stella et al. 1999, Cecyre, Zabouri et al. 2013), células bipolares (Yazulla, Studholme et al. 1999), células amacrinas (Yazulla, Studholme et al. 1999, Warriar, Wilson 2007a), células horizontales (Cecyre, Zabouri et al. 2013), células de Müller (Bouskila, Javadi et al. 2013b, Bouskila, Javadi et al. 2013a) y células ganglionares (Figura 16) (Yazulla 2008, Yazulla, Studholme et al. 1999, Straiker, Stella et al. 1999).



**Figura 16.** Expresión de CBr en la retina

*El sistema eCB está presente en conos (C), bastones (R), células horizontales (H), células bipolares de bastones (RB), células bipolares de conos (CB), células amacrinas (A), células ganglionares (G) y células de Müller (M). Esquema tomado y modificado de Bouskila y cols. (Bouskila, Javadi et al. 2013a).*

En las células retinianas de primates la producción de eCB bioactivos y la expresión de los CBr es confirmada, entre otras cosas, por la presencia de la enzima hidrolasa de amidas y ácidos grasos (FAAH) y de otras enzimas catalizadoras de eCBs (Hu, Arnold et al. 2010). Esta enzima es la encargada de la degradación de la anandamida y, en algunos casos, de 2-Araquidonilglicerol (2AG) (Deutsch, Chin 1993, Cravatt, Demarest et al. 2001).

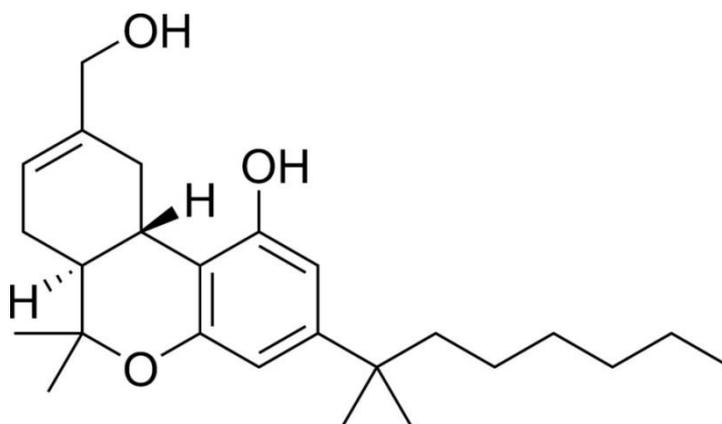
Varios estudios han intentado aclarar las capacidades neuroprotectoras de los eCBs producidos fisiológicamente (Panikashvili, Simeonidou et al. 2001, Xu, Chen 2015) y algunos estudios muestran el rol neuroprotector de los eCB en la retina (Yazulla, Studholme et al. 1999, Yazulla 2008, Krishnan, Chatterjee 2015). El sistema eCB asocia sus efectos a la modulación de la secreción de neurotransmisores en los fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células de Müller (Fan, Yazulla 2003). Existen evidencias de que el sistema eCB está asociado a otros efectos moduladores en la retina, por

ejemplo, los agonistas del CB1r estimulan la monoamina oxidasa en la retina bovina (Gawienowski, Chatterjee et al. 1982), inhiben la liberación de dopamina (Schlicker, Timm et al. 1996) y regulan el tráfico iónico de entrada y salida de las células retinianas (Straiker, Sullivan 2003).

A pesar de los estudios llevados a cabo hasta ahora, el conocimiento sobre los efectos de los CBs en la retina es limitado y sigue siendo un amplio campo que necesita investigaciones. En este sentido no tenemos conocimiento de estudios sobre efectos terapéuticos de CBs en retinas afectadas por la retinosis pigmentaria, ni en el modelo murino P23H.

#### 1.4.2 HU210: CARACTERÍSTICAS

Los cannabinoides sintéticos son compuestos con características similares a los fitocannabinoides. HU210 es un compuesto de la familia de cannabinoides sintéticos denominados clásicos. Se denominan clásicos en cuanto su estructura tricíclica terpénica es igual al cannabinoide más conocido, el THC. La fórmula química de HU210 es:  $[(-)3 - (1,1\text{-dimethylheptyl})-(-) 11\text{-hydroxy-}_8\text{-tetrahydrocannabinol}]$  y fue sintetizado en los laboratorios de la Universidad Hebrea en el 1988 por el grupo del Profesor R. Mechoulam. Como otros cannabinoides clásicos, presenta una estructura fundamental tricíclica, y es derivado del benzopireno. HU210 es una sustancia lipofílica; gracias a esta característica atraviesa fácilmente las barreras hematoencefálica y también la hematoretiniana (Figura 17) (El-Remessy, Al-Shabrawey et al. 2006). HU210 es un potente agonista de receptores de cannabinoides, se estima que sea desde 100 hasta 800 veces más potente que el THC. HU210 tiene características terapéuticas importantes, y se caracteriza por una alta afinidad por los CBrs. Respecto a su isómero HU211, no psicotrópico, parece tener capacidades terapéuticas más efectivas. A nivel celular, HU210 ejerce una actividad inhibitoria sobre la adenilato ciclasa y la acumulación intracelular de cAMP unas 1000 veces superior a su enantiomero.



**Figura 17.** Estructura del cannabinoide sintético HU210

Su afinidad por el CB1r es 1500 veces superior. Anteriores estudios parecen apuntar que la enantioselectividad de los CBr condiciona la actividad cannabimimética (Mechoulam, Feigenbaum et al. 1988). Los hallazgos indican que un residuo de lisina cerca del sitio de unión del CBr, permite el reconocimiento y la unión de este compuesto. El mismo residuo parece ser crucial también para otros cannabinoides como el CP 55,940. La magnitud del efecto parece estar relacionada con la conformación que adquiere el CBr después de la unión con el CB.

Varios estudios han demostrado que HU210 comparte con otros CBs la capacidad de modular el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual es un importante regulador de la actividad enzimática (Ottani, Giuliani 2001, Nakata, Yada 2008). HU210, como otros CBs, incrementa el metabolismo de la glucosa en los astrocitos, los cuales se encargan del mantenimiento de la función neuronal.

Los CBs ejercen una acción estimulante sobre la producción de óxido nítrico, aunque el mecanismo de acción a nivel neuronal no está aclarado (Hillard, Muthian et al. 1999). Los CBs se asocian a hipotensión, la cual provoca aumento de la frecuencia cardíaca y se asocia a vasodilatación periférica. Este efecto se observa también cuando los CBs son administrados por vía intravenosa (Hillard 2000). Hoy en día se sabe que los mecanismos que median en los efectos vasculares de los cannabinoides son complejos, y los resultados obtenidos dependen de las condiciones experimentales, de la especie animal y de la zona vascular que se estudie (Randall, Alexander et al. 1996, Crandall, Matragoon et al. 2007, Hillard 2000). Un estudio reciente con HU210 demuestra que sus efectos cardioprotectores se asocian a canales KATP y

proteína kinasa C (Maslov, Lasukova et al. 2012, Maslov, Krylatov et al. 2014). HU210 ha sido investigado también en relación a sus efectos hipotérmicos, antipiréticos, antiinflamatorios (Ovadia, Wohlman et al. 1995).

En el ámbito del SNC, los efectos neuroprotectores de HU210 y los demás CBs han sido investigados en referencia a la atenuación de daños por lesiones de varios tipos (Dagon, Avraham et al. 2007a, Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Pertwee 2012). También ha sido investigado el papel del sistema eCB en el sistema visual. Los CBs han sido investigados y utilizados terapéuticamente principalmente en la reducción de la presión ocular en la patología del glaucoma. Numerosos trabajos sugieren que la administración, tanto de agonistas cannabinoides endógenos como sintéticos, son capaces de reducir la presión intraocular a través de las acciones sobre el receptor CB1r (Crandall, Matragoon et al. 2007, Naveh, Weissman et al. 2000). Ulteriores investigaciones han puesto de manifiesto la presencia difundida del sistema eCB en varias áreas oculares como musculo ciliar, epitelio pigmentado ciliar, retina, conducto de Schlemm, etc. (Porcella, Maxia et al. 2000, Stamer, Golightly et al. 2001, Lograno, Romano 2004). Sin embargo, la neuro-retino-protección ha sido poco investigada (Yazulla 2008, El-Remessy, Rajesh et al. 2011, El-Remessy, Al-Shabrawey et al. 2006, El-Remessy, Khalil et al. 2003a).

HU210 hasta ahora no ha sido estudiado en retina. HU210 no se ha investigado en relación con la retinosis pigmentaria en los modelos experimentales P23H. Nuestro grupo de investigación, en base los prometedores indicios, ha puesto en marcha una primera investigación de esta sustancia y sus posible efectos sobre la retinosis pigmentaria.

### *1.5. EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA, CONSUMO DE ALIMENTO, CONSUMO DE AGUA Y PESO CORPORAL*

El sistema endocannabinoide influye a nivel de SNC en la ingesta de alimentos, principalmente a través del hipotálamo y el sistema límbico. El hipotálamo modula la alimentación a través de la regulación de señales de saciedad y la mejora de señales orexígenas. Además, a través de las interacciones con las vías mesolímbicas implicadas en los mecanismos de recompensa, los eCB parecen aumentar la motivación por los alimentos, a través de un refuerzo del valor hedónico de estos (Li, Schmidt et al. 2013, André, Gonthier 2010a, Li, Jones et al. 2011a, Bermudez-Silva, Viveros et al. 2010a, Tam, Vemuri et al. 2010a, Akbas, Gasteyer et al. 2009, Wang, Liu et al. 2003). El sistema endocannabinoide también regula el gasto de energía en los órganos periféricos (Li, Jones et al. 2011a). La mayoría de los agonistas de los CBr pueden producir efectos estimulantes del apetito (Kim, Li et al. 2011, Mackie 2008). Desde un punto de vista filogenético, la función primordial del sistema eCB parece ser conducir el balance energético hacia la acumulación y el establecimiento de reservas energéticas (Piazza, Lafontan et al. 2007), en pocas palabras, estimular el apetito para acumular grasa. Sin embargo, hay estudios que han observado que el THC y algunos cannabinoides pueden producir un efecto anoréxico (Giuliani, Ottani et al. 2000). HU210 es un potente agonista de los CBr, y produce pérdida de peso corporal en los animales tratados. Este efecto está mediado por el CB1r (Giuliani, Ottani et al. 2000, Mechoulam, Feigenbaum et al. 1988). La magnitud del efecto dependería de la dosis administrada y del tiempo de exposición. Una dosis aguda de HU210 ( $\geq 100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) produce efectos visibles, incluso 24 h después de la inyección (Giuliani, Ottani et al. 2000). Algunos estudios apuntan a una posible aparición de trastornos gastrointestinales y lesiones intraperitoneales inducidas por HU210, lo que podría contribuir a reducir la ingesta y disminuir el peso corporal (Giuliani, Ottani et al. 2000). Otros asocian el efecto anorexigénico a la reducción del tránsito intestinal y el vaciamiento gástrico con altas dosis de cannabinoides. Tras la administración i.p. de altas dosis de cannabinoides ( $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) se ha observado un malestar visible en los animales, caracterizado por una posición encorvada, presencia de manifestaciones diarreicas y vocalización anómala (Zimmer, Zimmer et al. 1999, Giuliani, Ottani et al. 2000). No se puede olvidar que la pérdida de peso corporal y disminución de la ingesta puede deberse también al factor de estrés, producido por las inyecciones i.p. Este factor también podría afectar a la actividad locomotora. En el campo de los CBs y su utilización farmacológica en el control peso, hay un caso que salió en la prensa. El Rimonabant (conocido también como SR141716), antagonista de CB1r, fue comercializado al

público y retirado poco después del mercado. Este retiro se debe a que sus efectos secundarios, relacionados sobre todo con la depresión, se hallaron prevalentes en comparación a los beneficios sobre la salud (Sam, Salem et al. 2011). La necesidad de los “mercados” de encontrar terapias eficientes para la pérdida de peso, y la presión y recursos dedicados a este fin es enorme. Se creó un cortocircuito que desembocó en una investigación dirigida e insuficiente sobre el compuesto antagonista de los CB. La rápida comercialización de fármacos no sustentados por la investigación, por exigencias temporales del mercado, evidencia un problema de falta de investigación de base, y acentúa el empuje hacia una investigación funcional, y la producción y comercialización privada con fines de lucro en el sector farmacéutico; y no al conocimiento y mejora de la vida de seres vivos. En general, los estudios indican que la actividad locomotora baja con la administración de CBs. En otros estudios, la administración de CBs, aunque disminuye la actividad locomotora total, aumenta la actividad caracterizada por patrones de inquietud, que se manifiesta con locomoción en círculos acompañada de vocalización anómala (Dalton, Wang et al. 2009, Ferrari, Ottani et al. 1999a). Todos los efectos parecen relacionarse con la dosis. Algunos estudios muestran que altas dosis de CBs suprimen la actividad motora (Polissidis, Chouliara et al. 2010, Smirnov, Kiyatkin 2008, Katsidoni, Kastellakis et al. 2013), mientras que bajas dosis resultan incrementar tal actividad (Sanudo-Pena, Romero et al. 2000, Katsidoni, Kastellakis et al. 2013). El rol del sistema eCB en la función fisiológica y fisiopatológica de carácter hepático se estableció hace menos de una década y ha sido poco investigada. La expresión de los CBs en el hígado hasta el día de hoy está localizada principalmente en algunas células: los hepatocitos, células endoteliales y células de Kupffer. Estudios indican que los receptores de CBs se sobreexpresan durante enfermedades crónicas hepáticas de varia etiología y en varios estadios de la enfermedad. Se ha encontrado sobreactivación del sistema eCB por lesiones de hepatocitos, procesos inflamatorios, esteatosis alcohólica y no alcohólica, fibrogénesis, hipertensión portal y encefalopatía hepática (Bátkai, Osei-Hyiaman et al. 2007, Mallat, Lotersztajn 2008, Mallat, Lotersztajn 2010). La acción de los CBs no está tan clara en la fibrosis, donde la activación del CB1r y del CB2r parece tener efectos opuestos. La sobreexpresión durante manifestaciones patológicas hepáticas podría indicar un intento del sistema eCB de mantener o restablecer la homeostasis.

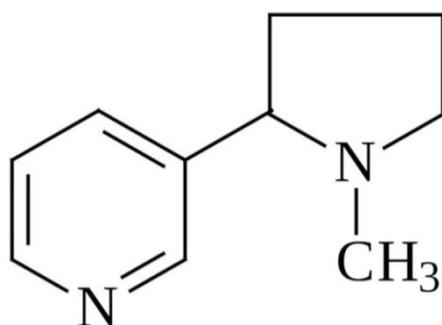
## 1.6. LA NICOTINA Y LOS RECEPTORES NICOTINICOS

La adicción al tabaco es uno de los problemas socio-económicos y sanitarios más importantes de los países desarrollados y en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 1.000 millones de personas fuman tabaco en todo el mundo, y su consumo produce más de 5 millones de muertes cada año. Fumar es la causa del 35% de las muertes por enfermedades respiratorias y, de éstas, el 29% de las muertes son causadas por manifestaciones cancerígenas (<http://www.dejardefumarya.com.mx/enfermedades-respiratorias-por-tabaquismo>). El 80% de las muertes por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son originadas por el tabaquismo. La EPOC, que en 1990 era la quinta causa de muerte en el mundo, pasó a ser la cuarta causa en 2000 y se estima que en 2020 ocupará la tercera posición (Mathers, Loncar 2006). Hay que tener en cuenta, además, que es una patología infradiagnosticada y, hasta hace pocos años, con escasas opciones terapéuticas (Pena, Miravittles et al. 2000). Según la OMS, el consumo de tabaco constituye un factor de riesgo para 6 de las 8 principales causas de mortalidad en el mundo.

La nicotina es un compuesto orgánico, un alcaloide (Figura 18) que se encuentra en los vegetales, principalmente en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum* y *Nicotiana rustica*), con alta concentración en sus hojas (constituye cerca del 5% del peso de la planta y del 3% del peso del tabaco seco), estando también presente en otras plantas de la familia solanácea. En cantidades marginales, ha sido encontrado en otras plantas. La nicotina es el principal componente psicoactivo del tabaco y la responsable de la adicción al mismo.

La nicotina debe su nombre a Jean Nicot, quien introdujo el tabaco en la corte real de Francia en 1559. La nicotina se aisló por primera vez de la planta en 1828 por los químicos alemanes Posselt y Reimann. La nicotina es un agonista colinérgico, el cual se mueve a través del flujo sanguíneo y pasa muy rápidamente por las membranas celulares. Se caracteriza por ser una sustancia que atraviesa la barrera hematoencefálica (Benowitz 1996), la barrera placentaria (Lambers, Clark 1996) y la barrera hemoretiniana (Evereklioglu, Alaşehirli et al. 2004).

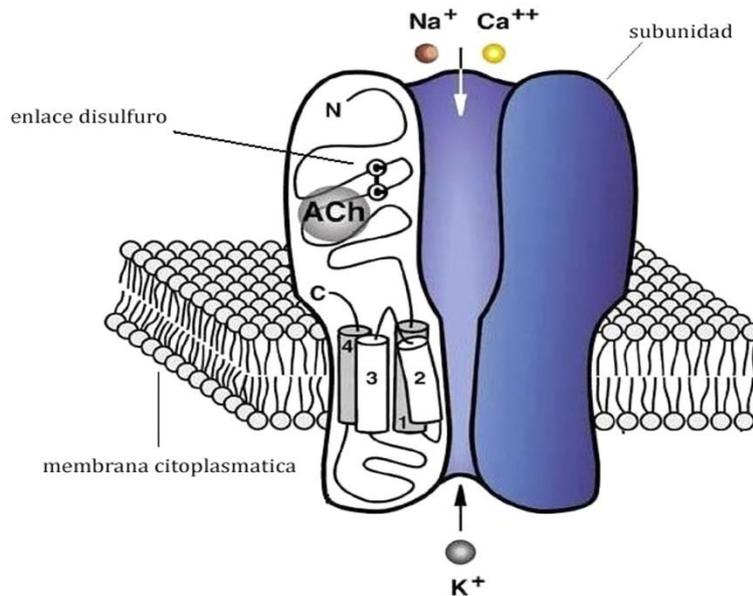
La nicotina actúa sobre el SNC. Es una sustancia que interviene a nivel pre- y post-sináptico, y un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Araujo, Lapchak et al. 1988). Algunos estudios relacionan la nicotina con efectos neuroprotectores, con la recuperación de la memoria en modelos humanos y animales, y con un efecto beneficioso en la enfermedad de Alzheimer y la alerta a los estímulos visuales (Iwamoto, Mata et al. 2013, Quik, Perez et al. 2012, Sieber 2012, Iwamoto, Birkholz et al. 2014, Hijioka Masanori, Katsuki et al. 2011).



**Figura 18.** Estructura de la nicotina

Actualmente, existe una gran controversia sobre el posible efecto neuroprotector de la nicotina, debido a que las pruebas no son concluyentes.

Los receptores nAChR forman parte de la superfamilia de receptores ionotrópicos activados por ligando. Los receptores nAChR son pentámericos, compuestos por combinaciones homo o heteroméricas de diferentes subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Cada receptor posee un dominio extracelular aminoterminal hidrofílico, cuatro dominios transmembrana (que forman la clásica estructura 3+1) y un dominio citoplásmico de tamaño variable (Figura 19) (Le Novere, Zoli et al. 1996). Se han identificado y diferenciado 10 subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ), 3 subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), una  $\gamma$  y otra  $\delta$ . Cada combinación estequiométrica de estas subunidades conlleva diferentes perfiles de respuesta y efecto. En el SNC estos receptores están compuestos por las subunidades heteropentaméricas  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) y  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) o por la combinación de las 5 subunidades  $\alpha$  formando un receptor homopentamérico. Estas subunidades se agrupan alrededor de un poro central permeable a cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Esta región está compuesta por aminoácidos cargados negativamente, que facilitan el paso de cationes a través del poro. Estos receptores pertenecen al sistema colinérgico, de suma importancia en el SNC (Witten, Lin et al. 2010, Cragg 2006, Albuquerque, Pereira et al. 2009), y su desequilibrio en la expresión o funcionamiento se relaciona con neuropatologías como síndrome de Alzheimer, síndrome de Parkinson y esquizofrenia (Albuquerque, Pereira et al. 1995, Albuquerque, Pereira et al. 2009).



**Figura 19.** Estructura básica del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

Dibujo de un receptor nAChR. Se muestran los 3+1 dominios transmembrana, con un largo dominio extracelular y un dominio citoplasmático variable entre los dominios 3 y 4. Se muestra el sitio de unión de la ACh. Imagen toma ay modificada de [http://www.wikiwand.com/it/Recettore\\_nicotinico](http://www.wikiwand.com/it/Recettore_nicotinico).

Los nAChRs se encuentran en el sistema nervioso central y periférico, músculo esquelético, tejido linfoide, macrófagos, keratinocitos de la piel, pulmón, tejido vascular, sistema digestivo, células cromafines de la médula adrenal, y órganos sensoriales. Además, se localizan en los ganglios autónomos, tanto simpáticos como parasimpáticos. Los nAChRs presentan una amplia distribución de acuerdo con la extensa localización de las vías colinérgicas en el SNC (Gotti, Clementi 2004). Los nAChR están localizados preferentemente a nivel presináptico, donde modulan la liberación de distintos neurotransmisores. Con menor frecuencia se encuentran en cuerpos celulares o dendritas y zonas cercanas a la terminal axónica, en disposición postsináptica (Gotti, Clementi 2004, Albuquerque, Pereira et al. 2009). La estimulación de las neuronas postsinápticas posibilita la apertura no selectiva de canales de Na<sup>+</sup>, permitiendo la despolarización de la célula, con la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje. Estos mecanismos modulan la secreción de neurotransmisores, plasticidad sináptica, viabilidad, diferenciación y migración neuronal (Albuquerque, Pereira et al. 2009). En modelos animales se ha demostrado que la acetilcolina tiene un papel muy activo en el desarrollo del cerebro y que es responsable de la proliferación, maduración y

diferenciación de múltiples tipos de células cerebrales (Kolb 1989, Pugh, Margiotta 2000). Esto podría justificar sus efectos a determinados niveles sobre la memoria, atención y respuesta a estímulos visuales. Es igualmente conocido que el uso crónico de agentes ligandos de nAChR como la nicotina pueden acarrear problemas y desajustes indeseados de las funciones fisiológicas. Los receptores de nAChR son muy importantes a nivel cerebral, tanto en estado de desarrollo como en los sucesivos. Se ha demostrado en estudios anteriores que la exposición a nicotina en estado embrionario en ratas produce cambios morfológicos y en el comportamiento (Khalki, Khalki et al. 2012). Además, puede provocar consecuencias a largo plazo en el funcionamiento del sistema visual en individuos expuestos a nicotina, en particular con exposición durante el desarrollo (Yan, Zhao et al. 2006). La nicotina se asocia a efectos sobre el apetito y el comportamiento, se cree debido a su efecto adictivo.

### *1.6.1 EFECTOS MODULADORES DE LOS RECEPTORES NICOTINICOS EN LA RETINA*

La alta densidad de receptores nicotínicos en el colículo superior y en el núcleo geniculado lateral talámico sugieren que estos receptores juegan un papel importante en el sistema visual de los mamíferos. En ratas, la administración subcutánea de nicotina produce un aumento de la actividad en estas áreas, así como en la corteza visual (London, Connolly et al. 1988, Marengo, Bernstein et al. 2000, Schrock, Kuschinsky 1991). Los receptores nicotínicos se expresan en varios tipos de células retinianas, como ganglionares, fotorreceptores y algún subtipo de célula amacrina. Su expresión está presente también en condiciones fisiopatológicas (Smith, Souza et al. 2014). Los receptores nicotínicos en el sistema visual participan en la modulación, organización y funcionamiento normal. Los receptores nAChR podrían tener efectos moduladores no relacionados con el tradicional sistema colinérgico neuronal, sino con el sistema colinérgico no neuronal (Miwa, Freedman et al. 2011, Maneu, Gerona et al. 2010).

Los receptores de nACh parecen tener un efecto neuroprotector en células ganglionares retinianas (Wehrwein, Thompson et al. 2004). En particular, el receptor homomérico  $\alpha 7$  se asocia a neuroprotección y con efectos moduladores sobre epitelio pigmentario, células ganglionares, células amacrinas, y fotorreceptores tipo cono en retina, y contra la excitotoxicidad por glutamato (Maneu, Gerona et al. 2010, Smith, Souza et al. 2014, Mosinger, Price et al. 1991). La administración de nicotina puede dar lugar a cambios en el funcionamiento del sistema visual, aumentando la actividad de los receptores NMDA

relacionados con el neurotransmisor retiniano más importante, el glutamato. En células ganglionares de ratas, algunos estudios indican que la excitotoxicidad podría involucrar receptores NMDA y no NMDA (Mosinger, Price et al. 1991). En otros estudios se ha indicado que la inducción de excitotoxicidad por glutamato es debida a receptores no NMDA (Otori, Wei et al. 1998). Además la nicotina podría tener efectos terapéuticos contra daños neuronales isquémicos incluso podría suprimir la activación proinflamatoria de la microglía (Hijioka Masanori, Katsuki et al. 2011).

La nicotina afecta a la organización y actividad de las terminales de las células ganglionares de la retina y puede provocar consecuencias en el sistema visual en individuos que están expuestos a nicotina durante el desarrollo (Yan, Zhao et al. 2006). En los animales tratados con dosis altas de nicotina, la capa de las células ganglionares retinianas y el espesor global de la retina se reduce en comparación con retinas controles. En estudios histopatológicos, se han demostrado daños en la retina de animales recién nacidos causados por consumo materno de nicotina durante la gestación (Moyano, Porteros et al. 2013). Además, se han observado cambios degenerativos selectivos en la capa plexiforme interna, característicos de atrofia isquémica retiniana (Evereklioglu, Alaşehirli et al. 2004). Estos hallazgos histológicos encuentran confirmación en ensayos electrorretinográficos con nicotina en humano y animales. Varios estudios han puesto en evidencia los efectos a nivel funcional de la nicotina sobre la retina y el sistema vascular retiniano (Junemann, Damaske 1968, Gundogan, Erdurman et al. 2007, Moyano, Porteros et al. 2013, Varghese, Reid et al. 2011).

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

Como se menciona en la introducción, la retinosis pigmentaria es una causa importante de ceguera en el mundo. Todavía no existe un tratamiento eficaz para esta enfermedad, aunque se están investigando estrategias prometedoras. Para ensayar estas estrategias, la vía más recorrida es la utilización de modelos animales. La mayoría de los datos obtenidos a través de registros funcionales en humanos y/o directamente del procesamiento histológico de ojos procedentes de autopsias de pacientes afectados de retinosis pigmentaria son de una utilidad de indudable valor. Sin embargo, la mayoría de este material procede de individuos de edad más o menos avanzada, cuando la degeneración de la retina y la pérdida de función visual son acusadas, por lo que es difícil caracterizar los estadios tempranos y el progreso inicial de las alteraciones de la retina.

La RP es una enfermedad que afecta a la retina en su conjunto. Ésta posee una serie de capas bien definidas, y sus tipos celulares están ampliamente caracterizados, así como las rutas de transmisión de la información visual, lo cual facilita su estudio. La retina está constantemente sometida a distintas fuentes de estrés (oxidativo, por luz, metabólico etc.) que pueden dañar a las proteínas y otros componentes celulares, por lo que en dicho tejido tan fino y complejo los sistemas que aseguran la homeostasis son necesarios. La retina es un tejido metabólicamente muy activo, continuamente estimulado, por lo que su demanda energética es elevada. Esta intensa actividad metabólica conlleva una intensa actividad celular, y cualquier alteración a nivel molecular conlleva un estado de estrés de las diferentes células neuronales presentes en la retina. Por todo ello, es importante determinar cuales sustancias pueden aportar efectos neuroprotectores sobre la patogénesis neurodegenerativa de la retinosis pigmentaria.

Los efectos biológicos de la nicotina son fundamentalmente resultado de su acción sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), cuya función principal es mediar la transmisión sináptica. La nicotina se ha relacionado con posibles efectos neuroprotectores y con la recuperación de la memoria en modelos humanos y animales. Algunos estudios han evidenciado un efecto protector de la de nicotina contra la enfermedad de Alzheimer y en la respuesta a estímulos visuales (Sieber 2012, Iwamoto, Birkholz et al. 2014, Iwamoto, Mata et al. 2013, Hijioka Masanori, Katsuki et al. 2011). Actualmente, existe una gran controversia sobre el posible efecto neuroprotector de la nicotina y la dosis necesaria. Existen pocos estudios al respecto y los resultados no son unívocos.

En las últimas décadas ha aumentado el interés de la comunidad científica en estudiar los efectos fisiológicos y farmacológicos de los cannabinoides. Los cannabinoides son un grupo de sustancias con importantes potencial farmacológico. Cada día se identifican nuevos cannabinoides endógenos, se sintetizan nuevos derivados y se identifican nuevas acciones fisiológicas, por lo que podemos decir que éste es un grupo de sustancia en continua evolución con un amplio campo de investigación.

En el SNC, los efectos neuroprotectores de los CBs han sido investigados en referencia a la atenuación de daños por lesiones al sistema nervioso central de varios tipos (Dagon, Avraham et al. 2007b, Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007, van der Stelt, Di Marzo 2005, van der Stelt, Veldhuis et al. 2002, Zogopoulos, Vasileiou et al. 2013). Además, algunas investigaciones han puesto de manifiesto la presencia difundida del sistema eCB en varias áreas oculares como músculo ciliar, epitelio pigmentado ciliar, retina, conducto de Schlemm, etc. (Porcella, Maxia et al. 2000, Stamer, Golightly et al. 2001, Lograno, Romano 2004). La capacidad de neuroretinoprotección de los CBs ha sido parcialmente investigada (Yazulla 2008, El-Remessy, Khalil et al. 2003b, El-Remessy, Rajesh et al. 2011). HU210 tiene características terapéuticas potencialmente importantes, y se caracteriza por una alta afinidad a los CBrs.

HU210, siendo un agonista muy potente de los CBrs y no habiéndose estudiado en relación con la retinosis pigmentaria en el modelo murino P23H, nos pareció un óptimo candidato para esta investigación.

## 2.2. OBJETIVOS

En base a las consideraciones del apartado 2.1, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

**Objetivo n.1.** Analizar los posibles cambios funcionales en la retina, tras la exposición crónica al cannabinoide HU210 en ratas P23H.

**Objetivo n.2.** Analizar los posibles cambios celulares en la retina tras la exposición crónica al cannabinoide HU210 en ratas P23H.

**Objetivo n.3.** Analizar los efectos de la administración crónica del cannabinoide HU210, sobre la actividad motora, peso, apetito y consumo de agua de ratas P23H.

**Objetivo n.4.** Analizar los posibles cambios funcionales en la retina, tras la exposición crónica a diferentes concentraciones de nicotina en ratas P23H.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

El manejo de todos los animales utilizados en esos estudios y su sacrificio se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa que regula el manejo de animales de experimentación establecida por el National Institute of Health (NIH, United States of America) y por la Directiva Europea que disciplina la materia (2010/63/UE).

Para estos estudios utilizamos ratas transgénicas albinas homocigotas P23H-3, obtenidas por el Dr. LaVail (UCSF School of Medicine; <http://www.ucsfeye.net/mlavailRDratmodels.shtml>).

Como ya se ha tratado en el apartado 1.3., este modelo de degeneración retiniana es debido a una sustitución aminoacídica de una prolina por una histidina en el codón 23 del gen que codifica la rodopsina. Todos los animales nacieron en la colonia del animalario de la Universidad de Alicante y fueron destetados en el periodo correspondiente. Como animal de referencia utilizamos ratas Sprague Dawley (SD; base genética de las P23H) de la misma edad procedentes de una colonia mantenida en el animalario de la Universidad de Alicante.

A partir del día del destete (P21) se iniciaron los experimentos; todos los animales se mantuvieron en una habitación aislada, bajo temperatura controlada de  $\pm 23$  °C, en jaulas individuales Tecniplast modelo 2154F con ventilación adecuada, humedad del 60% y un ciclo de fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Figura 20). La luz en la habitación era emitida por 2 lámparas fluorescente estándares con una intensidad medida a nivel de las jaulas entre 350 y 400 lux. Se realizaron también medidas en zonas posteriores de las jaulas, que suministraron valores medios de intensidad 14.5 lux. La intensidad fue medida con un luxómetro marca GOSSEN modelo MAVOLUX 5032B. Todos los animales se alimentaron con comida seca Teklad 2014 y agua ad libitum.

El compuesto HU210, al ser un cannabinoide, tiene una estricta legislación, también en términos de investigación científica. Para la importación del compuesto con fines científicos, se solicitó una autorización, previa redacción de una memoria informativa, a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, en concreto al área de Estupefacientes, en el respeto de la legislación nacional y del convenio sobre sustancias psicotrópicas del 1971. Además, siendo una sustancia clasificada como psicótropa, se tiene que respetar la normativa del 2001 sobre el uso final de la sustancia. A tal fin, se redactaron solicitudes relativas a su uso científico a R&D System, Tocris Bioscience, para la importación de la sustancia en España.

El compuesto HU210 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) fue disuelto en etanol (5 mg/ml). Para su correcto almacenamiento fue refrigerado a -20 °C. En este estudio se utilizaron 11 ratas P23H, todas de sexo masculino, divididas en dos grupos de manera aleatoria, un grupo control (no tratado) formado por 5 animales a los cuales se les inyectaba 100 µg/Kg (i.p.) de solución salina (0.9% de NaCl) 3 veces por semana, y un grupo tratado con HU210 formado por 6 animales a los que se administró HU210 disuelto en solución salina 3 veces por semana a la dosis de 100 µg/Kg (i.p.) durante 67 días, de P24 hasta P90. Ambos grupos recibieron las administraciones i.p. los mismos días y horas a lo largo de todo el tratamiento. Con el fin de ajustar la dosis establecida al crecimiento de los animales, los animales se pesaban antes de cada administración.

En el experimento con nicotina se utilizaron 19 ratas P23H, todas de sexo masculino, divididas aleatoriamente en 3 grupos experimentales: un grupo control con administración oral de vehículo (etanol) (n = 7), un grupo con administración oral de nicotina disuelta en etanol a razón de 10 mg/ml (n = 6), y un tercer grupo con administración oral de nicotina disuelta en etanol a razón de 50 mg/ml (n = 6). La administración final de nicotina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) era respectivamente de 1 mg/Kg/día y de 5 mg/Kg/día. Tanto la nicotina como el vehículo fueron administrados a través del agua de bebida. Para evitar la oxidación y deterioro de la nicotina disuelta, la mezcla fue preparada y reemplazada 3 veces por semana. Con el fin de ajustar la dosis de nicotina al crecimiento de los animales y la ingesta de agua, los animales se pesaban 3 veces por semana y la ingesta de agua se estimaba cada 15 días. La ingesta de alimento también fue evaluada cada 15 días. La dosis de etanol administrado fue proporcional al peso de los animales y no superó el valor de 1.5 ml/L de agua. Se estima que la dosis de etanol administrada no superó los 0.1 ml/Kg/día. En este estudio el tratamiento fue administrado durante 91 días, de P30 hasta P120.

Al finalizar el tratamiento en ambas investigaciones, las ratas se sacrificaron mediante procedimiento bien establecido y aprobado internacionalmente (inhalación de CO<sub>2</sub> y dislocación cervical). Las ratas se sacrificaron por la mañana con el único propósito de esta investigación y, a parte de los ojos e hígados, no se utilizaron otros órganos para estudios adicionales. Los cadáveres, una vez quitados los órganos necesarios para la investigación, se incineraron.

Seguidamente a la muerte, se marcó la parte superior del limbo esclerocorneal con hilo de sutura y se extrajeron los globos oculares destinados a ser analizados mediante microscopia. Con ese fin se realizó un pequeño corte en el limbo esclerocorneal para permitir que el fijador

penetre fácilmente en el interior. Los ojos se fijaron en paraformaldehído 4% en PB 0.1 M pH 7.4 durante 1 h a temperatura ambiente. Para un correcto almacenamiento en el laboratorio, los ojos se lavaron con PB 0.1 M pH7.4 y seguidamente se procedió a crioproteger los tejidos con soluciones de sacarosa crecientes en PB 0.1 M pH 7.4 (15% durante 1 h, 20% durante 1 h y 30% a 4 °C durante toda la noche) según procedimiento bien establecido (Cuenca, Pinilla et al. 2005). Finalmente, se almacenaron a -80 °C para su futuro uso. Los hígados fueron pesados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C.



**Figura 20.** Imagen de una de las ratas albinas P23H-3 utilizadas en los estudios

## *3.2. MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA*

### *3.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA*

#### *3.2.1.1 SECCIONES VERTICALES DE RETINA*

Los ojos se descongelaron a temperatura ambiente y se diseccionaron. Para proceder a la disección, se utilizaron herramientas de microcirugía siguiendo el siguiente procedimiento: se cortó el ojo a lo largo del limbo esclerocorneal con tijeras de disección microquirúrgicas para separar iris y cornea, eliminándose estas estructuras junto con el cristalino, el humor vítreo y eventuales residuos de sacarosa sobrante, con mucha atención para no dañar el tejido objeto de estudio, la retina con su epitelio pigmentario. Se procedió a recubrir los ojos con solución de inclusión para criostato Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe; Zoeterwoude, Holland) y fueron congelados en nitrógeno líquido. Con el fin de permitir la obtención de secciones con buena orientación de cara a la observación microscópica, incluimos los ojos en más O.C.T. y se atemperaron a -25 °C en el interior del criostato y marcamos la parte superior y el lado temporal para permitir una correcta orientación. Se cortaron las secciones con grosor de 16 µm para la observación microscópica. Para los cortes de precisión se utilizó un criostato LEICA CM 1900 (Wetzlar, Deutchland). Las secciones obtenidas se depositaron en portaobjetos clase 1.5, 24 mm, Superfrost® Plus (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany) y se almacenaron a -20 °C. Antes de cualquier utilización de las secciones obtenidas se lavaron 3 veces en PB 0.1 M pH 7.4 y luego se trataron con solución bloqueadora compuesta por 10% suero de mono estándar en PB más 0.5% Triton x-100 durante 1 h al fin de evitar unión inespecífica de anticuerpos a determinantes antigénicos del tejido.

#### *3.2.2 INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS*

Las secciones se lavaron 3 veces durante 5 min con PB 0.1 M pH 7.4 y se incubaron durante 16 h, en cámara húmeda y oscuridad, con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBX (Triton X -100 al 1% en PB).

ANTICUERPO	ANTIGENO	ORIGEN	CASA COMERCIAL
Primario	Bassoon	Ratón (monoclonal) (Cuenca, Pinilla et al. 2004)	Stressgen 1:1000
	Calbindina D-28K(CB)	Conejo(policlonal) (Cuenca, Pinilla et al. 2004)	Swant 1:500
	Proteína quinasa C, subunidad $\alpha$ (PKC- $\alpha$ )	Conejo (policlonal) (Cuenca, Pinilla et al. 2004)	Santa Cruz Biotechnology 1:100
	Recoverina	Ratón (monoclonal) (Cuenca, Pinilla et al. 2004)	J.F. McGinnis U. of Oklahoma 1:2000
	Rodopsina	Ratón (monoclonal) (Pinilla, Cuenca et al. 2007)	Chemicon 1:200
	Sinaptofisina	Ratón clon SY38 (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2011)	Chemicon 1:500
	Y-Transducina	Conejo (policlonal) (Cuenca, Pinilla et al. 2004)	Cytosignal 1:200
	GNB3	Conejo (policlonal) (Fernandez-Bueno, Fernandez-Sanchez et al. 2012)	SIGMA 1:50
Secundario	IgG de conejo	Asno	Molecular Probes Eugene, OR 1:100
	IgG de ratón	Asno	Molecular Probes Eugene, OR 1:100

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios y secundarios

*La primera columna indica el tipo de anticuerpo; la segunda columna indica la proteína antígeno; la tercera columna indica la especie de origen y la bibliografía de referencia; la cuarta columna indica la casa comercial de adquisición y la dilución.*

Todos los anticuerpos primarios fueron previamente probados para comprobar su inmunoreactividad (Tabla 3). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min en PB 0.1 M pH 7.4. A continuación, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en PBX conjugados a un fluoróforo Alexa Fluor® de Molecular Probes con una  $\lambda$  de excitación de 488 y 555 nm durante 1 h, en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las secciones se lavaron 3 veces durante 5 min con PB 0.1M pH 7.4, se montaron en medio con glicerina CITIFLUOR (Citifluor Ltd; London, UK) y se sellaron con

esmalte. Para su correcto almacenamiento se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su visualización mediante microscopía óptica y/o confocal.

### *3.2.2.1 TINCIÓN DE NÚCLEOS*

En referencia al estudio sobre el cannabinoide HU210, con el fin de visualizar los núcleos de las células mediante microscopía electrónica confocal, se realizaron marcajes con yoduro de TO-PRO-3 (Molecular Probes) a una concentración de 1  $\mu$ M con el relativo anticuerpo secundario y se incubó durante una hora en oscuridad, en cámara húmeda y a temperatura ambiente. El proceso de preparación de las muestras para microscopio se describe en el apartado 3.2.2.

Por otro lado, se llevó a cabo también el marcaje de núcleos con Hoechst (Sigma, Milwaukee, WI) (dilución 1:10000), con el fin de cuantificar el grosor y el número de filas de fotorreceptores de la capa nuclear externa (ONL) con el microscopio óptico (Figura 24 y 25). Este compuesto produce una fluorescencia azul (emisión máxima a 460 nm) cuando se une al surco menor del DNA y se excita a una longitud de onda cercana a 350 nm. En este caso, el procedimiento de observación fue parecido al descrito en el apartado 3.2.2., matizando alguna diferencia. El medio utilizado para el reactivo de fluorescencia fue el VECTASHIELD. La observación de los núcleos marcados con Hoechst se llevó a cabo con microscopía óptica en nuestro laboratorio. El microscopio óptico de fluorescencia utilizado fue el Leica DMR (Wetzlar, Alemania), dotado de la fotocámara Leica DC500. El programa utilizado para la toma de fotos y almacenamiento fue Leica Image Manager 50 (escala 20X x 1.6X resolución 3900x3090, 36 fotos).

### *3.2.2.2 OBSERVACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIO CONFOCAL*

La preparación de las muestras se realizó como se ha descrito en el apartado 3.2.2., y se procedió a la observación microscópica. La fluorescencia de las muestras se detectó mediante un microscopio confocal espectral invertido Leica TCS SP2, equipado con 3 fuentes de láser: 1) láser azul de Ar, con una  $\lambda$  de excitación de 450-490 nm, utilizado para aquellas muestras en las que se emplearon anticuerpos secundarios marcados con el fluoróforo AF488 (Molecular Probes), el cual emitía fluorescencia a una  $\lambda$  de 515 nm (verde); 2) láser verde de He-Ne, con una  $\lambda$  de excitación de 515-560 nm, utilizado en los casos de anticuerpos secundarios marcados con AF555, los cuales emitían a una  $\lambda$  de 590 nm (rojo); y 3) láser rojo de He-Ne,

con una  $\lambda$  de excitación de 633 nm, utilizado en los casos en los que se empleó TO-PRO-3, el cual emite a una  $\lambda$  de 661 nm (rojo lejano, pseudocoloreado en azul en este trabajo). En los casos en los que se visualizaron dos o más fluoróforos sobre la misma muestra, éstos fueron excitados secuencialmente y no simultáneamente, para evitar interferencias entre los canales de emisión. Los objetivos utilizados fueron Leitz Plan-Apocromáticos. Dos de ellos eran secos, de 10× y 20×, y tres de inmersión en aceite mineral, de 40×, 63× y 100×. La platina del microscopio era galvanométrica de alta precisión y alta velocidad para controlar el eje Z. Las imágenes que posteriormente iban a ser comparadas entre sí se adquirieron sin alterar los parámetros de captura de imagen. Las fotografías obtenidas se almacenaron en formato TIFF y se procesaron mediante el programa Adobe CS4 Master Collection (Adobe) para su posterior análisis. En su caso, las imágenes se utilizaron para el análisis cualitativo y cuantitativo de datos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### *3.3. ELECTRORETINOGRAMAS (ERGs)*

#### *3.3.1 PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES PARA LOS ERGs*

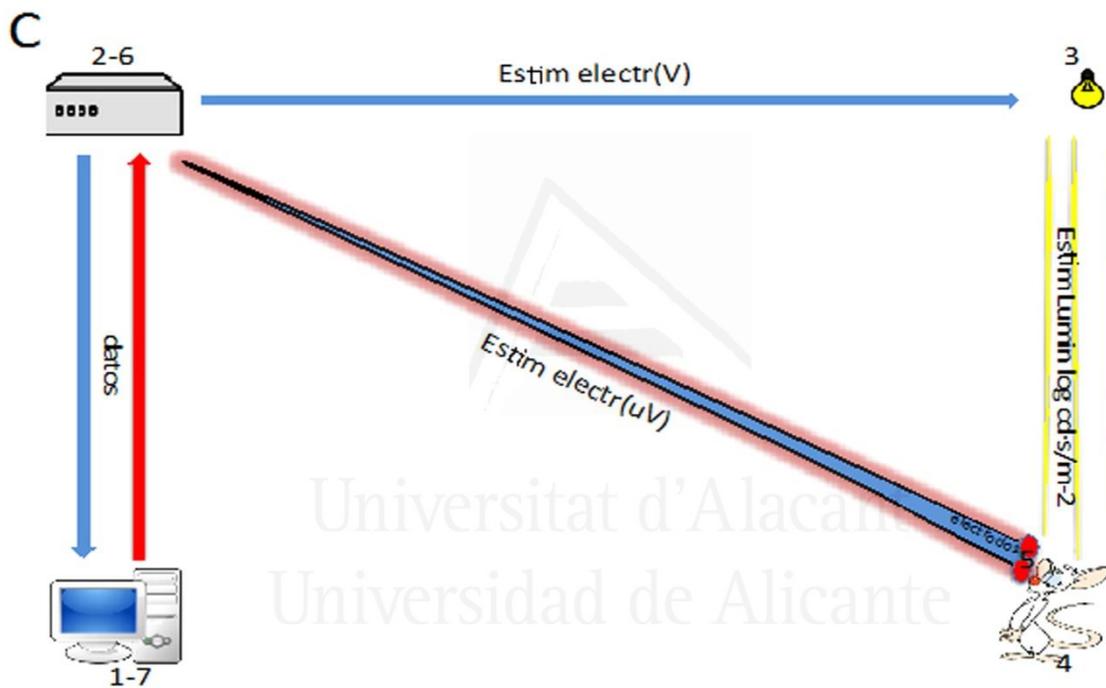
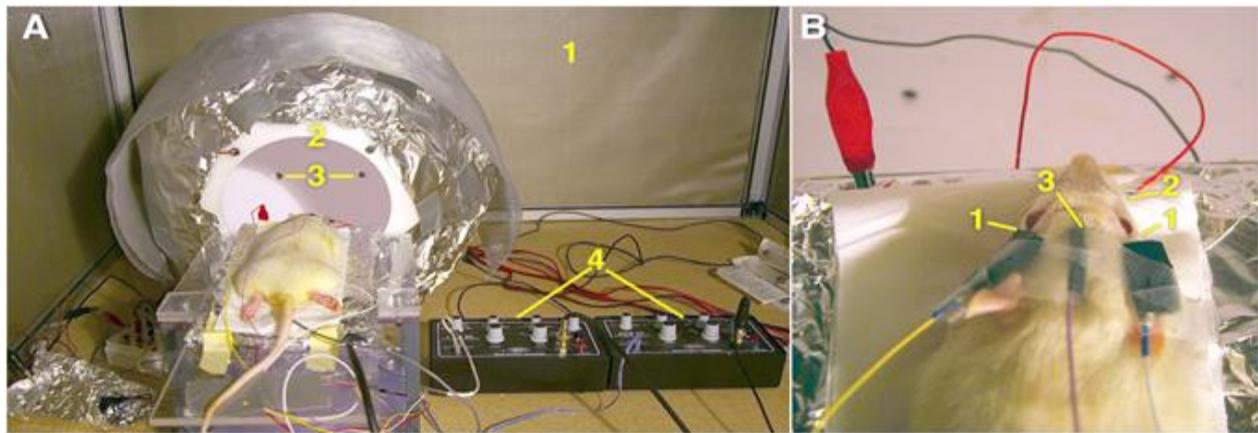
Previamente a poner en marcha el procedimiento de registro electroretinográfico, las ratas, en su propia jaula individual, fueron puestas en cubículos en total oscuridad durante una noche entera, aisladas de ruidos y con recirculación de aire, con el motivo de permitir una correcta adaptación a la oscuridad. El mismo proceso de preparación de los animales a los ERGs fue realizado para ambos estudios de esta tesis, el estudio con nicotina y con el cannabinoide HU210. La mañana siguiente, bajo una luz roja muy tenue, las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (4 mg/Kg). Una vez anestesiadas, inmediatamente antes de proceder a los registros se les dilataron las pupilas con la aplicación tópica del colirio midriático Colicusí (Alcon Cusí; El Masnou, Barcelona, España) con principio activo tropicamida (1%). Con el fin de minimizar la deshidratación y optimizar la transmisión eléctrica desde la córnea al electrodo de registro, se aplicó un gel Vicotears (Novartis, Barcelona, España) con principio activo ácido poli-acrílico carbomero (0.2%). El proceso de preparación de los animales anestesiados se realizó sobre una camita a medida, recubierta de aluminio y derivada a tierra, dotada de una manta homeotérmica con temperatura constante de 38 °C. El electrodo de referencia, consistente en una aguja de platino subdérmica, se colocó en la línea media del cráneo, a la altura de las orejas. Los electrodos de registro se situaron en el centro de la córnea de cada ojo de la rata. Este paso resulta ser crucial a la hora de obtener un registro limpio (sin ruido eléctrico) y fiable. Los electrodos de registro eran DTL X-Static de nylon recubierto de plata (Squoit Industries, Stanton PA) conectados con los aparatos descritos en el apartado 3.3.2.

#### *3.3.2 REGISTROS ELECTRORETINOGRÁFICOS*

Los ERGs se realizaron a partir de las 24 h sucesivas a la última administración del tratamiento en el estudio con HU210, mientras que en el estudio con nicotina la administración no se interrumpió, siendo integrada en la hidratación diaria del animal. Todos los registros electroretinográficos fueron bilaterales, o sea se obtuvieron registros de ambos ojos. En el estudio referente a HU210 se realizaron registros a P30, P60 y P90. En el

estudio referente a la nicotina se realizaron registros a P30 y P120. Para ambos estudios se decidió realizar solo registros escotópicos en total oscuridad.

El dispositivo para la realización de los registros de ERGs se componía de una cámara o globo “ganzfeld” con 24 diodos electroluminiscentes de luz blanca, distribuidos uniformemente con la función de inducir las respuestas electroretinográficas (Figura 21). Con el fin de minimizar ruidos eléctricos ambientales, la cámara “ganzfeld” estaba situada en una jaula de Faraday. Los ERGs obtenidos se amplificaron y se filtraron entre 1-1000 Hz, mediante 2 amplificadores marca World Precision Instruments (Aston, UK) modelo DAM 50, se digitalizaron a 4 kHz, mediante un sistema Power Lab 4/20T marca ADInstruments (Oxfordshire, UK), y fueron monitorizados en tiempo real a través de un ordenador PC 300GL marca IBM (Armonk, USA). Se registraron las respuestas escotópicas promediadas de 3 a 10 impulsos lumínicos simples a estímulos de 10 ms para cada una de las 11 intensidades lumínicas aplicadas de forma creciente desde -5.2 hasta 0 log cd·s/m<sup>2</sup>. Los estímulos lumínicos se emitieron en intervalos de 10 s para los estímulos de menor intensidad, entre -5.2 hasta -1.4 log cd·s/m<sup>2</sup>. Con el fin de minimizar la desensibilización de los fotorreceptores, sobretudo de los bastones, los estímulos lumínicos de mayor intensidad, entre 0.8 hasta 0 log cd·s/m<sup>2</sup> se emitieron con intervalos de 20 s. Los registros se analizaron offline y los resultados obtenidos en los registros se cuantificaron y evaluaron estadísticamente.



**Figura 21.** Imágenes y esquema de registro de ERG

A) Dispositivo para la emisión de estímulos y el registro de respuestas visuales. 1, jaula de Faraday; 2, cámara de ganzfeld, 3, diodos electroluminiscentes de luz blanca; 4, amplificadores. B) Electrodo aplicados sobre el animal: 1, electrodos de registro DTL; 2, electrodo de tierra de oro; 3, electrodo de referencia de platino. C) Esquema circuito de los electrretinogramas: 1, el PC activa el protocolo de registro; 2, el alimentador suministra la señal eléctrica a los diodos; 3, Los diodos emiten el estímulo lumínico; 4, La rata recibe y transforma el estímulo lumínico en estímulo eléctrico (fototransducción); 5, Los electrodos detectan el estímulo eléctrico y lo transmiten a los amplificadores; 6, Los amplificadores filtran y el sistema power lab digitaliza el estímulo; 7, el PC almacena los datos digitalizados.

### 3.4. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Con el fin de determinar si el tratamiento crónico de los animales P23H con HU210 afecta o no la activi

dad motora respecto a los animales P23H tratados con vehículo, se registró la actividad de cada animal durante los últimos 7 días de tratamiento. No se registró la actividad motora en la investigación con nicotina.

Para el registro, se colocó en cada jaula un sensor eléctrico de rayos infrarrojos (OMROM E3S-AD62; OMROM Corporation, Kioto, Japón), sensible a la deambulación del animal en la jaula (Figura 22 y 23). Las fotocélulas se colocaron a unos 5 cm de altura, en el lateral de la jaula, justo donde se localiza el comedero. Cuando una rata cruzaba el haz de luz infrarroja, se contabilizaba un evento, y los datos quedaban registrados en el ordenador. Los valores de actividad global de las ratas se expresaron como número de eventos/intervalo de 10 min. Los resultados obtenidos se procesaron para su evaluación estadística.



**Figura 22.** Jaula individual con fotosensor eléctrico (fotocélula) de rayos infrarrojos



**Figura 23.** Jaulas con fotocélulas durante el registro de la actividad locomotora

### *3.5. MEDIDAS DE INGESTA, HIDRATACIÓN Y PESO CORPORAL*

Con el fin de determinar si la administración del compuesto cannabinoide HU210 influye en el apetito, la hidratación y la regulación del peso corporal, durante todo el tratamiento, de P24 a P90, se registraron, en cada uno de los animales, los valores de peso corporal y cantidad de alimento y agua ingerida. Estos datos no fueron recogidos en referencia al estudio con nicotina. La ingesta de alimento se evaluó cada 2 semanas (14 días), pesando la comida del comedero de cada animal con un intervalo de 3 días, que coincidieron con los días de administración del tratamiento. El mismo procedimiento se realizó para valorar el consumo de agua, con la diferencia que se pesaban los biberones. El peso de las ratas fue registrado al inicio del estudio (P24), y actualizado 3 veces por semana, correspondientes a los días de administración del tratamiento. Los pesos de los animales, comida y agua fueron medidos con una balanza electrónica modelo PB1501 S (Mettler Toledo, Zirich, Switzerland).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### *3.6. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS*

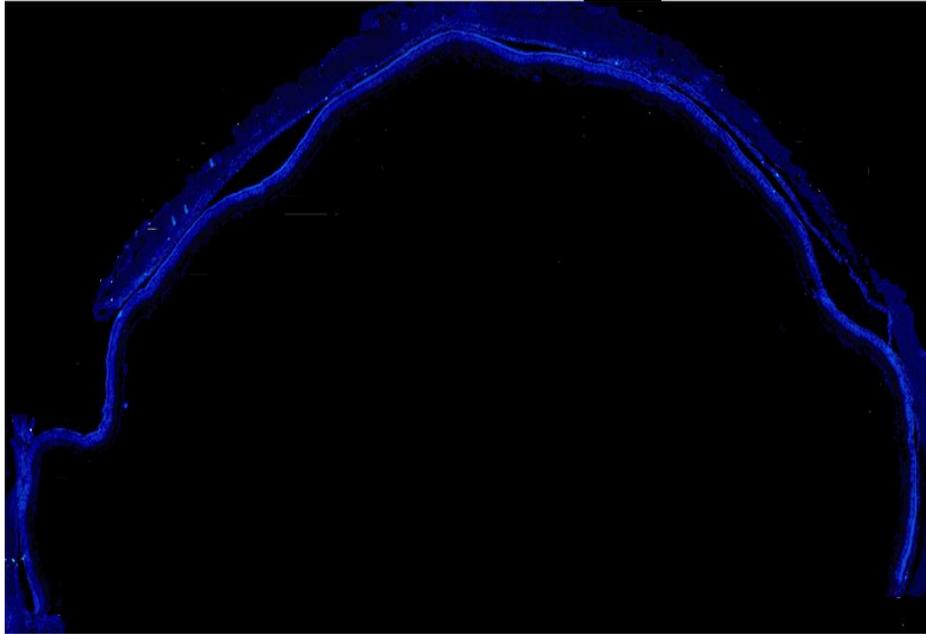
#### *3.6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO*

##### *3.6.1.1 MEDICIÓN DEL ESPESOR DE LAS CAPAS Y DEL NÚMERO DE FILAS DE FOTORECEPTORES*

Se midió el espesor de la ONL y se contabilizó el número de filas de fotorreceptores en secciones de retina de 5 animales P23H tratados con vehículo y 5 tratados con HU210 (Figura 24). Con el fin de reducir los errores de medida, se analizaron y promediaron 4 secciones de retina de cada animal. Las imágenes utilizadas para el análisis se obtuvieron con un microscopio óptico Leica DMR dotado de fotocámara, y se procesaron digitalmente mediante el programa Adobe CS4 Master Collection (Adobe) para su posterior análisis. El número de filas de fotorreceptores se midió en cada corte cada 0.5 mm, empezando por la zona del nervio óptico hacía la ora serrata de cada hemirretina nasal y temporal, con un total de 18 puntos de medida por cada retina (Figura 25). En cada punto de medida se promediaron los valores de 3 medidas repetidas. Con el fin de medir el espesor de la ONL, las imágenes de cada retina se analizaron mediante el programa ImageJ 1.46r (<http://imagej.nih.gov/ij>, W. Rasband, NYH, USA). Las mediciones fueron realizadas con doble ciego para evitar sesgo de medida.

##### *3.6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS CONOS*

Para evaluar el estado de preservación de los conos en secciones de retina, se midió la longitud de estas células en secciones de retina de 5 animales P23H no tratados y 5 animales tratados con HU210, marcados con anticuerpos para  $\gamma$ -transducina. La medición se realizó mediante el programa ImageJ 1.46r. Se midió la longitud de al menos 5 conos en cada animal, a partir de imágenes tomadas de la zona central de la retina, cerca del nervio óptico. Se promediaron los valores de longitud obtenidos para cada animal, y se contrastaron estadísticamente las diferencias entre los dos grupos (P23H no tratado y tratado con HU210) mediante el test estadístico *t*-Student.



**Figura 24.** Imagen de microscopía óptica de fluorescencia de hemiretina

Imagen de microscopía óptica de una hemiretina de una rata P23H marcada con Hoechts, para evidenciar los núcleos de los fotorreceptores en la ONL.



**Figura 25.** Imagen de microscopía óptica de fluorescencia

Imagen en detalle de una retina de rata P23H con tinción Hoechst. Las flechas amarillas indican la capa de la ONL con los núcleos de los fotorreceptores marcados en azul brillante.

### 3.6.1.3 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD

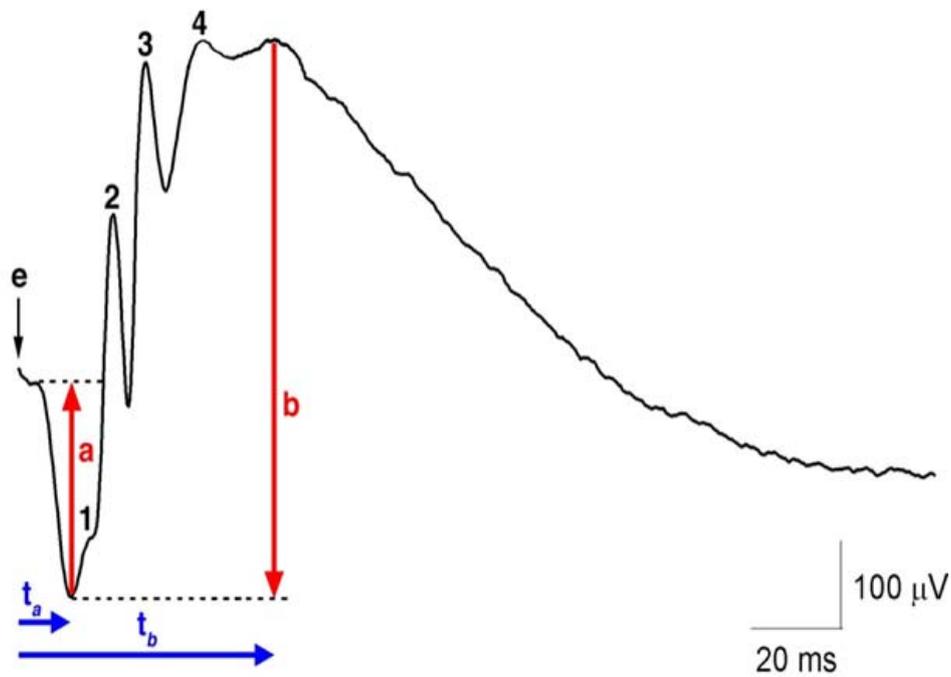
Para cuantificar la integridad de las células bipolares, se cuantificaron los niveles de inmunoreactividad para PKC- $\alpha$  en secciones de retina mediante el programa ImageJ 1.46r (W. Rasband, NYH, USA). Se utilizaron las secciones de la retina de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y 5 ratas tratadas con HU210. Para ello, se convirtieron las imágenes a escala de grises en un rango de 0-255 de forma automática a 8 bit, obteniéndose imágenes equivalentes a las originales, pero con diferentes tonalidades de gris: del negro (nivel 0) al blanco (nivel 255). Se obtuvo el perfil de inmunorreactividad de cada fotografía, se identificaron los picos de intensidad correspondientes a las capas de interés de la retina, y se calcularon las áreas de dichos picos. Se cuantificó la inmunorreactividad para la PKC- $\alpha$  a partir de un mínimo de 3 cortes no consecutivos de la retina de cada animal tratado con vehículo o tratado con HU210. Se promediaron los valores de inmunorreactividad obtenidos para cada animal, y se contrastaron estadísticamente las diferencias en los niveles de inmunorreactividad entre los dos grupos (tratado con vehículo y tratado con HU210). Para comprobar la preservación de los terminales pre-sinápticos, utilizamos anticuerpos contra sinaptofisina, una glicoproteína presente en las vesículas presinápticas. Se realizó el proceso de medición del área ( $\mu\text{m}^2$ ) de la OPL marcada con sinaptofisina, respecto de la longitud de cada retina analizada (mm), mediante el programa ImageJ (W. Rasband, NYH, USA). Se promediaron los valores obtenidos en cada animal (mínimo de 3 cortes no consecutivos analizados por animal), y se contrastaron estadísticamente las diferencias en término de área entre los dos grupos (tratado con vehículo y tratado con HU210). El número medio de terminales sinápticas en la OPL fue cuantificado mediante el recuento del número de cintillas sinápticas marcadas con anticuerpos contra Bassoon, una proteína específica de las cintillas sinápticas. Se postula que Bassoon es una de las proteínas esenciales para el buen funcionamiento de las cintillas sinápticas en la retina de las ratas (Dick, tom Dieck et al. 2003). Se cuantificaron los niveles de inmunoreactividad en 5 animales tratados con vehículo y 5 animales tratados con HU210. El recuento de las cintillas se realizó sobre 2 secciones no consecutivas de retina de cada animal y el recuento se hizo en la zona del nervio óptico y en zonas respectivamente a 2 y 4 mm del nervio óptico hacía las oras serratas (temporales y nasales). El recuento se realizó mediante el programa Adobe CS4 Master Collection (Adobe). Se promediaron los valores obtenidos de cada animal y se contrastaron estadísticamente las diferencias entre los dos grupos (tratado con vehículo y tratado con HU210) mediante el test estadístico *t* de Student.

### 3.7. ANÁLISIS DE LOS ELECTRORETINOGRAMAS (ERGs)

#### 3.7.1 CURVA DOSIS-RESPUESTA

Se analizaron los datos brutos obtenidos a partir de los registros electroretinográficos de ratas P23H tratadas con vehículo y tratadas con HU210 o nicotina mediante el programa Scope v.3.8.5 (ADInstruments; Oxfordshire, Reino Unido). Se midió la amplitud de las ondas *a* y *b* para cada respuesta registrada a las diferentes intensidades de estímulo aplicadas en condiciones escotópicas. La amplitud de la onda *a* se midió desde la línea base del registro hasta el pico inferior de la misma, y la amplitud de la onda *b* se midió desde el pico inferior de la onda *a* hasta el pico máximo de la onda *b* (Figura 26).

Para cada intensidad de estímulo, se promediaron las amplitudes de las ondas *a* o *b* de los animales P23H tratados con vehículo por una parte y de los animales tratados con sustancia experimental por otra. La significancia de las diferencias entre animales tratados con vehículo y tratados con sustancia experimental se evaluó mediante el test *t* de Student. Los valores promediados de la amplitud de la respuesta ( $\mu\text{V}$ ) se representaron gráficamente en función de la luminancia ( $\log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ). También se determinó la latencia media (también denominado: tiempo implícito) de la onda *a* y *b*. Para ello, se midió el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y la aparición del pico máximo de la onda respectiva (Figura 26). Además, se determinó el umbral de sensibilidad, definido como el estímulo lumínico mínimo requerido por obtener la respuesta de  $10\mu\text{V}$ , calculado a partir de la curva de luminancia-respuesta.



**Figura 26.** Medición de la amplitud de las ondas a y b en los ERGs

Se muestra un registro ERG representativo de una rata Sprague-Dawley, obtenido en condiciones escotópicas. Abreviaturas: e, estímulo luminoso; a - b, amplitudes de las ondas a y b, respectivamente;  $t_a$  y  $t_b$ , tiempos implícitos de las ondas a y b, respectivamente; 1-4, picos de potenciales oscilatorios. Cortesía de Julián Esteve Rudd, Tesis doctoral "Alteraciones moleculares y celulares en la retina de animales modelo de la enfermedad de Parkinson".

Universitat d'Alacant  
 Universidad de Alicante

### 3.8. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Los valores de actividad locomotora se expresaron como número de eventos / intervalo de 10 min. Los datos correspondientes a la semana de registro se procesaron mediante el programa Microsoft® Excel® versión 14.0.0. Se promediaron los valores obtenidos para cada animal, y se contrastaron estadísticamente las diferencias entre los dos grupos (P23H tratado con vehículo y P23H tratado con HU210) mediante el test estadístico *t* de Student.

#### 3.8.1 ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE HU210 SOBRE EL APETITO, LA INGESTA DE AGUA Y EL PESO CORPORAL.

La ingesta de alimento, la ingesta de agua y el peso corporal de los animales objeto de la investigación fueron procesados mediante el programa Microsoft® Excel® versión 14.0.0. Se promediaron los valores obtenidos para cada animal, y se contrastaron estadísticamente las diferencias entre los dos grupos (P23H tratado con vehículo y P23H tratado con HU210) mediante el test estadístico *t* de Student. Los valores de crecimiento, ingesta de alimento e ingesta de agua se expresaron como gr/día y gr/Kg/día.

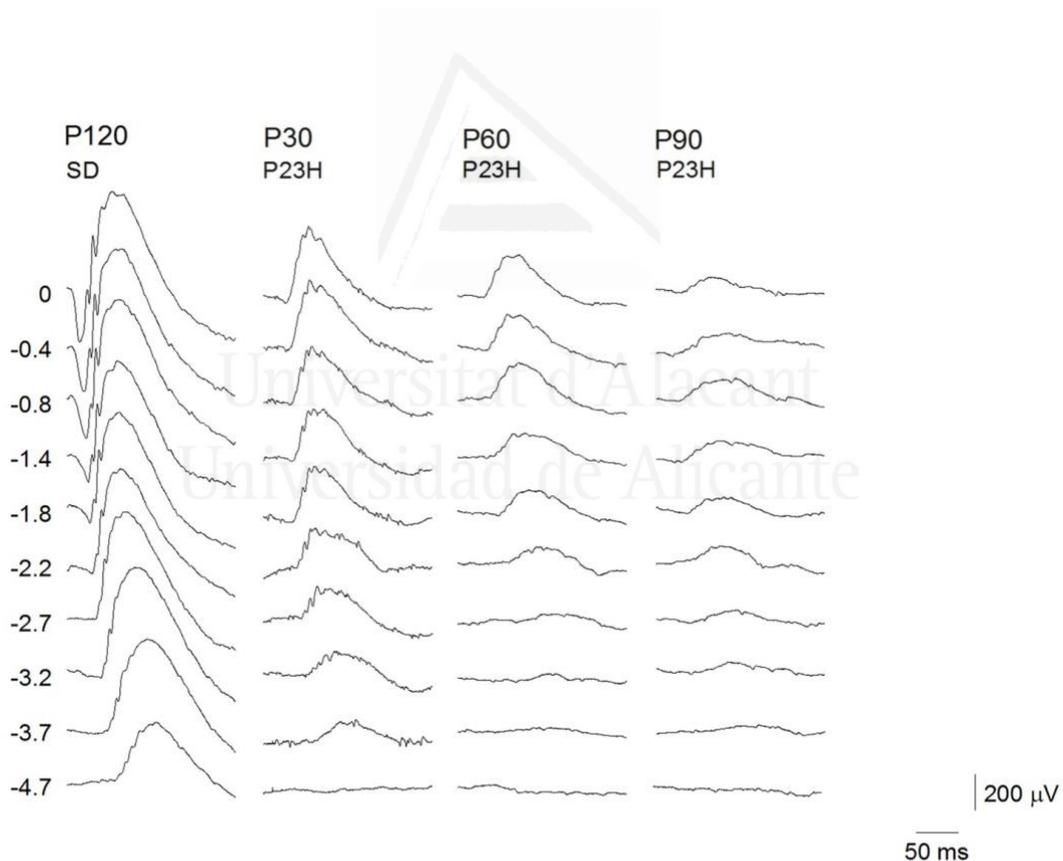
### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos de carácter numérico se procesaron mediante el programa Microsoft Excel® versión 14.0.0. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). Los resultados de los ERGs se compararon mediante un análisis multifactorial de la varianza o MANOVA (por su nombre en inglés, *Multivariate analysis of variance*). Se contrastaron las diferencias entre los resultados obtenidos por cada tratamiento mediante análisis comparativo post hoc-test de Bonferroni, según necesidades estadísticas, con un intervalo de confianza de 0.95. La diferencia entre tratamientos se estimó significativa cuando  $p \leq 0.05$ , considerándose como hipótesis nula que las diferencias observadas se debieran al azar. Los parámetros morfométricos obtenidos los comparamos con el test estadístico no paramétrico *t* de Student con un intervalo de confianza de 0.95. La diferencia entre tratamientos se estimó significativa cuando  $p \leq 0.05$ , considerándose como hipótesis nula que las diferencias observadas se debieran al azar. En las gráficas se representa la media aritmética, y los segmentos verticales corresponden al error estándar de la media (EEM).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CAMBIOS EN LA RESPUESTA VISUAL DE LAS RATAS P23H

Para los experimentos llevados a cabo en este estudio se ha utilizado el modelo de ratas albinas transgénicas P23H línea 3, cuya retina degenera de forma similar a la de los pacientes de RP con esta mutación. El desarrollo de la degeneración se ha analizado en animales tratados con vehículo entre las edades P24 y P90. Se obtuvieron los registros ERGs de 5 ratas P23H en condiciones escotópicas a las edades P30, P60 y P90 (Figura 27). Los resultados obtenidos se compararon con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en ratas SD de 120 días de edad (Figura 27) (Esteve-Rudd, Fernandez-Sanchez et al. 2011). Las ratas SD no muestran cambios significativos en la amplitud y/o morfología de los ERG, a edades comprendidas entre P30 y P120.



**Figura 27.** Electrorretinogramas de ratas SD y P23H

El panel muestra registros electroretinográficos representativos en condiciones escotópicas de una rata control SD registrada a P120 y de una rata P23H registrada a P30, P60 y P90. A la izquierda del gráfico se indica la intensidad del estímulo en log cd s m<sup>-2</sup>.

En los ERGs realizados en las ratas P23H se observó una caída progresiva dependiente de la edad en la amplitud de las ondas *a* y *b* escotópicas registradas (P30 > P60 > P90; ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.001$  en todos los casos) (Figura 27, Tabla 4). Los valores obtenidos resultaron menores que los observados en ratas SD de 120 días de edad (onda *a*:  $245.1 \pm 9.9 \mu\text{V}$ , onda *b*:  $584.1 \pm 22.8 \mu\text{V}$ ). La ratio entre onda *b* y *a* aumentó progresivamente con la edad del animal en las ratas P23H (P30 < P60 < P90; ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.001$  en todos los casos) (Tabla 4). Los valores obtenidos resultaron mayores que los observados en ratas SD de 120 días de edad (ratio *b/a* 2.38).

ERG	Escotópico			Escotópico		
	<i>a</i>			<i>b</i>		
Onda						
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
P23H	$36 \pm 5.3$	$12.4 \pm 1.1$	$6.9 \pm 1.9$	$371.2 \pm 19.5$	$205.1 \pm 15.3$	$77.5 \pm 9.6$
Ratio <i>b/a</i>				$12.03 \pm 1.49$	$17.63 \pm 2.43$	$20.56 \pm 5.4$

**Tabla 4.** Amplitud máxima promediada de las ondas *a* y *b* de ratas P23H a diferentes edades.

*Se indica la amplitud máxima  $\pm$  EEM ( $\mu\text{V}$ ) promediada de las ondas *a* y *b* de 5 ratas P23H en condiciones escotópicas y la ratio *b/a*.*

La onda *a* refleja la actividad de los fotorreceptores, mientras la onda *b* tiene un origen postsináptico a los fotorreceptores, se relaciona con la retina interna y la interacción entre los componentes neuronales secundarios como bipolares, amacrinas, horizontales, etc. En condiciones escotópicas, los ERG reflejan la actividad tanto de los bastones como de los conos.

Dado que los fotorreceptores de la retina de las ratas son mayoritariamente bastones, podemos deducir que, con el avance de la edad, está degenerando una población importante de estos fotorreceptores. El aumento progresivo en la ratio  $b/a$  indica que la degeneración afecta de forma más marcada a la retina externa que a la interna. Anteriores estudios demuestran que a partir de tempranas edades la pérdida de fotorreceptores en ratas P23H es considerable y es detectable a través de los ERGs (Machida, Kondo et al. 2000b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a).

El umbral de sensibilidad de la onda  $a$  y  $b$  en los animales P23H aumentaron progresivamente con la edad: P30 < P60 y P30 < P90 (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.05$  en todos los casos) (Tabla 5). Esto implica que, a mayor edad, se necesitan estímulos de mayor intensidad para producir la misma respuesta.

ERG	Escotópico			Escotópico		
Onda	$a$			$b$		
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
P23H	$-2.08 \pm 0.13$	$-0.85 \pm 0.25$	$-0.25 \pm 0.16$	$-5 \pm 0.9$	$-4.3 \pm 0.2$	$-4.9 \pm 0.3$

**Tabla 5.** *Umbrales de sensibilidad de las onda  $a$  y  $b$  escotópicas máximas registradas a diferentes edades de ratas P23H.*

*Se indica el umbral de sensibilidad  $\pm$  EEM ( $\log \text{cd s m}^{-2}$ ) promedio de las ondas  $a$  y  $b$  máximas registradas de 5 ratas P23H. Se puede notar cómo el umbral de sensibilidad aumenta con el avance de la edad.*

Asimismo, se observó un aumento progresivo en el tiempo implícito (también llamado latencia media) en las ratas P23H (Tabla 6). Los valores obtenidos resultaron mayores que los observados en las ondas  $a$  y  $b$  de ratas SD de 120 días de edad ( $11.9 \pm 0.2$  ms y  $58.4 \pm 1.0$  ms, respectivamente).

ERG	Escotópico			Escotópico		
Onda	<i>a</i>			<i>b</i>		
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
<b>P23H</b>	24.5 ± 0.4	29.9 ± 1.3	29.7 ± 2.1	57.6 ± 1.3	66.4 ± 1.2	71.9 ± 3.2

**Tabla 6.** *Tiempo implícito (ms) de las ondas a y b escotópicas máximas registradas a diferentes edades en ratas P23H.*

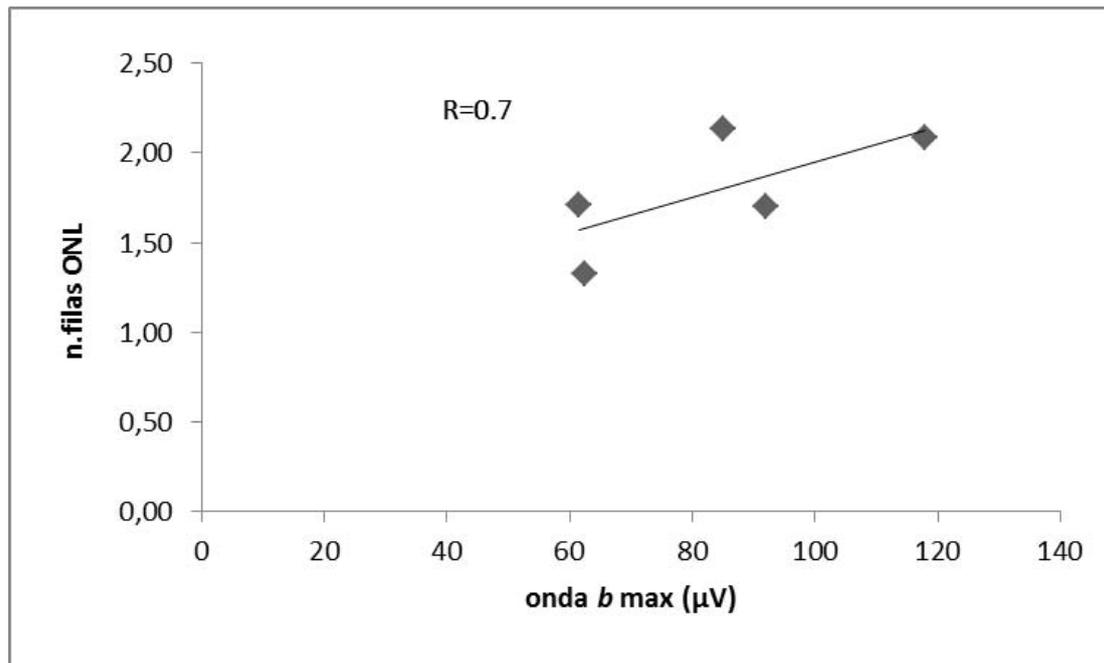
*Se indica el tiempo implícito ± EEM (ms) promedio de las ondas a y b máximas registradas de 5 ratas P23H. Se puede notar cómo el tiempo implícito aumenta con el avance de la edad.*

#### 4.2. ALTERACIONES CELULARES EN LAS RATAS P23H

Dado que los resultados observados con los ERGs de las ratas P23H mostraron la pérdida de respuesta visual, y esto podría indicar la pérdida fotorreceptores y alteraciones en la retina interna, quisimos comprobar la estructura de las capas y poblaciones celulares retinianas, mediante el marcaje de cortes de retina, y posterior observación con microscopía confocal. Los resultados obtenidos se compararon con los de ratas SD de la misma edad.

Cuantificamos el número de filas de fotorreceptores a P90 en cortes verticales de retina de 5 ratas P23H tratadas con vehículo. Pudimos observar que las ratas P23H sufrían una reducción en el espesor de la ONL en todas las zonas de la retina estudiadas, en relación con lo observado en ratas SD. La ONL mostraba pocas filas de fotorreceptores. Encontramos los signos típicos del proceso degenerativo, en particular en las zonas periféricas de la retina, hacia la ora serrata, donde encontramos incluso zonas desprovistas de fotorreceptores. A P90 el número medio de filas de fotorreceptores en las ratas P23H fue de  $1.8 \pm 0.2$ . Normalmente, una rata SD a esta edad cuenta con una media de 10-12 filas de fotorreceptores en la ONL.

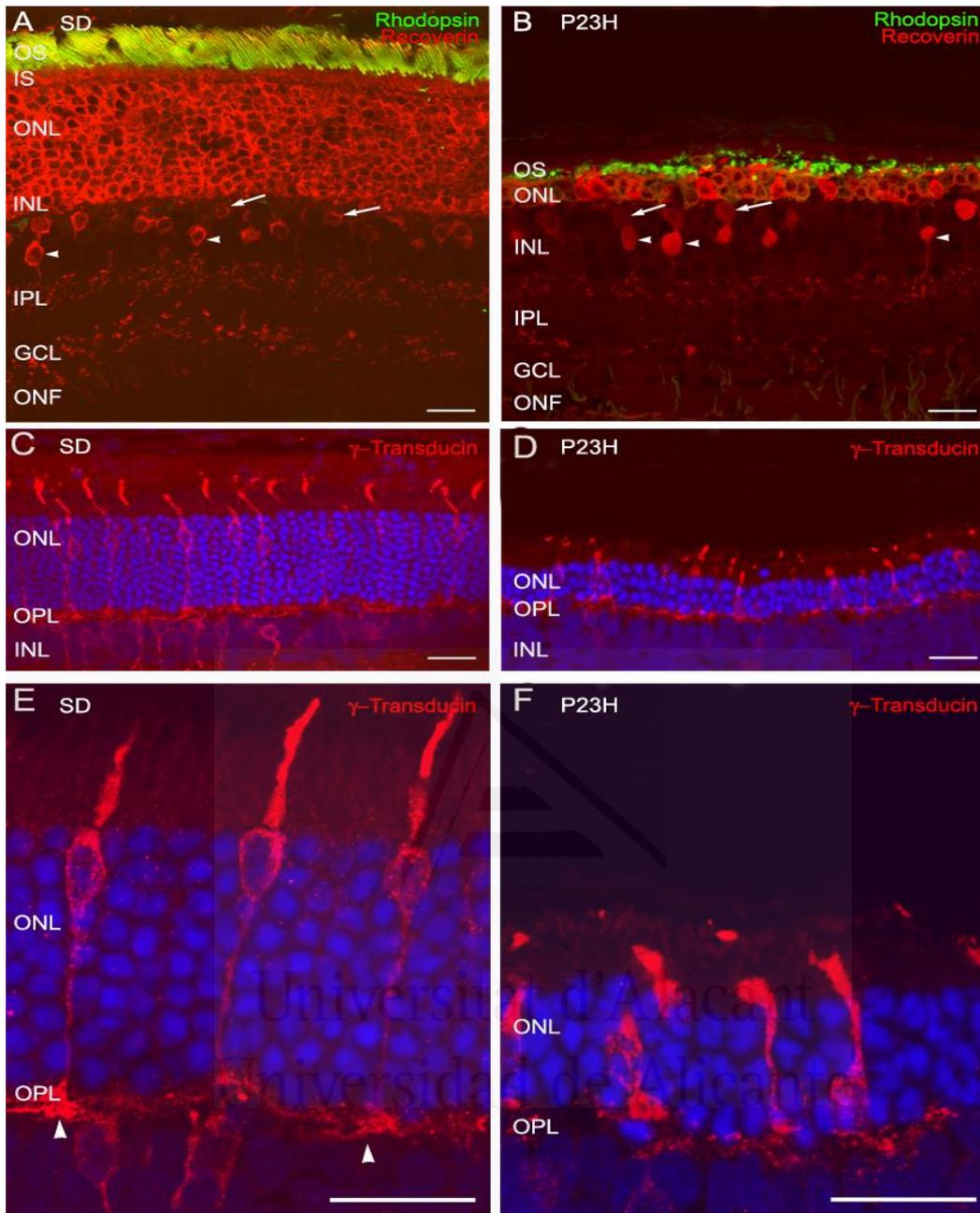
Posteriormente, se procedió a evaluar la posible correlación entre la amplitud de la onda *b* y el número de filas de fotorreceptores en la ONL. Para ello, se analizó la correlación, para cada rata P23H tratada con vehículo, entre el número de filas de fotorreceptores de la ONL y a la amplitud máxima registrada para la onda *b*. Anteriores estudios han demostrado la proporcionalidad entre el número de filas de la ONL y la amplitud onda *a* y *b* (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b). En nuestros resultados, el número de filas de fotorreceptores se correlaciona positivamente con la máxima amplitud de las ondas *b* obtenidas por los ERGs de cada animal a P90 (coeficiente de Pearson R,  $p < 0.01$ ,  $R = 0.70$ ) (Figura 28).



**Figura 28.** Correlación entre el número de filas y la amplitud de las ondas *b* escotópicas máximas en la retina de ratas P23H.

La correlación se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson *R*,  $p < 0.01$ .

Así, los animales P23H tratados con vehículo cuyas ondas *b* escotópicas mostraban una amplitud máxima menor eran también aquellas cuyo número de filas de la ONL era menor. Asimismo, las ratas tratadas cuyos valores de onda *b* escotópicas eran máximos también correspondían a aquellas cuyo número de filas de la ONL en la retina era mayor. Estos datos concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Machida, Kondo et al. 2000b, Garcia-Ayuso, Ortin-Martinez et al. 2013, Fernandez-Sanchez, de Sevilla Muller et al. 2014), e indican que la mutación P23H conlleva la degeneración de la ONL desde las primeras semanas de vida. Vistos los resultados funcionales y de análisis del número de filas fotorreceptores, quisimos evaluar el estado morfológico de los fotorreceptores supervivientes. Con este fin marcamos el tejido con anticuerpos contra recoverina, el cual es un marcador para conos, bastones y algunas células bipolares. Los bastones los marcamos con anticuerpos para la rodopsina. Los anticuerpos para  $\gamma$ -transducina permitieron el marcaje de conos y células bipolares de conos (Figura 29.) (Pinilla, Cuenca et al. 2007, Cuenca, Pinilla et al. 2004).

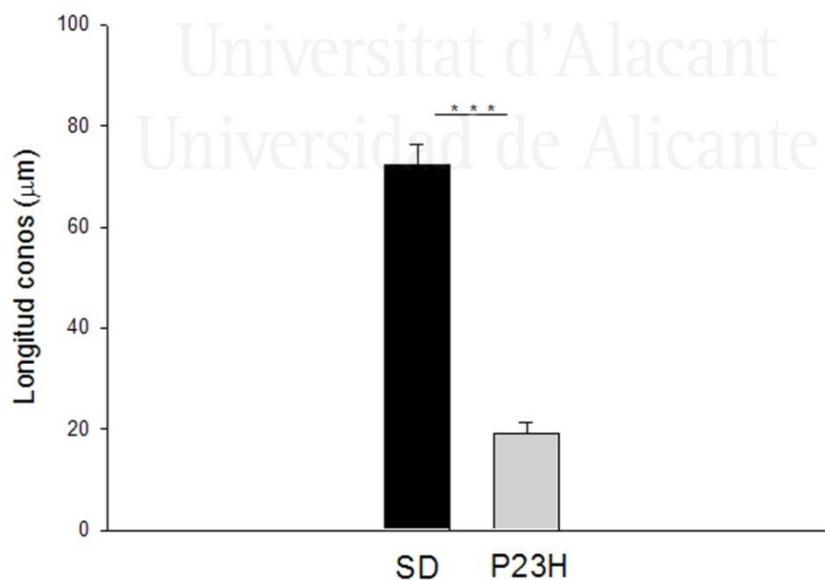


**Figura 29.** Morfología de la retina de ratas SD y P23H

Se muestran secciones verticales a P90 de retinas de ratas SD (A, C, E) y P23H (B, D, F). (A, B) Conos y bastones marcados con recoverina (rojo) y segmentos externos de bastones marcados con rodopsina (verde) de una rata SD (A) y una P23H (B). Se aprecia el avanzado estado de degeneración de la retina de la rata P23H (B) en comparación con la retina de la rata SD (A). El inmunomarcaje con recoverina muestra también algunas células bipolares ON tipo 2 y tipo 8 (flechas y puntas de flecha, respectivamente). El inmunomarcaje con  $\gamma$ -transducina, muestra las células tipo cono, se aprecia el segmento externo más corto e irregular en las ratas P23H en comparación con las ratas SD. Los núcleos están marcados con TO-PRO-3. Las imágenes E y F muestran magnificaciones de C y D, respectivamente, mostrando el estado de los segmentos externos e internos, la estructura axónica y los pedículos de los conos (puntas de flecha). Todas las imágenes son de retina central tomadas cerca del nervio óptico. OS, segmento externo; IS, segmento interno; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa, INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa células ganglionares; ONF, fibras del nervio óptico. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

Todos estos innumarables mostraron en las ratas P23H un reducido número de fotorreceptores, los cuales eran morfológicamente irregulares y mal orientados. Se apreció la desestructuración de la ONL de la retina. La morfología típica de los conos, visible en las imágenes de las SD, muestra un axón con estructura pedicular terminal. En el grupo de ratas P23H tratadas con vehículo los segmentos externos de los conos se mostraban pequeños, cortos y morfológicamente irregulares y protuberantes. Pudimos observar que los axones estaban ausentes y las estructuras pediculares de los conos salían directamente del cuerpo celular. Este resultado confirma la bibliografía existente sobre el estado de los conos en estado avanzado de degeneración de la retina en roedores (Lin, Masland et al. 2009). Es conocido que la degeneración de los conos en la RP normalmente ocurre posteriormente a la de los bastones (Chrysostomou, Valter et al. 2009, Chrysostomou, Stone et al. 2009).

Para poder cuantificar la conservación de los conos medimos en la zona central de la retina la longitud de las células marcadas para  $\gamma$ -transducina de las ratas P23H y las comparamos con las mediciones de las células tipo cono de las ratas SD. La longitud media de los conos de ratas SD resultó ser 72.38  $\mu\text{m}$ , frente a los 19.13  $\mu\text{m}$  de las P23H (test *t de Student*,  $p < 0.001$ ) (Figura 30).

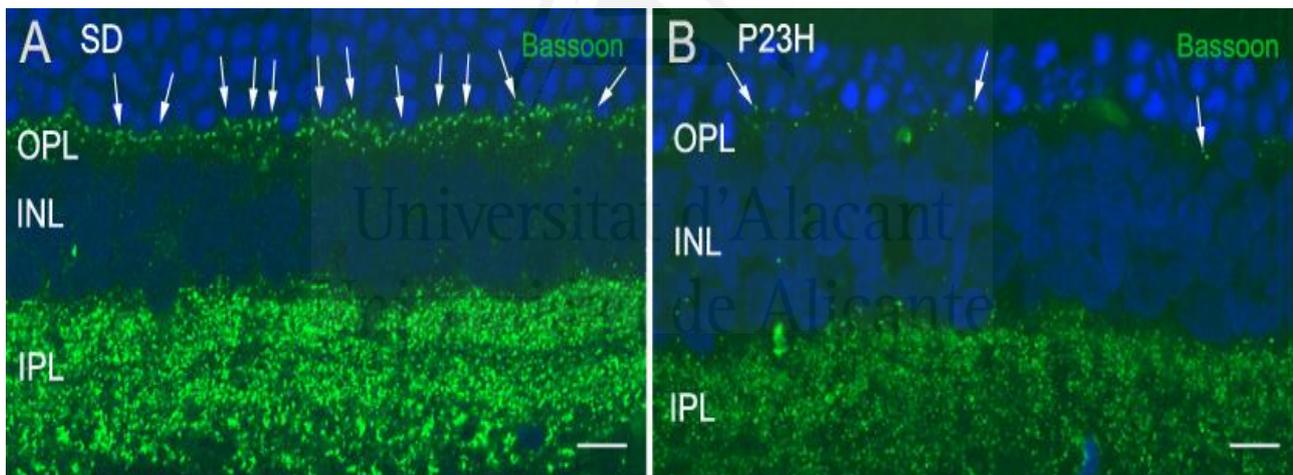


**Figura 30.** Longitud de los conos de ratas SD y P23H

Longitud media de los fotorreceptores tipo cono en la zona central de la retina, cerca del nervio óptico, de 5 ratas SD y 5 ratas P23H. \*\*\*Test *t de Student*,  $p < 0.001$ .

#### 4.2.1 ALTERACIONES LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS BIPOLARES Y HORIZONTALES EN LAS RATAS P23H.

Dado el estado de degeneración de conos y bastones, quisimos comprobar si los fotorreceptores supervivientes preservaban la conectividad sináptica en la OPL. Con este fin utilizamos un anticuerpo contra Bassoon, utilizado en anteriores investigaciones de nuestro grupo (Cuenca, Pinilla et al. 2004). En la retina de los vertebrados se ha encontrado una intensa inmunorreactividad a Bassoon en ambas capas plexiformes (Brandstatter, Fletcher et al. 1999). En la OPL el Bassoon se localiza en las sinapsis “en cinta”, formadas por conos o bastones y las neuronas secundarias (Cuenca, Pinilla et al. 2004). En las ratas P23H se apreció una menor densidad de contactos sinápticos marcados con Bassoon, en comparación a lo observado en ratas SD (Figura 31.). En las ratas P23H, la distribución de las sinapsis marcadas es irregular y desorganizada, incluso se apreciaron zonas de la retina, sobre todo periféricas, que carecían de sinapsis.

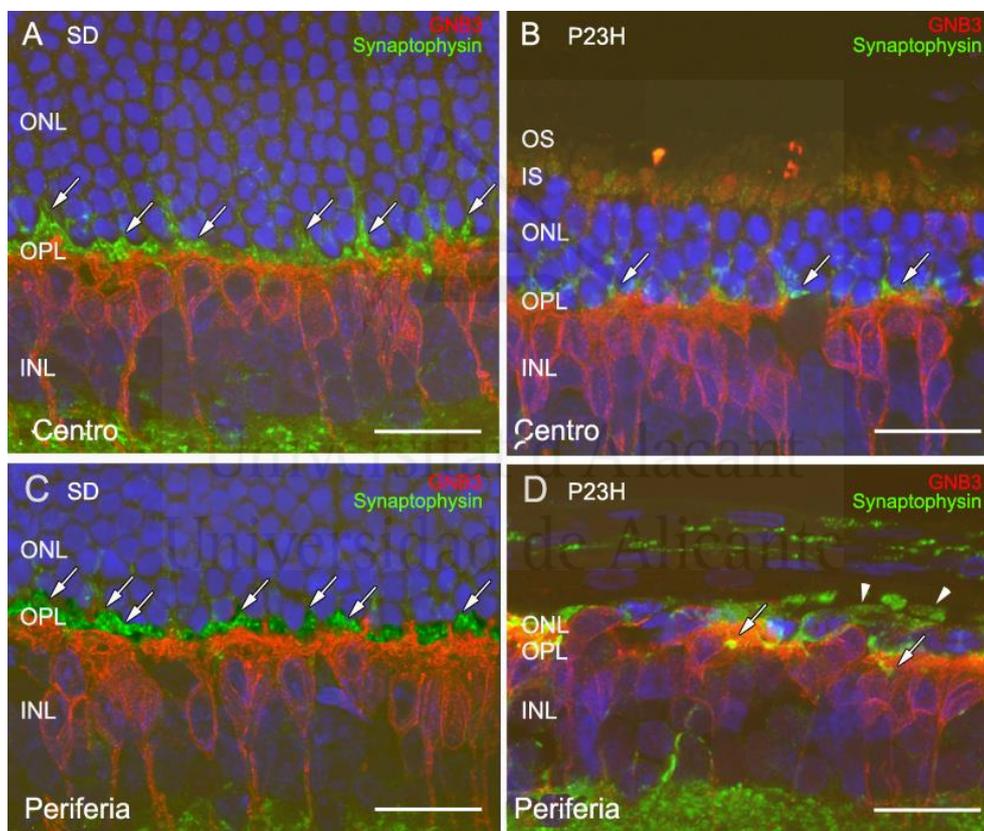


**Figura 31.** Sinapsis de los fotorreceptores con sus neuronas secundarias en de ratas SD y P23H

Se muestra el marcaje para Bassoon en cortes de retina de una rata SD (A) y P23H (B). Los núcleos están marcados con TO-PRO-3. Se aprecia la mayor cantidad de cintillas sinápticas positivas para Bassoon (flechas) en la rata SD. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Con el fin de comprobar el estado de las terminaciones axónicas de los fotorreceptores de las ratas P23H y el de sus contactos con células postsinápticas, llevamos a cabo un marcaje para sinaptofisina y GNB3. La sinaptofisina (SYP) es un marcador de las vesículas presinápticas presentes en los pedículos de conos y esférulas de bastones (Fernandez-Sanchez, Lax et al.

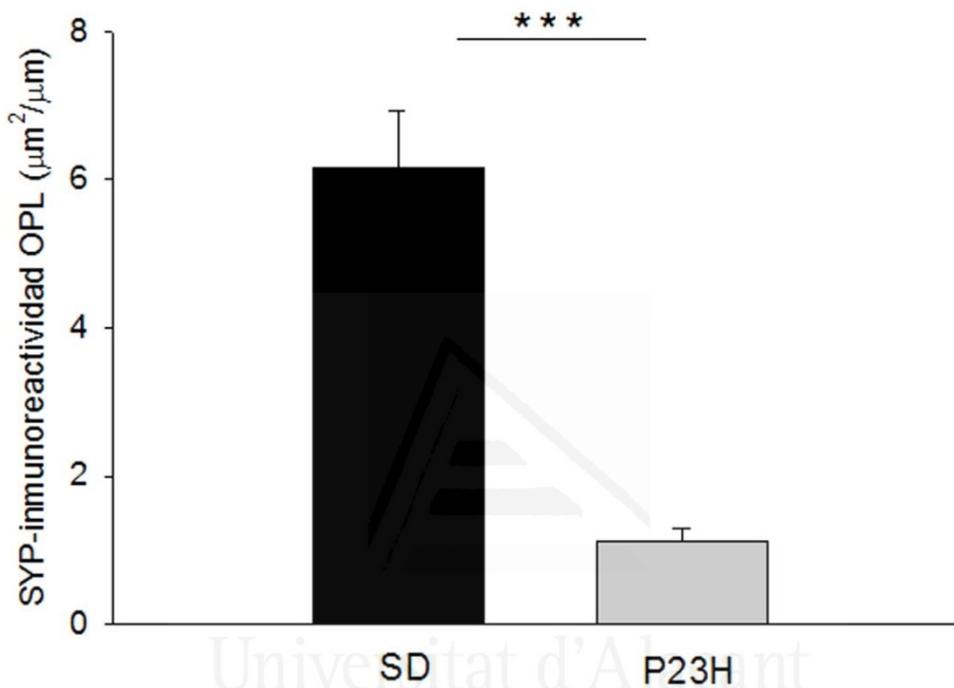
2011). El GNB3 (Guanine nucleotide-binding protein 3) es un marcador de las células bipolares ON (Fernandez-Bueno, Fernandez-Sanchez et al. 2012). A P90, las ratas P23H tratadas con vehículo muestran puntos aislados de inmunotinción para SYP, en comparación con lo observado en ratas SD, donde el marcaje es mucho más denso (Figura 32, flechas). La capa OPL de los animales P23H mostró un aspecto plexiforme discontinuo. La pérdida de vesículas sinápticas indica una pérdida de funcionalidad de los axones de los fotorreceptores. En los conos remanentes de la retina periférica, encontramos marcaje deslocalizado de SYP a lo largo de toda la célula fotorreceptora, desde el axón hasta el segmento externo, este tipo de marcaje indica la desestructuración de la zona axónica del fotorreceptor (Figura 32, puntas de flecha).



**Figura 32.** Terminales presinápticas de los fotorreceptores de ratas SD y P23H

Se muestran las secciones verticales de retina central (A, B) y periférica (C, D) a P90 de ratas SD (A, C) y de ratas P23H (B, D). El marcaje para GNB3 muestra células bipolares ON (rojo), mientras el marcaje para SYP muestra las vesículas presinápticas de conos y bastones (verde, flechas). Los núcleos están marcados con Hoescht (azul). Se aprecia cómo los contactos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares están mucho más deteriorados en las ratas P23H. En las ratas P23H encontramos también marcaje deslocalizado de SYP en los somas celulares de los conos (puntas de flecha). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

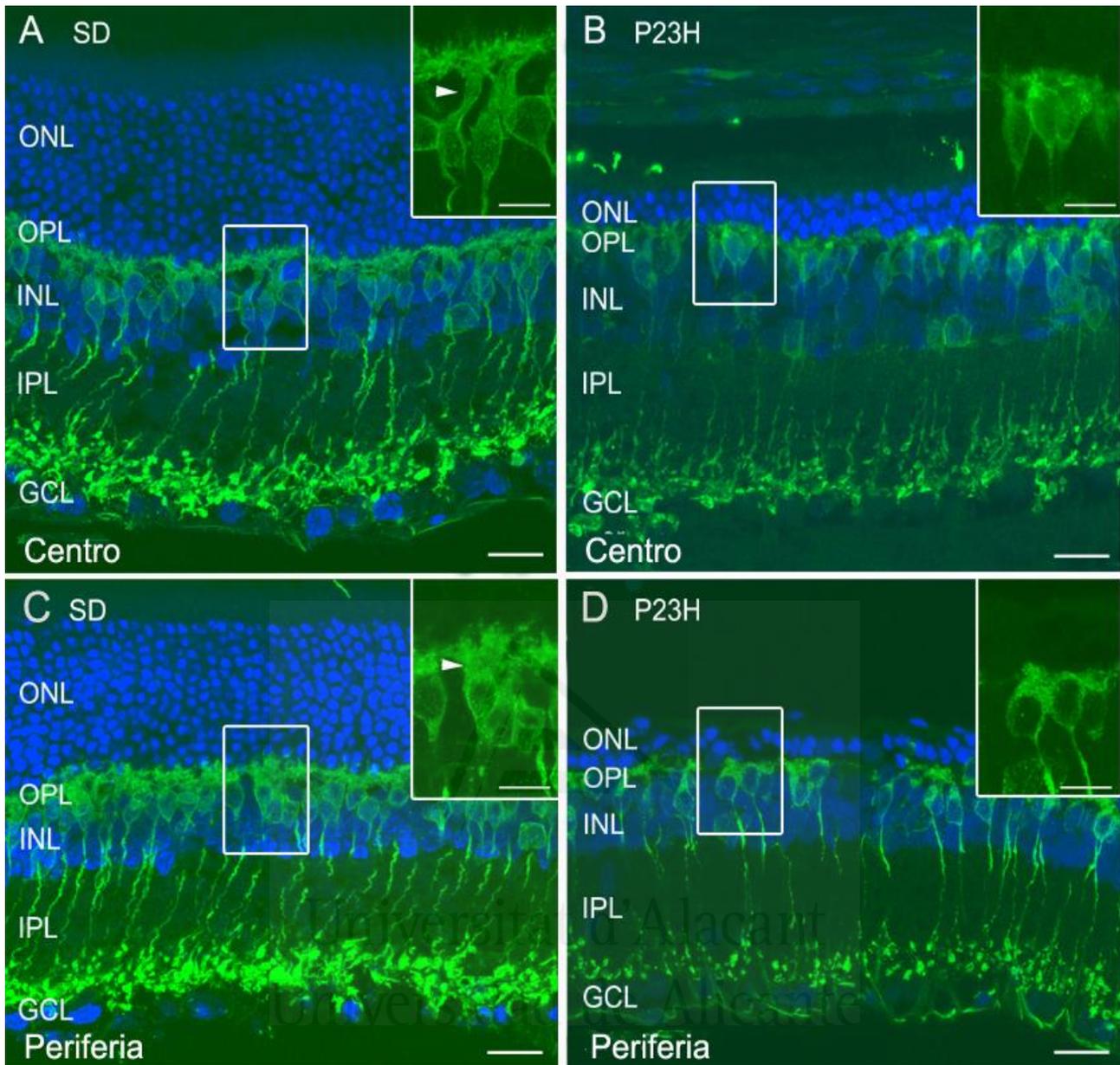
Con el fin de cuantificar los efectos de la mutación P23H sobre los terminales axónicos de los fotorreceptores, medimos el área marcada con SYP (superficie inmunopositiva SYP /mm de sección retinal) en la OPL de ratas P23H y SD, y encontramos que el área fue significativamente más pequeña en las ratas P23H, en comparación con las ratas SD (test *t* de Student,  $p < 0.001$ ) (Figura 33).



**Figura 33.** Área relativa de inmunomarcaje para SYP en la OPL de ratas SD y P23H

Se muestra el área relativa en los terminales axónicos de la OPL, expresado como superficie inmunopositiva/mm de sección retinal de ratas SD (negro) y P23H (gris). \*\*\*Test *t* de Student,  $p < 0.001$ .

Dado el estado de degeneración de los fotorreceptores y sus terminales axónicas en las ratas P23H, analizamos la estructura y densidad de células bipolares de la retina de estos animales, en comparación con lo observado en ratas SD. Las células bipolares de bastón se marcan con anticuerpos contra la isoforma  $\alpha$  de proteína kinasa C (PKC- $\alpha$ ) (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Estas células se caracterizan por establecer conexiones con las esférulas de bastones en la OPL a través de un largo amplio árbol dendrítico. Sus axones corren hasta la IPL, donde acaban en una terminal axónica bulbosa en el estrato S5 (Figura 34).



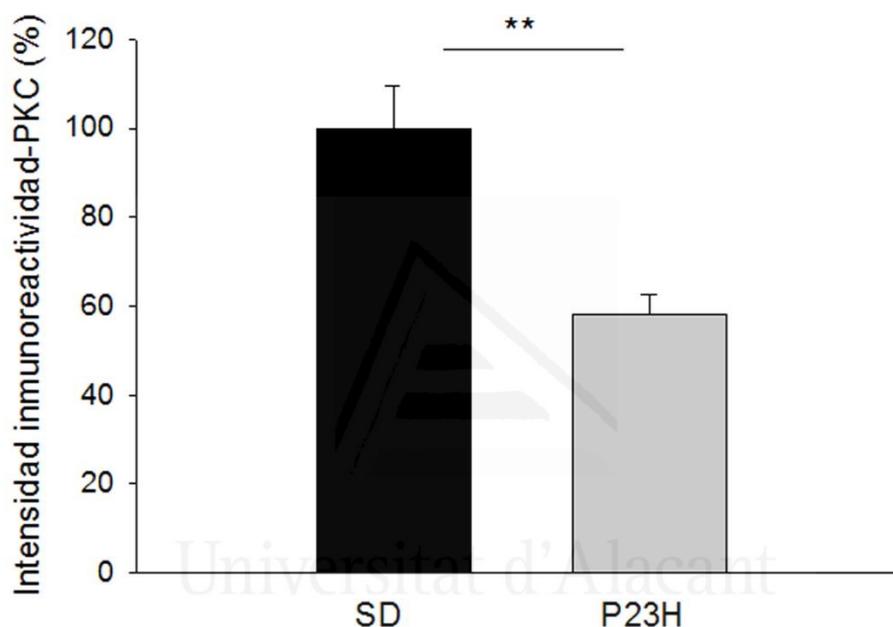
**Figura 34.** Terminaciones sinápticas de células bipolares tipo ON de ratas SD y P23H

Las secciones verticales de retina central (A, B) y periférica (C, D) con inmunolocalización para PKC- $\alpha$  evidencian las células bipolares tipo ON en SD a P120 (A, C) y P23H (B, D) En alto a la derecha de cada imagen una magnificación del árbol dendrítico de una célula bipolar en el OPL. Los núcleos están marcados en azul con TO-PRO-3. Se aprecia el cuerpo celular y las dendritas en mejor estado en las ratas SD (puntas de flecha), tanto en zonas centrales como periféricas de la retina. Barra de escala, 20  $\mu$ m y 10  $\mu$ m en las magnificaciones.

En las ratas P23H, las células bipolares de bastón muestran menos cuerpos celulares y una retracción de sus dendritas. Las ramas dendríticas eran escasas y algunas células prácticamente no presentan dendritas. Los cuerpos celulares no estaban alineados, y las terminales axónicas mostraban baja inmunoreactividad. Las células bipolares de las ratas SD mostraron una compleja arborización, con dendritas uniformemente repartidas por la OPL.

Los somas celulares de ratas SD estaban mejor alineados, con terminales axónicas más grandes, con varicosidades terminales laterales propias de estas células (Figura 34).

La intensidad de la inmunoreactividad observada en las ratas P23H resultó significativamente menor que la medida en las ratas SD (test t de Student,  $p < 0.01$ ) (Figura 35). Estos resultados histológicos concuerdan con las diferencias en la amplitud de la onda *b* encontradas entre ratas P23H y ratas SD.



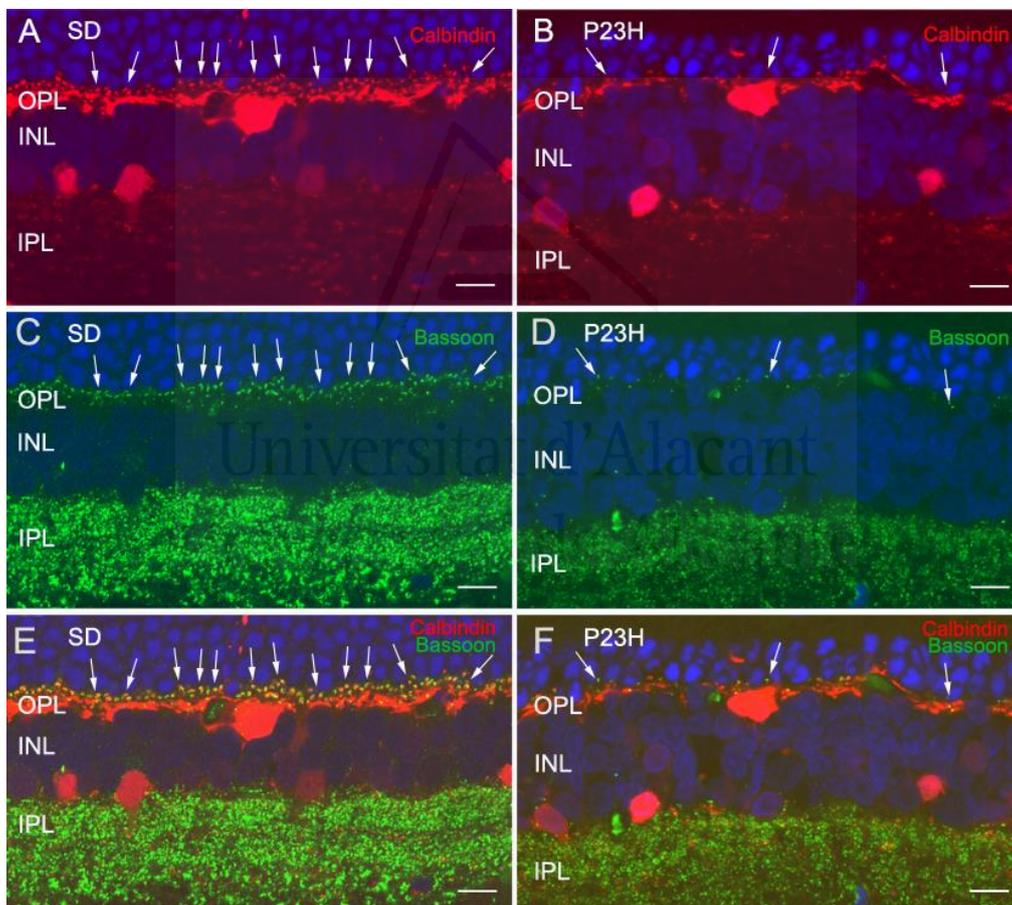
**Figura 35.** Inmunoreactividad relativa a PKC- $\alpha$  en la retina de ratas SD y P23H

Se muestra la inmunoreactividad relativa a PKC- $\alpha$  de las células bipolares de bastones en la retina central de ratas SD (negro) y P23H (gris). \*\*Test t de Student,  $p < 0.01$ .

Dada la pérdida de integridad de las células bipolares ON de bastón en ratas P23H, también analizamos la estructura de las células horizontales y su conectividad con los fotorreceptores de ratas P23H y SD. Los somas de las células horizontales se localizan en la INL, y establecen conexiones con conos y bastones. Las células horizontales de la retina de rata pueden ser identificadas usando anticuerpos contra calbindina (Peichl, Gonzalez-Soriano 1994). A diferencia de otros mamíferos, en la retina de rata se ha descrito un subtipo (denominado B) de célula horizontal, cuyas dendritas establecen contactos sinápticos con los pedículos de los conos y cuyas terminales axónicas contactan con las esférulas de los bastones (Kolb 1991,

Kolb H. et al. 2013). En las ratas SD, la inmunotinción punteada para calbindina marca el árbol dendrítico de las horizontales, el cual típicamente protruye desde el cuerpo celular (Figura 36, flechas). En las imágenes de retinas de ratas SD bien conservadas se puede distinguir el árbol dendrítico que llega a conectar con los axones de los conos. Además se muestra la elongación axónica tangencial hacia la OPL que acaba conectando con los bastones. De esta manera las células horizontales forman un puente sináptico indirecto entre conos y bastones, el cual permite interacciones relacionadas con el contraste de colores (Kolb H. et al. 2013).

A P90 las ratas del grupo P23H tratadas con vehículo muestran pérdida y/o retracción de las terminales sinápticas de las células horizontales, concomitante con el descenso en el número de filas de fotorreceptores (Figura 36).



**Figura 36.** Inmunolocalización para calbindina y Bassoon en la retina de rats SD y P23H.

Se muestran secciones verticales de retina de rata SD (A, C, E) y P23H (B, D, F), con las células horizontales marcadas con anticuerpo para calbindina, y las cintillas sinápticas de los fotorreceptores marcadas con Bassoon. Los núcleos están marcados con TO-PRO-3. Se aprecia un mayor número de contactos sinápticos (flechas) entre células horizontales y fotorreceptores en las ratas SD. Todas las imágenes son tomadas de retina central, cerca del nervio óptico. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Con el fin de averiguar si la degeneración en la arborización de las células horizontales se correlacionaba con la degeneración de la conectividad sináptica en la OPL, realizamos un doble marcaje para calbindina y Bassoon. En las ratas SD se pudieron observar las típicas manchas de Bassoon con forma de herradura, que corresponden a las esférulas de bastones, asociadas a las terminales dendríticas de las células horizontales marcadas para calbindina. En las ratas P23H, las imágenes obtenidas ponen en evidencia el menor número de sinapsis entre fotorreceptores y células horizontales, en comparación lo observado en ratas SD (Figura 36). Esta observación indica que a la pérdida de fotorreceptores sigue la pérdida de células horizontales, de sus dendritas y de las conexiones sinápticas entre estos dos tipos celulares.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

#### 4.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LAS RATAS P23H.

### **Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration.**

**Pedro Lax, Gema Esquivá, Cesare Altavilla, Nicolás Cuenca**

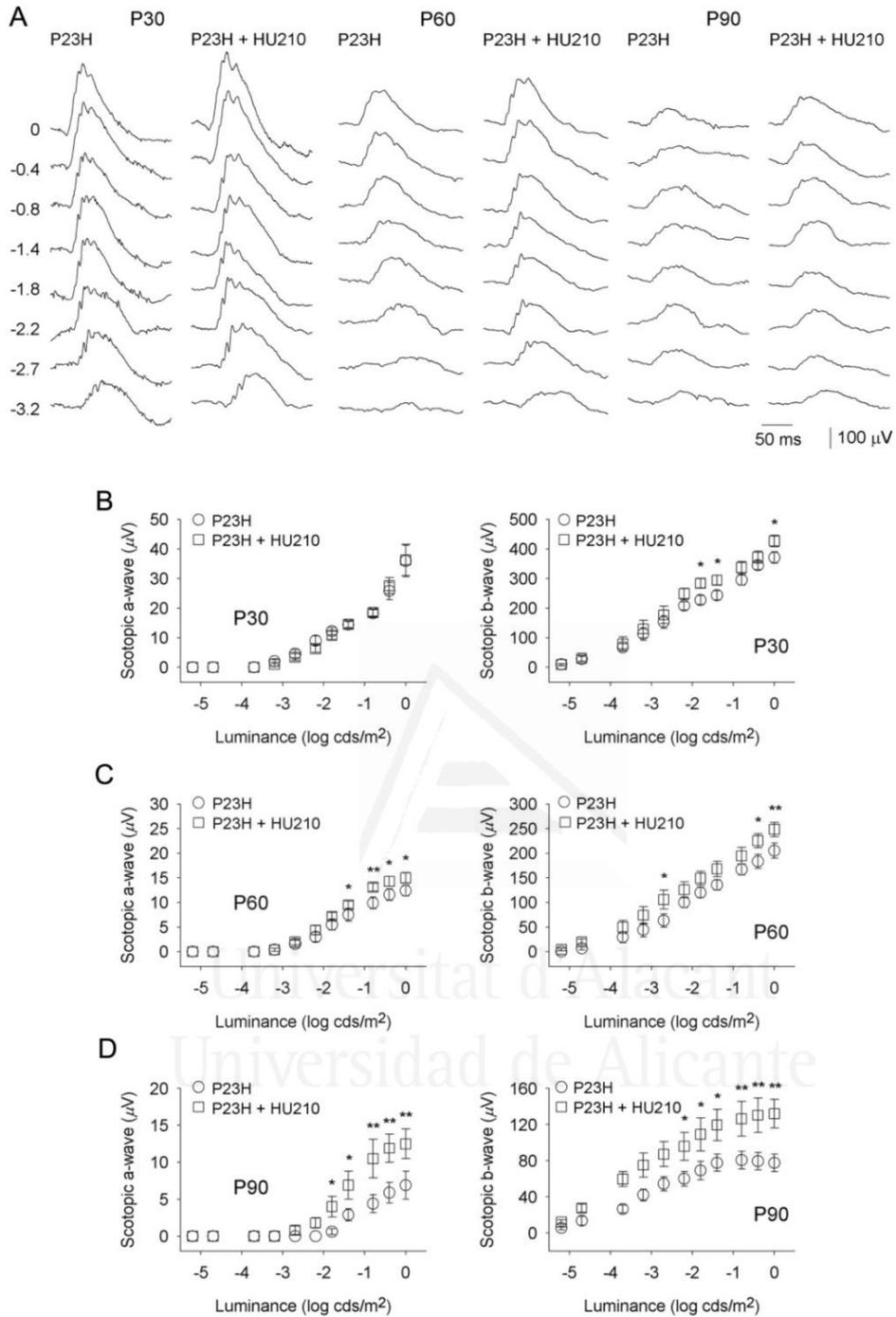
**Experimental Eye Research 120 (2014) 175-185,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.019>.**

#### 4.3.1 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LA RESPUESTA VISUAL DE LAS RATAS P23H

Con el fin de evaluar el posible efecto neuroprotector del cannabinoide sintético HU210 sobre la función de la retina de ratas P23H, se obtuvieron los registros electroretinográficos de ratas P23H tratadas con HU210 de P24 hasta P90 (n = 6), y se compararon con los resultados obtenidos con el grupo P23H tratado con vehículo (n = 5). Todos los registros fueron llevados a cabo en condiciones escotópicas a las edades de P30, P60 y P90.

Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 37, a través de los registros electroretinográficos representativos de una rata P23H tratada con vehículo y de una rata P23H tratada con HU210 (panel A). Los paneles B, C y D muestran las curvas estímulo-respuesta resultantes de la cuantificación de la amplitud de las ondas *a* y *b* frente a estímulos de intensidad creciente en las ratas de P23H tratadas con vehículo y en las tratadas con HU210.

Como se muestra en la (Figura 37, panel A), la respuesta electroretinográfica fue menos deteriorada en las ratas P23H tratadas con HU210, en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo. En los ERGs realizados a P30, con una semana de tratamiento en los animales tratados con HU210, se observó una mayor amplitud en la onda *b* registrada en condiciones escotópicas ( $427 \pm 19 \mu\text{V}$ ), en comparación con lo observado en las ratas P23H tratadas con vehículo ( $371.2 \pm 19.5 \mu\text{V}$ ) (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.001$ ), mientras que la onda *a* permaneció prácticamente sin variaciones (Tabla 7).



**Figura 37.** Electrorretinogramas y curvas estímulo-respuesta de ratas P23H

A) ERGs representativos registrados en condiciones escotópicas en una rata P23H tratada con vehículo (P23H) y otra tratada con HU210 (P23H + HU210) a P30, P60 y P90. (B-D) Curvas estímulo-respuesta de la amplitud de las ondas a y b en función de la luminancia aplicada en condiciones escotópicas en ratas P23H tratadas con vehículo ( $n = 5$ ) y P23H tratadas con HU210 ( $n = 6$ ). (B) corresponde a P30, (C) corresponde a P60 y (D) corresponde a P90. ANOVA, test de Bonferroni, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

A P60, en las ratas P23H tratadas con HU210 se observó una mejora significativa en la amplitud de las ondas *a* ( $15 \pm 1.1 \mu\text{V}$ ) y *b* ( $248.1 \pm 14.4 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (onda *a*:  $12.4 \pm 1.1 \mu\text{V}$  y onda *b*:  $205.1 \pm 15.3 \mu\text{V}$ ) (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.001$ ) (Figura 37, Tabla 7).

ERG	Escotópico			Escotópico		
	<i>a</i>			<i>b</i>		
Onda						
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
HU210	$36.3 \pm 5.3$	$15 \pm 1.1$	$12.5 \pm 2$	$427 \pm 19$	$248.1 \pm 14.4$	$132.1 \pm 15.7$
P23H	$36 \pm 5.3$	$12.4 \pm 1.1$	$6.9 \pm 1.9$	$371.2 \pm 19.5$	$205.1 \pm 15.3$	$77.5 \pm 9.6$

**Tabla 7.** Amplitud máxima de la onda *a* y *b* de los ERGs registrados en condiciones escotópicas de ratas P23H tratadas con vehículo y ratas tratadas con HU210

Se indica el promedio de la amplitud máxima  $\pm$  EEM ( $\mu\text{V}$ ) de la onda *a* y *b* de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y de 6 ratas tratadas con HU210.

A P90, en las ratas P23H tratadas con HU210 se observó una mayor amplitud de las ondas *a* ( $12.5 \pm 2 \mu\text{V}$ ) y *b* ( $132.1 \pm 15.7 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (onda *a*:  $6.9 \pm 1.9 \mu\text{V}$  y onda *b*:  $77.5 \pm 9.6 \mu\text{V}$ ) (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.001$ ).

La amplitud máxima registrada en las ondas *a* obtenidas bajo condiciones escotópicas a P60 y P90 fue mayor en los animales P23H tratados con HU210 en comparación con la registrada en los animales P23H tratados con vehículo (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0,05$  en ambos casos) (Figura 37. A, C, D). Además, la amplitud máxima registrada en las ondas *b* fue mayor en ratas P23H tratadas con HU210, en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo, a P30, P60 y P90 (ANOVA, test Bonferroni,  $p < 0,001$  en todos los casos; Figura 37 A, B, C y D).

Las mayores diferencias en la amplitud de la onda *a* y *b* entre el grupo HU210 y el grupo P23H tratado con vehículo se observaron a P90, cuando la diferencia de amplitud registrada del grupo HU210 en términos de porcentaje de la onda *a* (máxima) y onda *b* (máxima) resultaron,

respectivamente, un 71% y 70% superior a las registradas en los animales P23H tratados con vehículo.

La RP en humanos muestra típicamente la reducción de las ondas *a* y *b* (Cuenca, Pinilla et al. 2004, Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014). Nuestros resultados indican que HU210 protege y conserva la función de las vías de transmisión de la fototransducción a nivel retiniano.

Los umbrales de sensibilidad a la luz en los animales P23H tratados con HU210, en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo, fueron menores para la onda *b* en condiciones escotópicas a P60 y a P90 (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ) en comparación con los resultados del grupo tratado con vehículo. En cuanto a la onda *a* no fueron detectables diferencias significativas de umbrales de sensibilidad (Tabla 8).

ERG	Escotópico			Escotópico		
	<i>a</i>			<i>b</i>		
Onda	<i>a</i>			<i>b</i>		
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
P23H	-2.08 ± 0.13	-0.85 ± 0.25	-0.25 ± 0.16	-5 ± 0.9	-4.3 ± 0.2	-4.9 ± 0.3
HU210	-1.9 ± 0.15	-1.4 ± 0.2	-0.8 ± 0.2	-4.89 ± 0.19	-4.8 ± 0.2	-5.37 ± 0.22

**Tabla 8.** Umbrales de sensibilidad de las onda *a* y *b* escotópicas a diferentes edades de ratas P23H

*Se indica el umbral de sensibilidad ± EEM (log cd s m<sup>-2</sup>) promedio de las ondas a y b de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y 6 ratas tratadas con HU210. Se puede notar cómo el umbral de sensibilidad aumenta con el avance de la edad.*

El tiempo implícito o, también, latencia media de la onda *a* y onda *b* fue menor a P60 en las ratas tratadas con HU210, en comparación con las ratas del grupo de P23H tratado con vehículo (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.01$  en ambos casos). Los resultados fueron los siguientes: en el grupo tratado con HU210 el tiempo implícito de la onda *a* resultó ser  $26.0 \pm 0,6$  ms en comparación con los  $29.9 \pm 1.3$  ms del grupo tratado con vehículo, y el tiempo

implícito de la onda *b* en el grupo tratado con HU210 resultó ser  $61.3 \pm 1.5$  ms en comparación con los  $66.4 \pm 1.2$  ms del grupo tratado con vehículo. A P90, las diferencias en el tiempo implícito se confirmaron (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.01$  en ambos casos). El tiempo implícito de la onda *a* en el grupo tratado con HU210 resultó ser de  $23.0 \pm 1.0$  ms en comparación con los  $29.7 \pm 2.1$  ms del grupo tratado con vehículo. El tiempo implícito de la onda *b* resultó ser en el grupo tratado con HU210 de  $64.2 \pm 3.0$  ms en comparación con los  $71.9 \pm 3.2$  ms del grupo tratado con vehículo (Tabla 9).

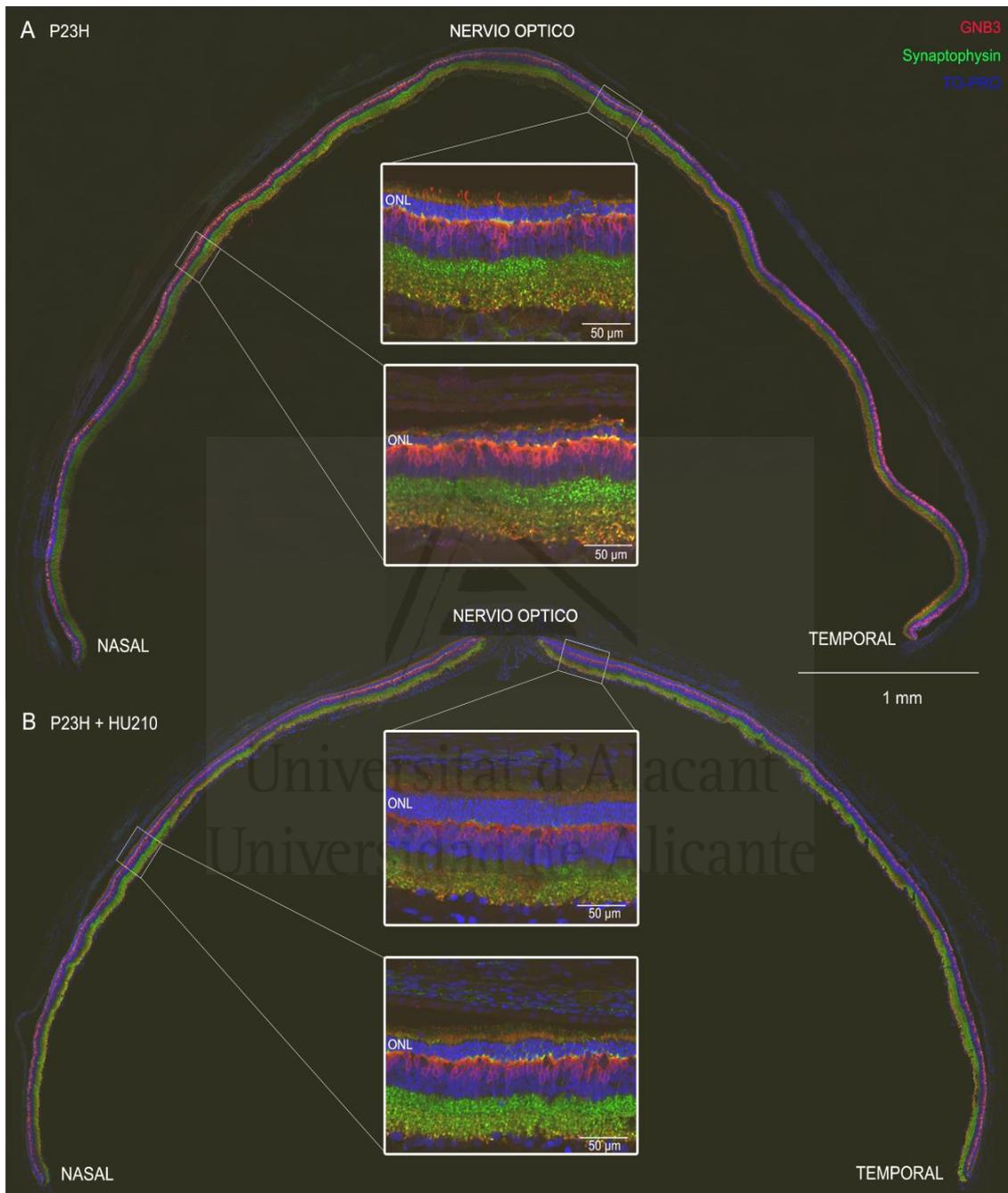
ERG	Escotópico			Escotópico		
	<i>a</i>			<i>b</i>		
Onda						
Tiempo	P30	P60	P90	P30	P60	P90
HU210	$24.5 \pm 0.4$	$26.0 \pm 0.6$	$23.0 \pm 1.0$	$57.8 \pm 0.7$	$61.3 \pm 1.5$	$64.2 \pm 3.0$
P23H	$24.9 \pm 0.4$	$29.9 \pm 1.3$	$29.7 \pm 2.1$	$57.6 \pm 1.3$	$66.4 \pm 1.2$	$71.9 \pm 3.2$

**Tabla 9.** *Tiempo implícito o latencia media (ms) de la onda a y b escotópicas en ratas P23H tratadas con vehículo y tratadas con HU210*

*Se indica el tiempo implícito  $\pm$  EEM promedio de la onda a y b de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y 6 ratas tratadas con HU210.*

El tiempo implícito con el que se disparan las ondas de los ERGs refleja el estado morfológico y funcional de las vías de fototransducción a nivel retiniano. En los pacientes con RP las ondas que componen el ERG se reducen a la vez que aumenta el tiempo implícito, debido al surgir de problemas sinápticos de transmisión de la señal. Nuestros resultados muestran una mejora en el tiempo implícito de las ondas *a* y *b* de los ERGs registrados en animales P23H tratados con HU210, lo que podría indicar una acción protectora y de preservación de las células retinianas y de las conexiones sinápticas.

### 4.3.2 HU210 RALENTIZA LA DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES.

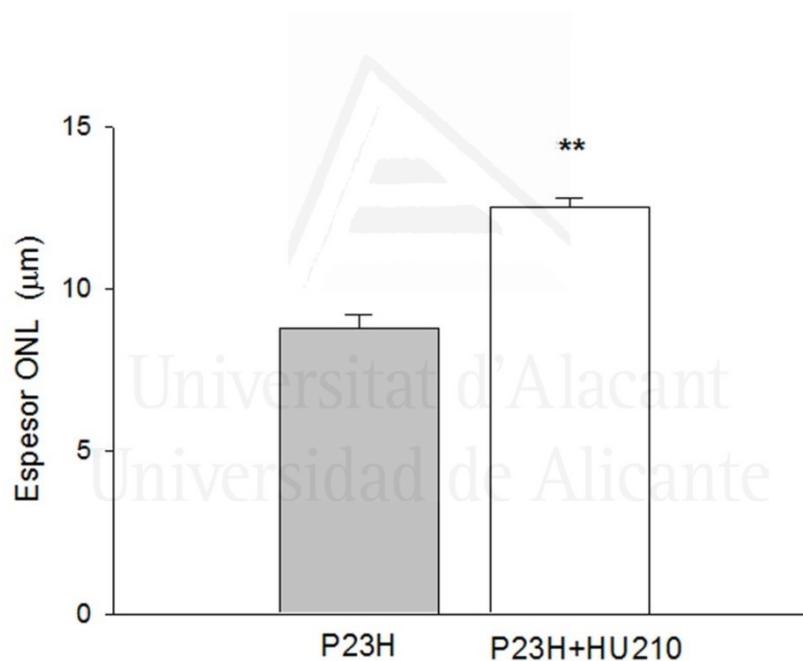


**Figura 38.** Estructura de la retina de ratas P23H tratadas con vehículo y con HU210

Secciones verticales de hemiretina con magnificación de las capas retinales en ratas P23H tratadas con vehículo (A) y ratas P23H tratadas con HU210 (B) a P90. El marcaje para GNB3 pone de manifiesto las células bipolares ON (rojo), el marcaje para sinaptofisina evidencia las vesículas de las terminales pre-sináptica en IPL y OPL (verde). El marcaje con TO-PRO-3 evidencia los núcleos celulares (azul). Barra de escala, 1mm para las hemiretinas y 50 μm para las magnificaciones.

Dado que los resultados obtenidos en los ERGs de las ratas tratadas con HU210 podrían indicar la preservación de los fotorreceptores, se procedió a analizar mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía confocal si el tratamiento con HU210 había preservado la estructura de las capas más externas de la retina. Con este fin, analizamos a P90 el espesor de la ONL de 5 ratas P23H tratadas con HU210 y 5 tratadas con vehículo (Figura 39).

En términos generales, pudimos observar que, en todas las zonas estudiadas, las ratas tratadas con HU210 mostraron un espesor en la ONL mayor que las ratas P23H tratadas con vehículo (Figura 39), y que el número de filas de fotorreceptores en la ONL fue también mayor (Figura 40) (test *t* de Student,  $p < 0.01$  en ambos casos). Tanto en el grupo de ratas P23H tratado con HU210 como en el tratado con vehículo encontramos los signos típicos del proceso degenerativo de la mutación P23H, pero el avance de la degeneración se mostró sensiblemente menor en las ratas tratadas con HU210.

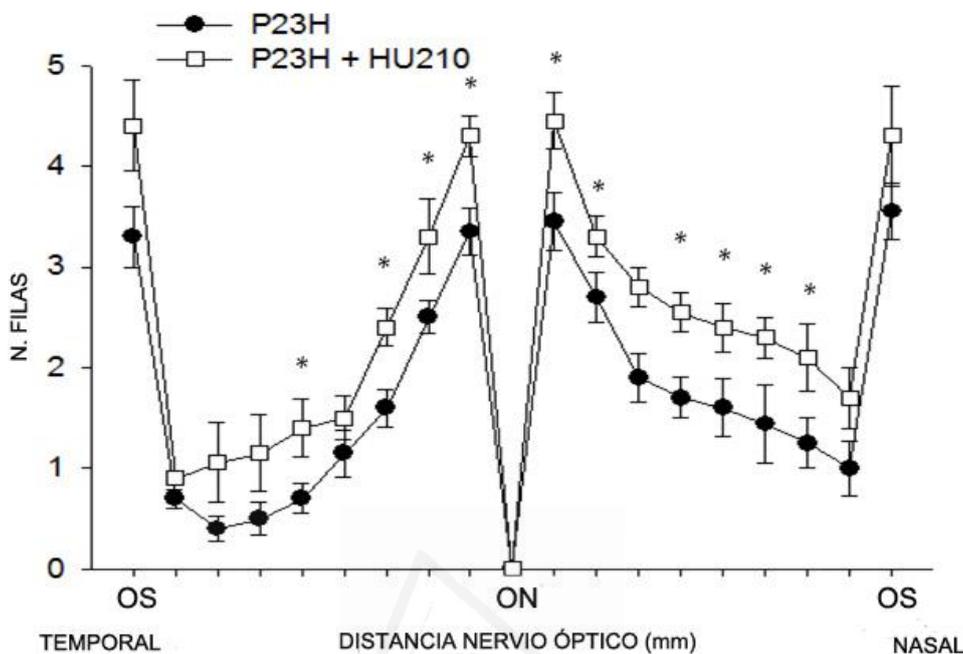


**Figura 39.** Espesor de la ONL de la retina de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Representación gráfica espesor medio de la ONL en animales P23H tratados con vehículo (gris) y con HU210 (blanco) a P90. \*\* Test *t* de Student,  $p < 0.01$ .

Puesto que el proceso degenerativo no es homogéneo a lo largo de la retina (Garcia-Ayuso, Ortin-Martinez et al. 2013, Fernandez-Sanchez, de Sevilla Muller et al. 2014) medimos los efectos del tratamiento con HU210 en diferentes zonas de la retina desde la ora serrata de la zona temporal hasta la ora serrata de la zona nasal, pasando por el nervio óptico. Los resultados indican que el número medio de filas de fotorreceptores en las ratas tratadas con

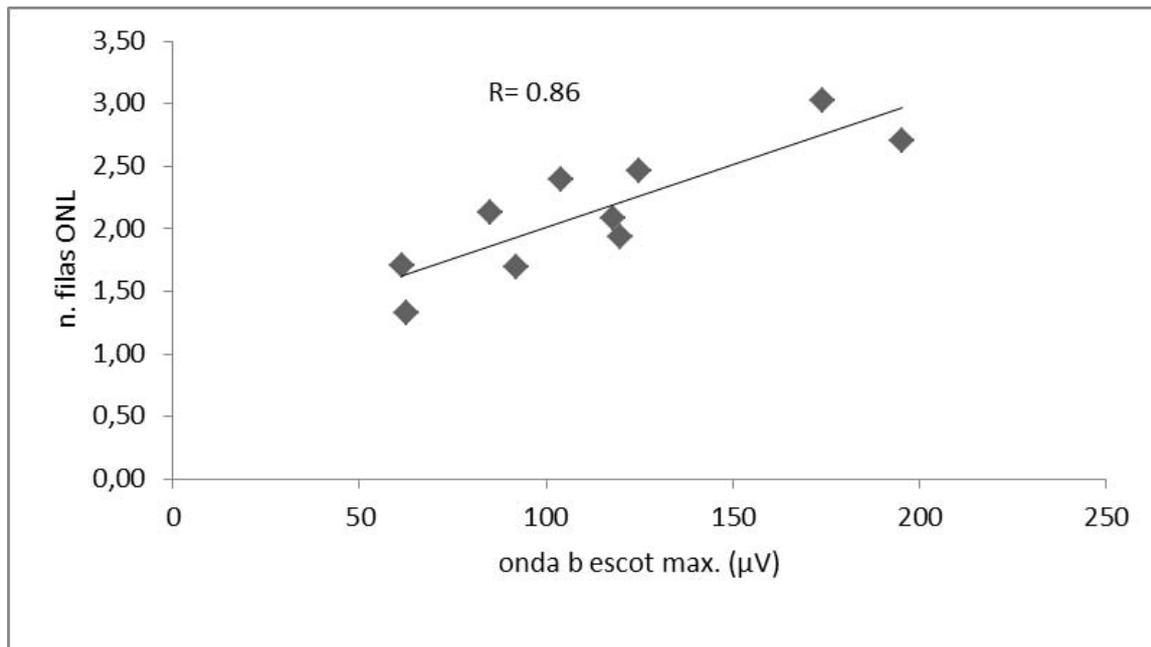
HU210 era un 40% mayor respecto a las ratas de P23H tratadas con vehículo ( $2.6 \pm 0.2$  filas grupo HU210 en comparación con  $1.8 \pm 0.2$  filas del grupo tratado con vehículo).



**Figura 40.** Número medio de filas de fotorreceptores en ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

El número medio de filas de fotorreceptores a P90 en las ratas P23H tratadas con HU210 (cuadrados blanco) fue un 40% más alto que en las tratadas con vehículo (círculos negros). \*Test t de Student,  $p < 0.05$ .

El número de filas de fotorreceptores de las ratas P23H tratadas con HU210 y las tratadas con vehículo se relacionaron con los resultados obtenidos en los ERGs de cada animal a P90. Encontramos una correlación positiva que demuestra que a más filas de fotorreceptores en la ONL mayor amplitud máxima de la onda *b*; la correlación se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson R ( $p < 0.01$ ,  $R = 0.86$ ). Esta correlación positiva ha sido demostrada en anteriores estudios (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b). Además, se ha demostrado previamente que existe una correlación positiva también entre el espesor de la retina y las ondas *a* y *b* escotópicas (Esteve-Rudd, Fernandez-Sanchez et al. 2011). Por tanto, se procedió a estudiar la posible correlación entre la amplitud de la onda *b* registrada a P90 y el espesor de la ONL. Para ello, se representó la correlación, entre el espesor de la ONL y la amplitud de las ondas *b* máximas escotópicas registradas (5 P23H tratadas con HU210 y 5 P23H tratadas con vehículo).

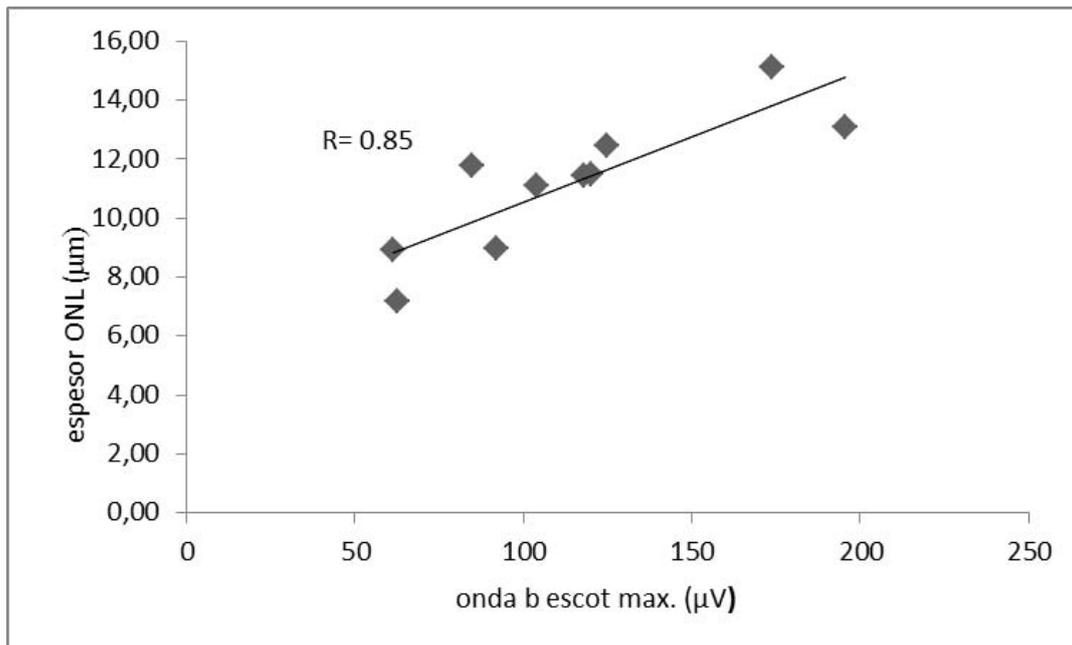


**Figura 41.** Correlación entre el número de filas de fotorreceptores y la amplitud máxima de la onda b escotópica de ratas P23H

Representación gráfica del número de filas de la ONL en función de la amplitud máxima de las ondas b a P90 registradas en condiciones escotópicas en 5 ratas P23H tratadas con vehículo y las 5 tratadas con HU210. La correlación se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson R,  $p < 0.01$ .

Se observó que, efectivamente, existía una correlación positiva entre el espesor de la ONL de la retina y la amplitud de las ondas b (Coeficiente de Pearson R;  $p < 0.01$ ,  $R = 0.847$ ). Los resultados indican que las ratas P23H tratadas con vehículo poseen ondas b escotópicas menores y ONL más delgadas que las ratas P23H tratadas con HU210. Dada la preservación del espesor de la ONL observada en las ratas P23H tratadas con HU210, y viendo los buenos resultados funcionales que nos suministraron los ERGs, quisimos comprobar si la supervivencia de los fotorreceptores se acompañaba de la preservación de la conectividad sináptica en la OPL. Para eso, realizamos un marcaje con un anticuerpo para el Bassoon.

El Bassoon es una proteína que tiene un rol en la disposición del citoesqueleto en el lugar de liberación del neurotransmisor (Dick, tom Dieck et al. 2003, tom Dieck, Altroch et al. 2005, Winter, tom Dieck et al. 1999). Este inmunomarcaje se ha utilizado en anteriores investigaciones de nuestro grupo y muestra inmunoreactividad al Bassoon en ambas capas plexiformes en la retina de rata (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2011).



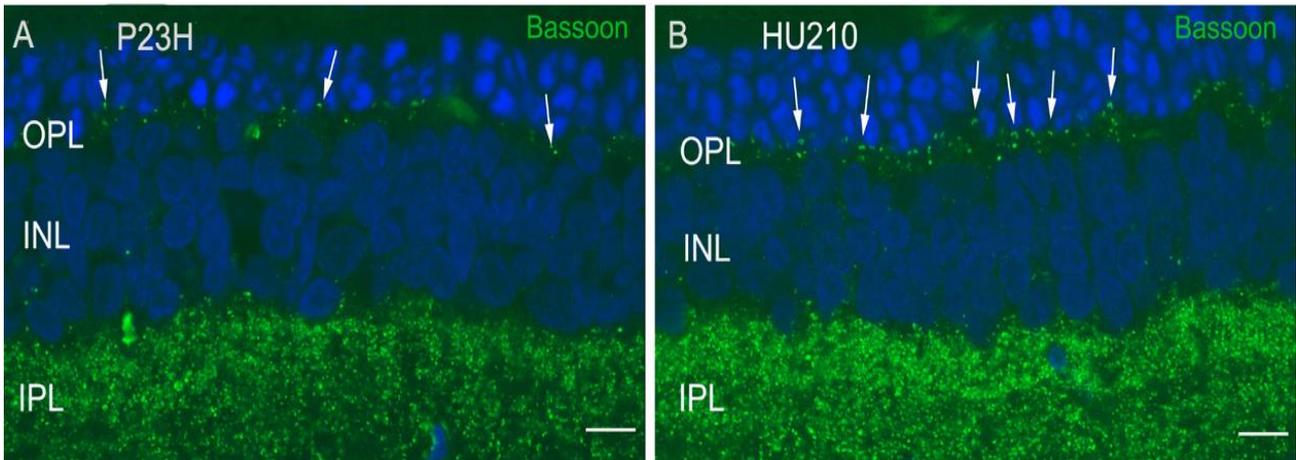
**Figura 42.** Correlación entre el espesor de la ONL y la amplitud de la onda b escotópica máxima en la retina de ratas P23H tratadas con vehículo y tratadas con HU210

Representación gráfica del espesor de la capa nuclear externa (ONL) en función de la amplitud máxima de las ondas b registradas en condiciones escotópicas. La correlación se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson R,  $p < 0.01$ .

En la OPL, el Bassoon se localiza en las sinapsis “en cinta” formadas por los axones de los fotorreceptores y las neuronas secundarias: células horizontales y bipolares (Figura 43, flechas).

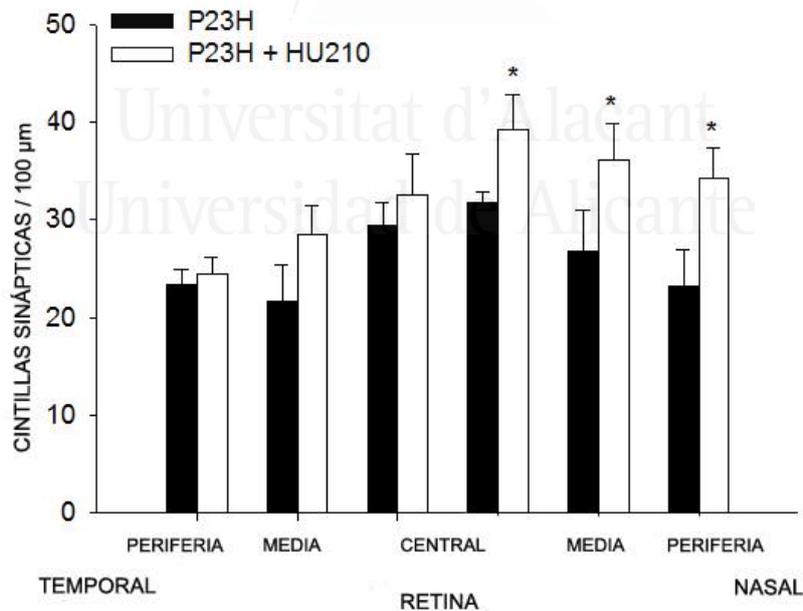
A nivel general, en las ratas P23H tratadas con HU210 se apreció una mayor organización y un aumento del número de contactos sinápticos en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo. Como ya mencionamos, dado que el proceso degenerativo no es homogéneo a lo largo de la retina, comprobamos el número de sinapsis inmunopositivas al Bassoon en diferentes zonas de la misma. Las ratas P23H tratadas con HU210 mostraron un 25% más de contactos, en comparación con las P23H tratadas con vehículo (test t de Student,  $p < 0.01$ ).

Los resultados cuantitativos obtenidos de 5 ratas de cada grupo fueron  $32.5 \pm 2.6$  sinapsis (promedio) marcadas con Bassoon/100  $\mu\text{m}$  de retina en el grupo tratado con HU210, en comparación con  $26.0 \pm 2.3$  sinapsis (promedio) marcadas con Bassoon/100  $\mu\text{m}$  de retina del grupo P23H tratado con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ). Este resultado indica que los elementos que forman la sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y horizontales se encontraban preservados en las ratas tratadas con HU210.



**Figura 43.** Inmunomarcaje con anticuerpo contra Bassoon de las cintillas sinápticas de los fotorreceptores de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Secciones verticales de retina de rata P23H tratada con vehículo (A) y P23H tratada con HU210 (B). Inmunomarcaje con Bassoon de las sinapsis de los fotorreceptores. Se muestra la pérdida consistente de sinapsis por el proceso degenerativo de las ratas del grupo no tratado. En la figura B se muestra la capacidad de de-preservación del HU210, con un aumento notable de las sinapsis (flechas). Barra de escala, 10µm.



**Figura 44.** Cuantificación de cintillas sinápticas marcadas con Bassoon (synaptic ribbons/100µm) de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra el número medio de cintillas sinápticas inmunopositivas al marcate para Bassoon de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y 5 ratas P23H tratadas con HU210. \* Test t de Student,  $p < 0.05$ .

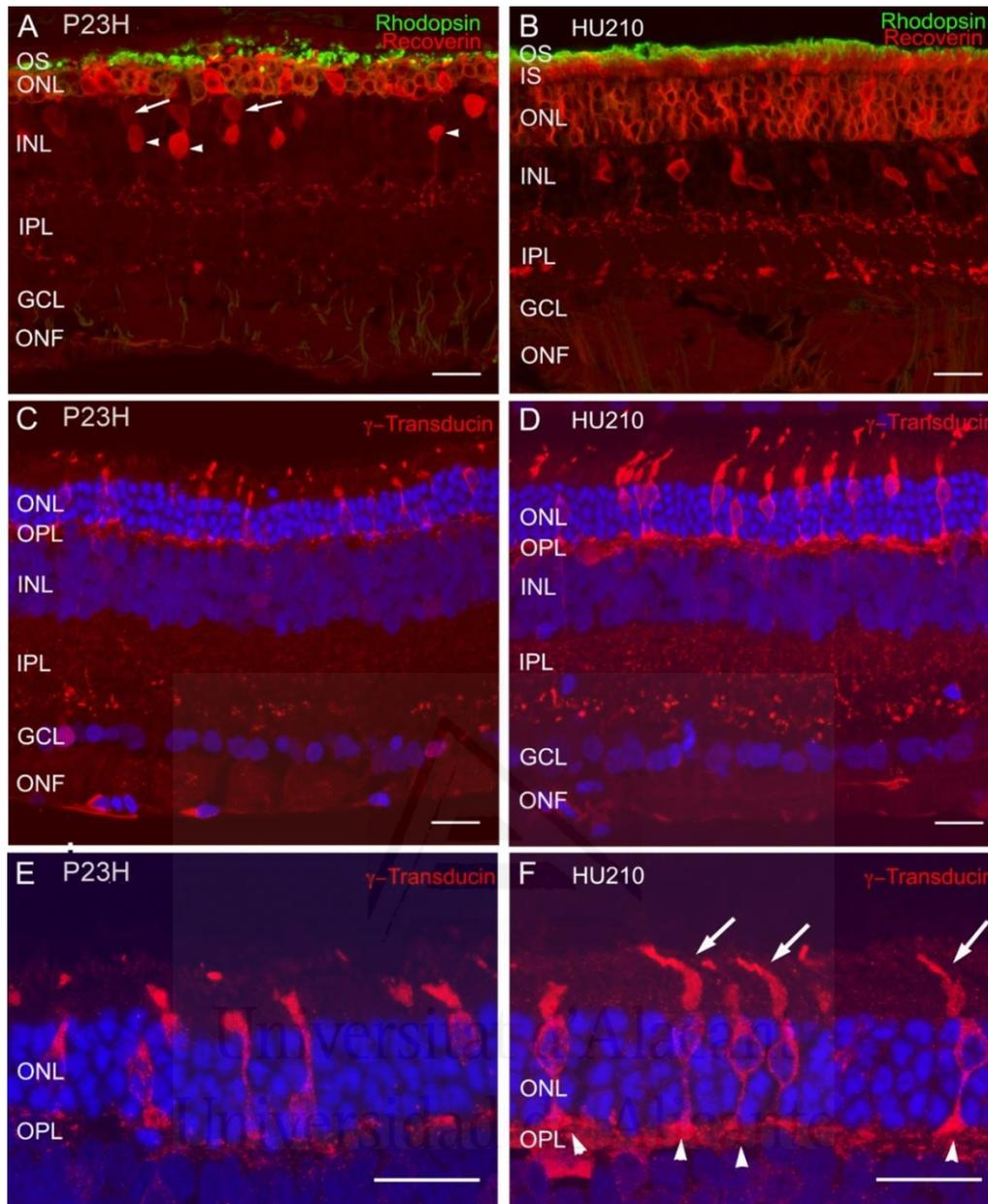
#### *4.3.2.1 HU210 PRESERVA LA MORFOLOGÍA DE LOS FOTORRECEPTORES.*

Quisimos evaluar también si el tratamiento con HU210 en el modelo P23H era capaz de preservar la morfología de los fotorreceptores. Con este fin inmunomarcamos el tejido con anticuerpos para recoverina, una proteína que se expresa en los conos, bastones y algunas células bipolares: las células bipolares ON tipo 8 y las OFF tipo 2 (Cuenca, Pinilla et al. 2004). También marcamos con anticuerpos para rodopsina, la cual se encuentra en el segmento externo de los bastones (Pinilla, Cuenca et al. 2007), y para  $\gamma$ -transducina, una proteína utilizada como marcador de conos (Martinez-Navarrete, Seiler et al. 2011, Cuenca, Pinilla et al. 2004).

En general, en las ratas P23H tratadas con HU210 se apreció una mayor regularidad en la forma de los fotorreceptores, acompañada de una mejor orientación de los mismos y, por consiguiente, una mejor organización de la OPL. A P90, en las ratas P23H tratadas con HU210 se aprecia un cierto grado de degeneración, sin embargo los fotorreceptores estaban mejor preservados, en comparación con los de las ratas P23H tratadas con vehículo. El segmento interno y externo de los bastones existentes se mostró más largo y con morfología típica y regular en comparación con los de las ratas P23H (Figura 45).

Se observó que el estado de conservación de los conos era sensiblemente mejor en las retinas tratadas con HU210 en comparación con las tratadas con vehículo, en las cuales encontramos un estado de degeneración avanzado con afectación incluso del número de conos. La degeneración de los conos normalmente ocurre cuando el estado degenerativo de los bastones está avanzado.

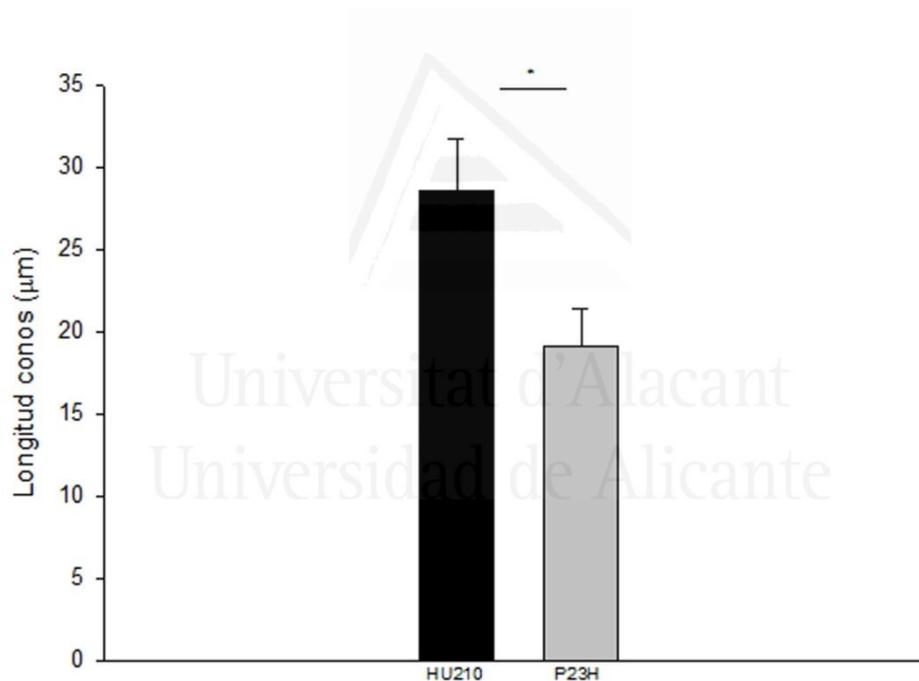
En las ratas P23H tratadas con HU210 el proceso degenerativo se halla ralentizado en comparación con los animales tratados con vehículo, y aun se podían observar conos con estructura típica, dotados de sus segmentos externos e internos (Figura 45, flechas). Además, se podía reconocer la estructura axónica, y el pedículo presentaba su morfología típica (Figura 45, puntas de flecha).



**Figura 45.** Morfología de los fotorreceptores de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestran secciones verticales a P90 de retinas de ratas P23H tratadas con vehículo (A, C, E) y P23H tratadas con HU210 (B, D, F). (A, B) Se muestran los conos y bastones marcados con recoverina (rojo) y los segmentos externos de bastones marcados con rodopsina (verde) de una rata P23H tratada con vehículo y con HU210. El inmunomarcado para recoverina muestra también algunas células bipolares tipo 2 y tipo 8 que se evidencian con el marcaje con recoverina flechas y puntas de flecha, respectivamente. Se aprecia el avanzado estado de degeneración de la retina de la rata P23H en comparación con la retina de la rata P23H tratada con HU210. (C-F) Imágenes representativas de la retina de ratas P23H tratadas con vehículo y con HU210 inmunomarcadas con  $\gamma$ -transducina, mostrando las células tipo conos de tamaño menor, con segmento externo más cortos e irregulares en las ratas P23H en comparación con las ratas SD. Los núcleos están marcados con TO-PRO-3. Las magnificaciones muestran la mejor preservación de los segmentos externos (flechas) e internos de los conos y el mantenimiento de la estructura axónica y de la morfología del pedículo (puntas de flecha) en las ratas P23H tratadas con HU210 en comparación con las tratadas con vehículo (E, F). Todas las imágenes son de retina central, cerca del nervio óptico. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

En base a nuestros resultados, HU210 desempeña un importante papel neuro-protector sobre la morfología de los fotorreceptores en el modelo murino de degeneración retiniana P23H. Con el fin de cuantificar la efectividad de la neuro-preservación de HU210 en los conos, comparamos la longitud de los mismos del grupo de ratas P23H tratado con HU210 con el grupo de ratas P23H tratado con vehículo. La longitud de los conos del grupo tratado con HU210 fue, a P90, significativamente superior en comparación con el grupo tratado con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ). Las ratas del grupo tratado con HU210 mostraron un 46.6 % más de longitud de sus conos en comparación con las ratas P23H del grupo tratado con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ). La longitud media de los conos de las ratas P23H tratadas con HU210 resultó ser de  $28,6 \pm 3.13 \mu\text{m}$ , frente a los  $19,13 \pm 2.28 \mu\text{m}$  de las P23H no tratadas (Figura 46).



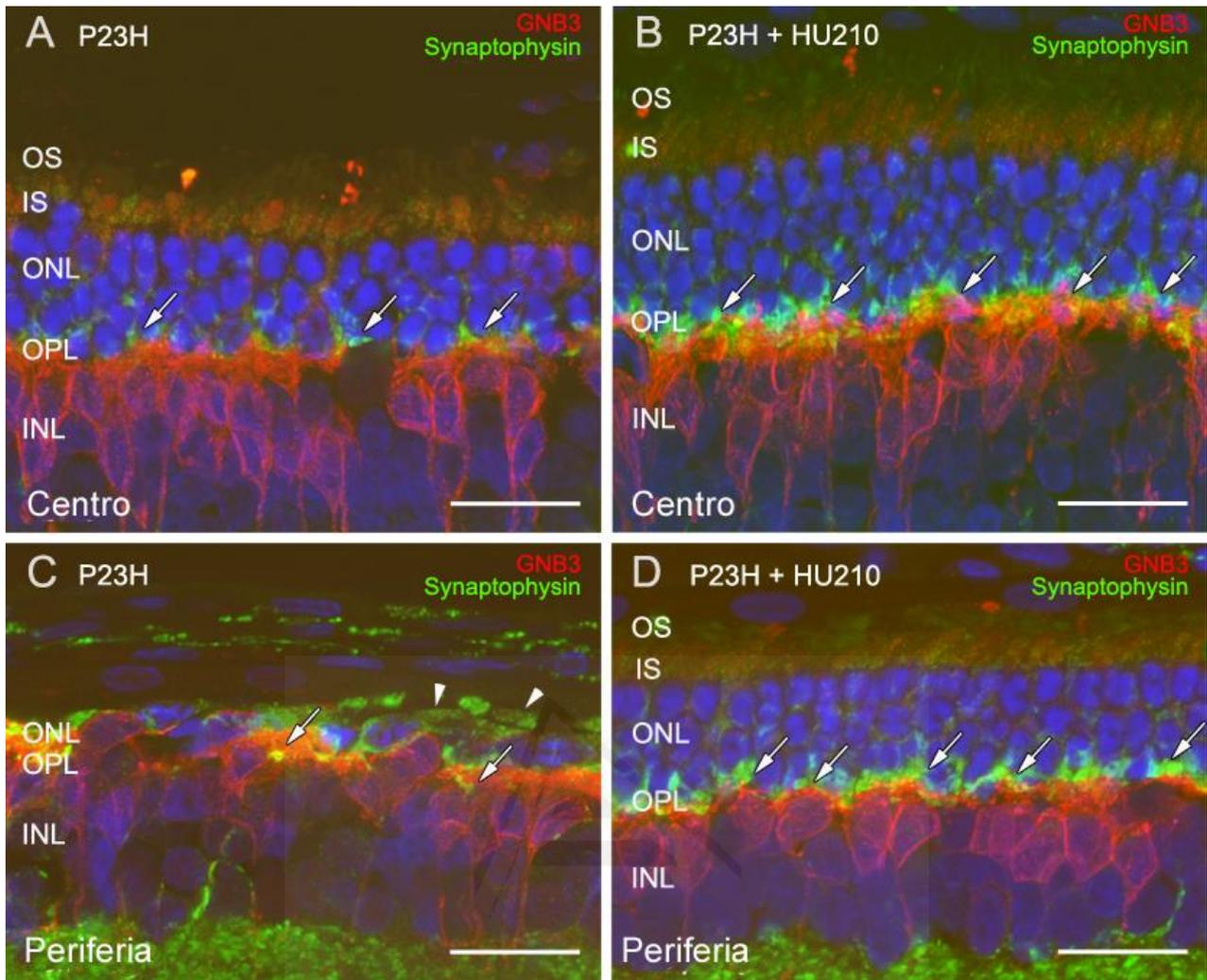
**Figura 46.** Longitud de los conos de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Longitud media de las células tipo cono en la zona central de la retina cerca del nervio óptico de 5 ratas P23H tratadas con HU210 y 5 ratas P23H tratadas con vehículo. \* Test t de Student,  $p < 0.05$ .

#### *4.3.2.2 HU210 PRESERVA LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS*

Además de la preservación de la morfología de los fotorreceptores, quisimos comprobar si las terminales axónicas resultaban preservadas por el tratamiento con HU210. Con este fin llevamos a cabo un inmunomarcaje combinado para SYP y para GNB3. El doble marcaje para SYP y GNB3 evidencia los contactos sinápticos entre las esférulas de bastones, marcadas con SYP (Figura 47, flechas) y las terminaciones dendríticas de las células bipolares de bastones ON marcadas con GNB3. Con estas inmunolocalizaciones podemos comprobar el estado estructural y funcional de la sinapsis. En las ratas del grupo HU210 se observa un mayor número de contactos sinápticos en comparación con las ratas del grupo P23H tratado con vehículo (Figura 47). En las ratas tratadas con HU210 los fotorreceptores aparecen en mejor estado y muestran un marcado continuo de la terminación axónica. Por el contrario, en las retinas de las ratas P23H tratadas con vehículo encontramos puntos aislados de inmunotinción para SYP, y también inmunopositividad en zonas atípicas (Figura 47, puntas de flecha). La tinción errática indica que el fotorreceptor ha perdido su estructura típica y la integridad de las membranas y, por consiguiente, la funcionalidad.

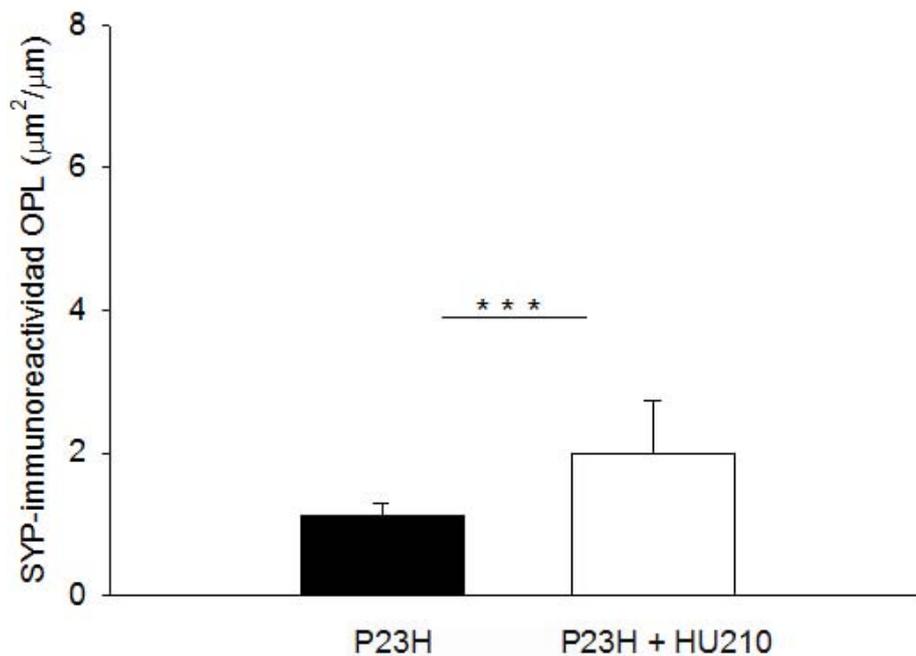
Para cuantificar los efectos de HU210 sobre las terminaciones axónicas de los fotorreceptores en la OPL, medimos el área marcada con SYP en cada sección de retina (superficie inmunopositiva /mm de sección retinal). Encontramos que el área marcada con SYP en las ratas P23H tratadas con HU210 fue significativamente mayor (test t de Student,  $p < 0.05$ ) que el obtenido en las ratas P23H tratadas con vehículo.



**Figura 47.** Terminales pre-sinápticas de los fotorreceptores de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestran las imágenes de cortes de retina central (A, B) y periférica (C, D) de una rata P23H tratada con vehículo (A, C) y otra tratada con HU210 (B, D). El marcaje para GNB3 muestra las células bipolares ON (rojo), mientras el marcaje para SYP muestra las vesículas pre-sinápticas de conos y bastones (verde, flechas). Los núcleos están marcados con tinción Hoechst (azul). Se aprecia cómo los contactos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares están mucho más deteriorados en las ratas P23H tratadas con vehículo, en la zona central y periférica de la retina. En las ratas P23H tratadas con vehículo encontramos marcaje errático de SYP en los somas celulares de los conos de la retina periférica (C, puntas de flecha), mientras no encontramos marcaje errático en las ratas tratadas con HU210 (D). Se aprecia la mejor organización de las capas en las ratas tratadas con HU210, y la diferencia de filas de fotorreceptores en la ONL. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

El área de la OPL marcada con SYP en las ratas tratadas con HU210 fue de  $522 \pm 70.5 \mu\text{m}^2/\text{mm}$  frente a  $215.6 \pm 32.26 \mu\text{m}^2/\text{mm}$  de las ratas P23H tratadas con vehículo. En términos relativos, las ratas P23H tratadas con vehículo mostraron un área que apenas alcanzó el 41.3% del área evidenciada en las ratas tratadas con HU210 (Figura 48).

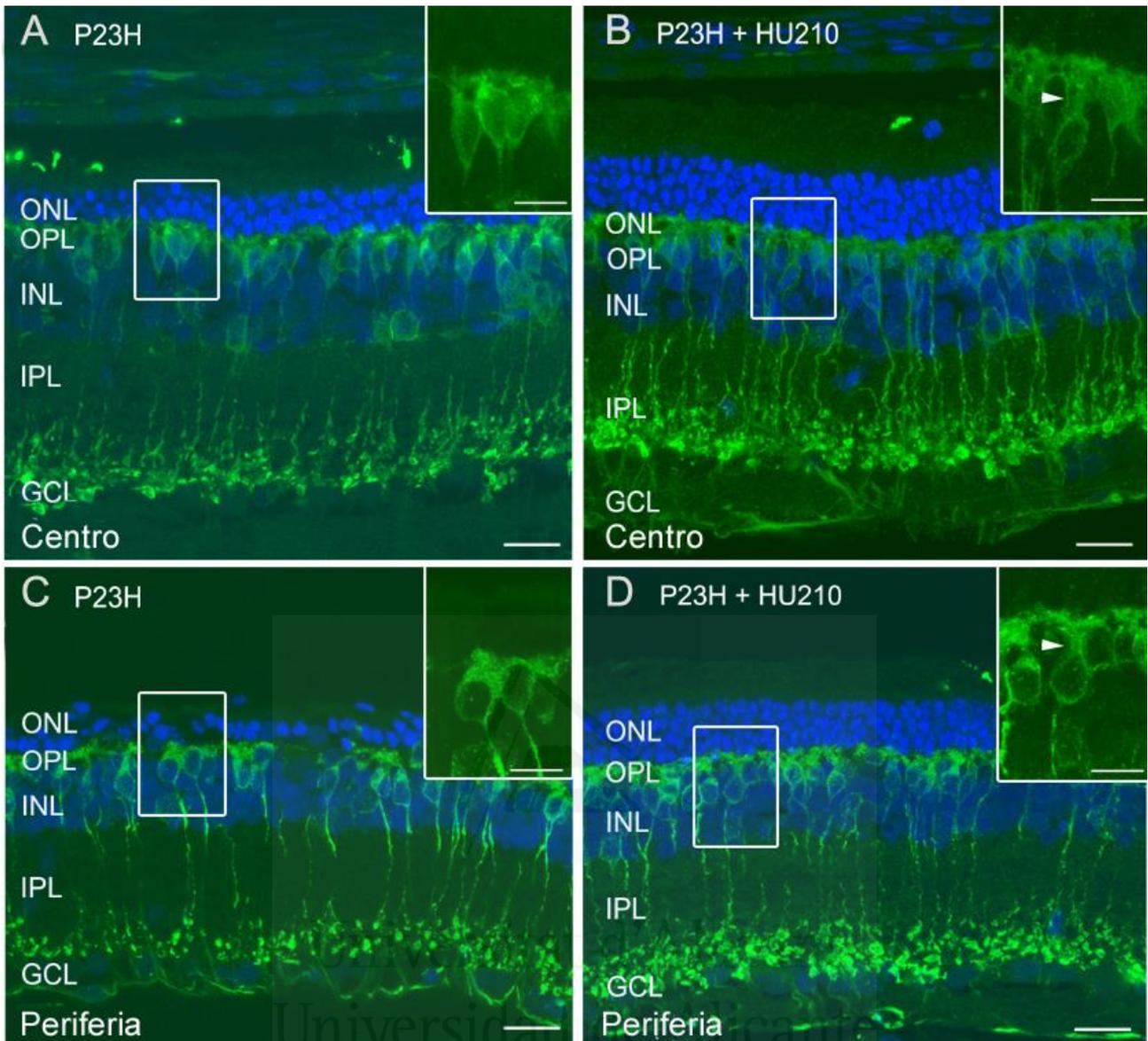


**Figura 48.** Área relativa de inmunomarcaje para SYP en la OPL de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra el área relativa en los terminales axónicos de la OPL (superficie positiva/mm de sección retinal) de ratas P23H tratada con HU210 (blanco) y ratas P23H tratada con vehículo (negro). \*\*\* Test t de Student,  $p < 0.001$ .

#### 4.3.2.3 HU210 PRESERVA LAS CÉLULAS BIPOLARES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS EN AMBAS CAPAS PLEXIFORMES.

Dado el estado de preservación morfológica y funcional de los fotorreceptores de las ratas P23H tratadas con HU210, con el fin de comprobar el estado de conservación de las células bipolares, realizamos inmunomarcaje para la isoforma  $\alpha$  de la proteína kinasa C. A P90, en las ratas del grupo tratado con HU210 el inmunomarcaje para PKC- $\alpha$  resultó ser más intenso en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ) (Figura 49).



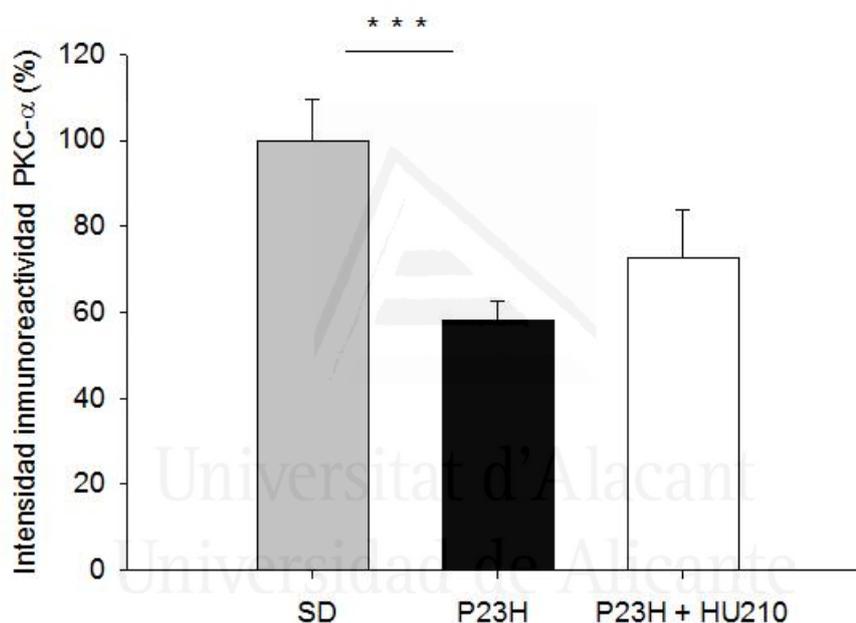
**Figura 49.** Terminales sinápticas de células bipolares tipo ON en la retina de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestran secciones verticales de retina central (A, B) y periférica (C, D) con inmunolocalización de PKC- $\alpha$  que evidencia las células bipolares tipo ON en ratas P23H tratadas con vehículo (A, C) y en P23H tratadas con HU210 (B, D). En alto a la derecha de cada imagen una magnificación del árbol dendrítico de una célula bipolar en la OPL. Los núcleos están marcados en azul. Se aprecia el cuerpo celular y dendritas (puntas de flecha) mejor preservadas en las ratas P23H tratadas con HU210 en zonas centrales y periféricas. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ , y 10  $\mu\text{m}$  en las magnificaciones.

En el grupo de ratas HU210 en general encontramos las células bipolares mejor alineadas y los axones más largos en la IPL, en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo, ya sea en zonas centrales de la retina como en periféricas. Las imágenes muestran los cuerpos celulares de las células bipolares de bastón con su morfología típica. Los somas de estas

células se muestran mejor preservados a lo largo de la retina, y la pérdida de cuerpos celulares es más contenida. Además, no se evidencian fenómenos de agrupación de las células bipolares que encontramos en las ratas P23H (Figura 49 B, E).

Para cuantificar la integridad de las células bipolares de bastón medimos, en la parte central de cada retina, la intensidad relativa de la inmunoreactividad para PKC- $\alpha$ . El grupo de animales tratado con HU210, a pesar de mostrar una inmunointensidad menor que las ratas SD (dicha diferencia no fue significativa), con un porcentaje de inmunoreactividad del 72.6% respecto de las SD (test t de Student,  $p < 0.001$ ), resultó tener una inmunoreactividad para PKC- $\alpha$  un 29% más alta que la obtenida en el grupo P23H tratado con vehículo (Figura 50).



**Figura 50.** Inmunoreactividad relativa para PKC- $\alpha$  de las células bipolares tipo ON en ratas SD (gris), P23H tratadas con vehículo (negro) y P23H tratadas con HU210 (blanco). \*\*\* Test t de Student,  $p < 0.001$ .

#### 4.3.2.4 HU210 PREVIENE LA PÉRDIDA DE CÉLULAS HORIZONTALES, DE SUS DENDRITAS Y CONTACTOS SINÁPTICOS CON LOS FOTORRECEPTORES

Dado que HU210 preserva fotorreceptores y células bipolares de la retina, con el fin de evidenciar su posible efecto sobre células horizontales de la retina, marcamos los tejidos retinianos con un anticuerpo para calbindina, un marcador de células horizontales, amacrinas

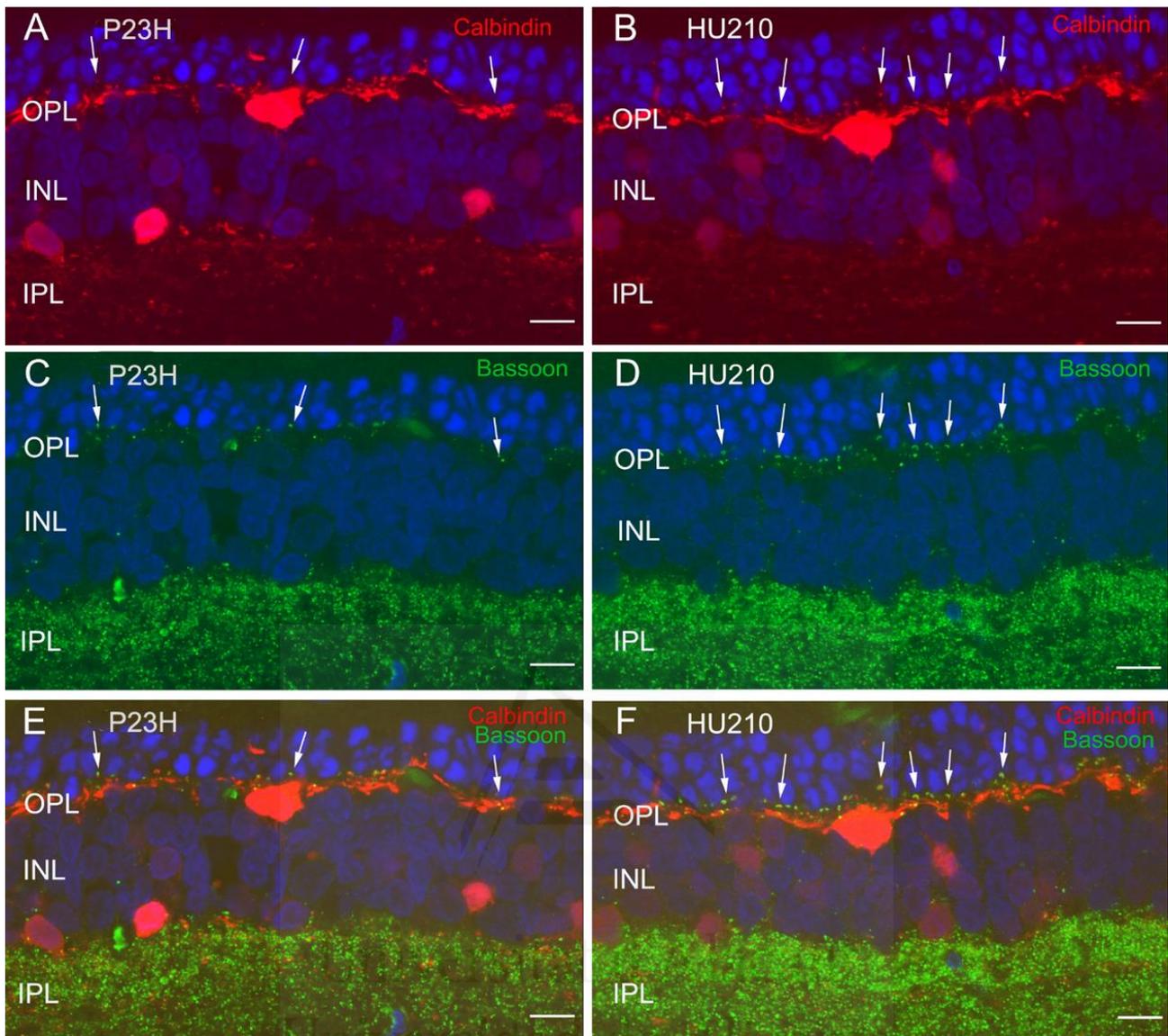
y ganglionares. La inmunotinción para CB marca el árbol dendrítico de las células horizontales, el cual protruye desde el cuerpo celular. El grupo de ratas P23H tratado con HU210 muestra un mayor número de cuerpos de células horizontales y más dendritas en comparación con el grupo P23H tratado con vehículo (Figura 51).

Con el fin de averiguar si las dendritas de las células horizontales siguen siendo funcionales y se preservan la actividad sinápticas entre células horizontales y fotorreceptores, realizamos inmunotinción combinada para calbindina y Bassoon. Las imágenes muestran cualitativamente el mayor número de conexiones entre fotorreceptores y células horizontales en la retina de ratas tratadas con HU210 en comparación con la retina de ratas P23H tratadas con vehículo (Figura 51, flechas).

Los resultados indican que HU210 previene la pérdida de células horizontales y de sus dendritas, a la vez que posibilita la preservación de las conexiones sinápticas con los fotorreceptores y el mantenimiento de las interacciones horizontales a nivel de OPL en la rata P23H.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**Figura 51.** Células horizontales y sus contactos con los fotorreceptores en ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

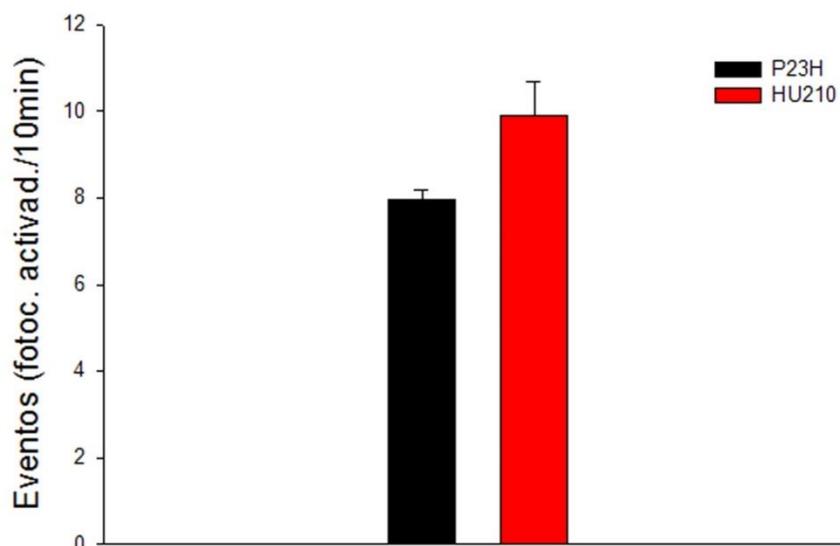
Se muestran secciones verticales de las células horizontales y sus contactos sinápticos con los fotorreceptores en ratas P23H tratadas con vehículo (A, C, E) y ratas P23H tratadas con HU210 (B, D, F). Los núcleos están marcados en azul. Las células horizontales son marcadas con anticuerpo para calbindina, mientras el anticuerpo para el Bassoon inmunolocaliza la cintilla sináptica de los fotorreceptores. Se aprecia el mayor número de contactos sinápticos (flechas) entre células horizontales y fotorreceptores en las ratas P23H tratadas con HU210. Todas las imágenes son tomadas de retina central, cerca del nervio óptico. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

#### *4.4. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA POR LA ADMINISTRACIÓN DE HU210.*

El sistema endocannabinoide está ampliamente difundido en el SNC. Su presencia ha impulsado una consistente investigación sobre su papel en varios comportamientos y conductas incluidas la actividad locomotora. El tratamiento crónico con HU210 nos proporcionó una valiosa posibilidad de comprobar si la administración de este cannabinoide sintético influye sobre la actividad motora de las ratas P23H.

Durante la última semana de tratamiento se realizaron registros de la actividad locomotora de ratas P23H tratadas vehículo y tratadas con HU210, con el fin de evaluar las posibles alteraciones de la misma causadas por el cannabinoide. Se registraron 5 ratas P23H tratadas con vehículo y 6 ratas P23H tratadas con HU210.

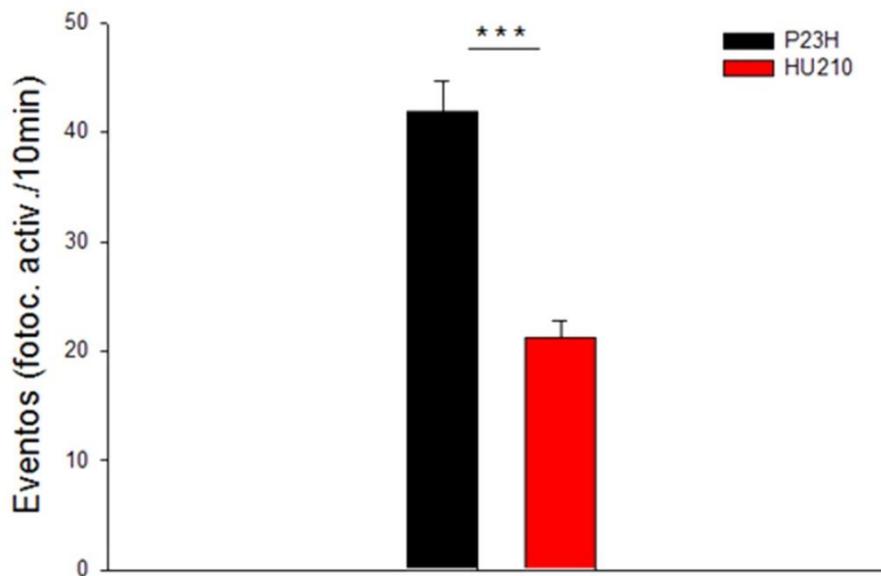
A nivel general, se observó que la actividad diaria de las ratas P23H de ambos grupos respondía a un patrón circadiano, mostrando una mayor actividad en las horas de oscuridad que en las de luz. Sin embargo, las ratas tratadas con HU210 tenían mayor actividad locomotora media en comparación con las ratas del grupo P23H tratadas con vehículo, aunque las diferencias no resultaron significativas (Figura 52). Estas diferencias estaban presentes tanto los días de administración del tratamiento (3 veces por semana), como los días de no administración, aunque en medida menor (datos no mostrados). Hay que tener en cuenta que la administración intraperitoneal (i.p.) durante largos periodos de tiempo determina un estado de estrés crónico en las ratas. Nuestro resultado no concuerda con la mayoría de la bibliografía consultada (Martin-Calderon, Munoz et al. 1998, Bosier, Sarre et al. 2010). Estudios anteriores han demostrado que los CBs producen, entre otros efectos agudos, catalepsia, que aparece a los 20 min tras la administración (Martin-Calderon, Munoz et al. 1998, Little, Compton et al. 1989a). Quisimos comprobar en nuestros animales los efectos agudos de la inyección de HU210 y tomamos los datos referentes a la primera hora sucesiva a la administración i.p. Nuestros resultados muestran que las ratas tratadas con HU210 tienen menor actividad motora tras la administración (-49,2%), en comparación con las ratas del grupo tratado con vehículo (test t de Student,  $p < 0.001$ ) (Figura 53).



**Figura 52.** Actividad locomotora media en ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra la actividad locomotora media de 5 ratas P23H tratadas con vehículo y de 6 ratas P23H tratadas con HU210, registrada durante una semana. Cada barra representa el número medio de eventos registrados: número de activaciones de la fotocélula/10 min.

Estos resultados muestran que tras más de 2 meses de tratamiento, existe el efecto de catalepsia aguda provocado por la administración del cannabinoide HU210. Las diferencias intragrupal podrían derivar del efecto en cada animal de factores genéticos y ambientales. Los resultados muestran que la primera hora después de la administración i.p. las ratas entraban en estado de catalepsia, con menor actividad motora. Este resultado confirma los datos de la bibliografía existente (Katsidoni, Kastellakis et al. 2013, Bosier, Sarre et al. 2010). Por otro lado, pudimos observar un cambio en la actividad motora también los días de no administración. En ausencia de estímulos externos, en los horarios que coinciden con la administración i.p. (alrededor de las 10:00 de la mañana), registramos una mayor actividad motora de las ratas de ambos grupos (datos no mostrados). No registramos actividad motora caracterizada por patrones de inquietud ni vocalizaciones anómalas. Sin embargo, durante las últimas semanas de tratamiento, observamos algún episodio epiléptico en las ratas tratadas con HU210.



**Figura 53.** Actividad locomotora durante la primera hora post-inyección en ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra la actividad locomotora de las ratas P23H tratadas con vehículo y tratadas con HU210 registrada durante la primera hora tras la inyección i.p. (número de activaciones de la fotocélula/10 min). Se puede evidenciar la menor actividad motora inducida por la administración de HU210. La actividad motora está contabilizada en eventos. \*\*\* Test t de Student,  $p < 0.001$ .

Los episodios ocurrían entorno de la hora de la inyección. A pesar de la observación no tenemos datos suficientes para explicar por qué se dan estos episodios. No podemos descartar ulteriores crisis durante todo el tratamiento, si bien, no encontramos exceso de viruta en el suelo, signo típico de actividad anormal de las ratas. No se registraron crisis epilépticas en los animales no tratados en los horarios cercanos a la inyección.

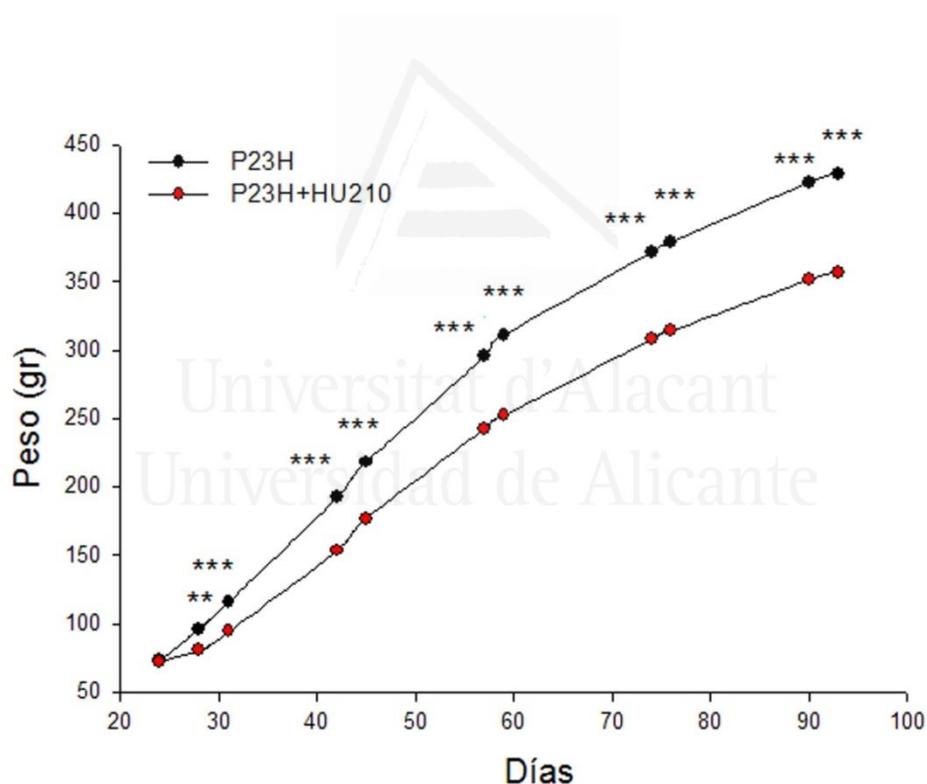
Las crisis epilépticas podrían estar relacionadas con el estrés debido a la inyección (Seyle 1936). No hemos encontrado bibliografía que asocie positivamente eventos epilépticos, CBs y tratamientos crónicos en esta especie animal. La bibliografía más reciente relaciona los CBs con un rol antiepiléptico y no concuerda con los eventos observados (Citraro, Russo et al. 2013, Rizzo, Carletti et al. 2014, Di Maio, Cannon et al. 2015).

#### 4.5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON HU210 SOBRE LA INGESTA Y EL PESO.

El sistema eCB está involucrado en la regulación de la ingesta alimenticia y modulación del peso (Higgs, Barber et al. 2005, Lipina, Irving et al. 2014). Nuestro diseño experimental nos permitió comprobar los eventuales efectos de la administración i.p. de HU210 sobre la ingesta de alimento, el consumo de agua y el peso corporal de cada animal durante los 67 días de tratamiento.

##### 4.5.1 CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL DE LAS RATAS TRATADAS CON HU210

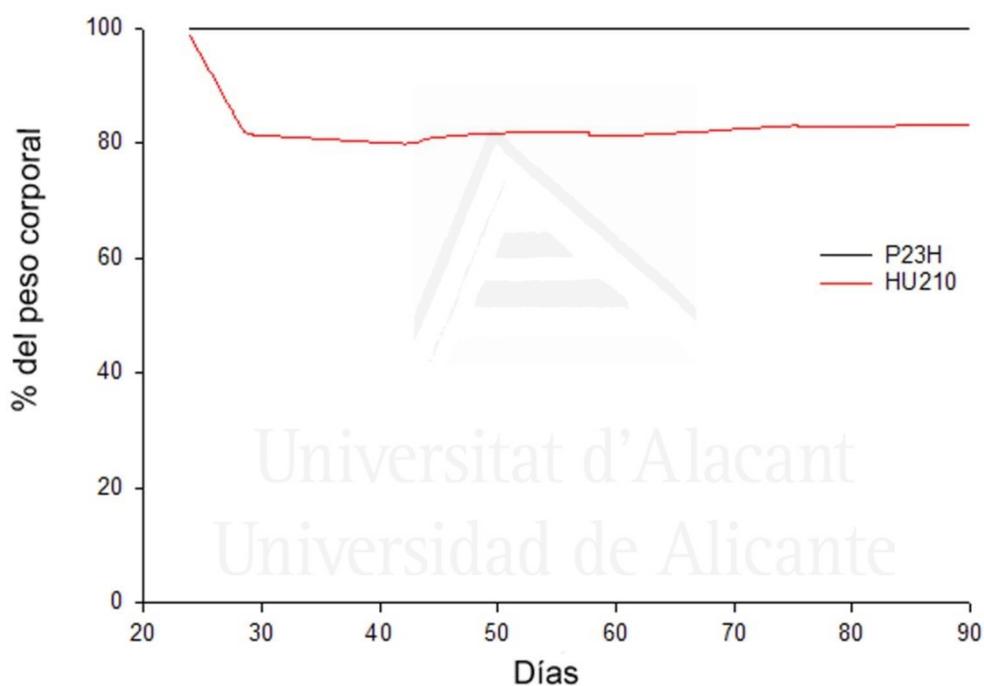
Nuestros resultados muestran que las ratas a las que se les ha inyectado HU210 presentaron un peso inferior en comparación con las ratas P23H durante y al final del tratamiento (Figura 54).



**Figura 54.** Peso corporal de las ratas P23H tratadas con vehículo y tratadas con HU210

Se muestra el efecto del tratamiento sobre el peso corporal de 5 animales P23H tratados con vehículo y 6 animales tratados con HU210. La administración de HU210 conllevó en los animales una diferencia de peso significativa a partir de la primera administración, la cual se mantiene durante todo el tratamiento. Test t de Student, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

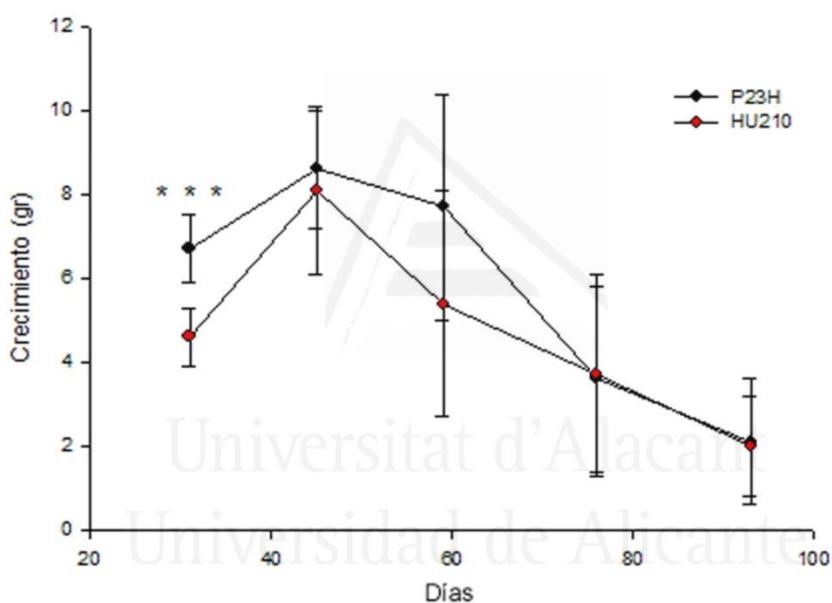
Es interesante notar que la diferencia de peso entre los dos grupos se manifestó nada más empezar la administración i.p. Nuestros resultados indican que entre la primera y la segunda administración hay una caída del peso de las ratas tratadas con HU210 del 15% en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo. Esta diferencia de peso se mantuvo a lo largo de todo el tratamiento. Las ratas del grupo tratado con HU210 alcanzaron a partir del 4º día de tratamiento un peso significativamente menor (test t de Student,  $p < 0.002$ ) que las ratas tratadas con vehículo. A P120, las ratas tratadas con HU210 alcanzan una media de peso del 82.13% respecto a las ratas P23H tratada con vehículo (Figura 55).



**Figura 55.** Porcentaje del peso corporal de ratas P23H tratadas con HU210 en relación a las tratadas con vehículo

Se muestra el efecto del tratamiento sobre el peso corporal de las ratas P23H tratadas con HU210 de P24 a P120, en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (%). A partir de P28 la diferencia de peso en términos de porcentaje se mantiene estable.

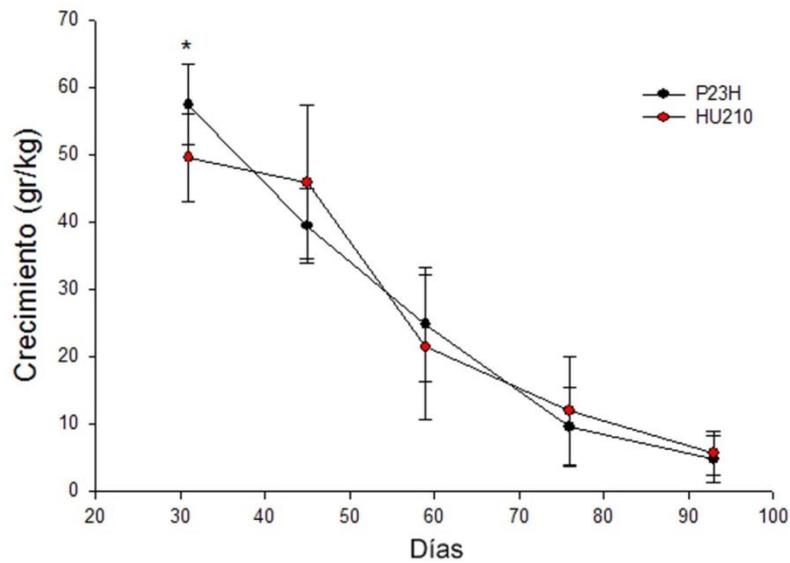
Los resultados indican que el crecimiento de las ratas tratadas con HU210 fue menor en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo. Hasta los 45 días de vida el crecimiento de las ratas se produce de forma rápida y creciente en ambos grupos. A raíz de la primera administración del tratamiento encontramos diferencias significativas en el crecimiento de las ratas tratadas con HU210 respecto a las P23H tratada con vehículo (test *t* de Student  $p < 0.001$ ) (Figura 56). El pico de crecimiento coincide en ambos grupo con el día P45. A partir de los 45 días de edad el crecimiento decae, y las ratas tratadas con HU210 siguen con un patrón de crecimiento inferior. A partir de los 76 días no hay diferencias en la curva de crecimiento de ambos grupos, expresada en gr/día.



**Figura 56.** Curva de crecimiento de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra el crecimiento de las ratas P23H tratadas con HU210 y de las ratas P23H tratadas con vehículo expresado en gr/día. En ambos grupos el pico de crecimiento ocurre a P45. \*\*\* Test *t* de Student,  $p < 0.001$ .

Si analizamos el crecimiento en términos relativos (gr/Kg/día), la tendencia varía. La curva de crecimiento expresada en gr/Kg/día disminuye a medida que pasan los días en ambos grupos (Figura 57). Este fenómeno es común en todos los roedores.



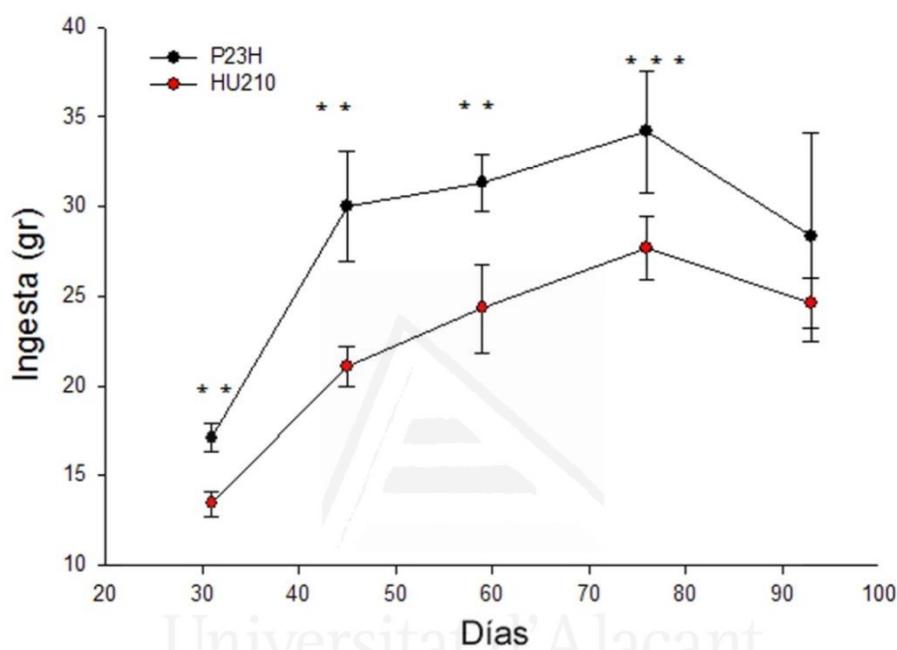
**Figura 57.** Curva de crecimiento de ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

Se muestra la curva de crecimiento de las ratas P23H tratadas con HU210 y tratadas con vehículo, expresadas en gr/Kg/día. La diferencia de crecimiento es significativa al inicio del tratamiento. \*Test t de Student,  $p < 0.05$ .

La administración de HU210 no cambia la tendencia de la curva de crecimiento. Se evidencian diferencias significativas en el crecimiento expresado como gr/Kg/día (test t de Student,  $p < 0.05$ ) entre las ratas tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo al comienzo del tratamiento, coincidiendo con la primera administración i.p. de HU210 (Figura 57). Anteriores estudios han demostrado que altas dosis de CBs pueden influir sobre el peso y el crecimiento en roedores en fase aguda y sub-crónica (Giuliani, Ferrari et al. 2000).

#### 4.5.1.1 CAMBIOS EN LA INGESTA Y EL CONSUMO DE AGUA DE LAS RATAS TRATADAS CON HU210.

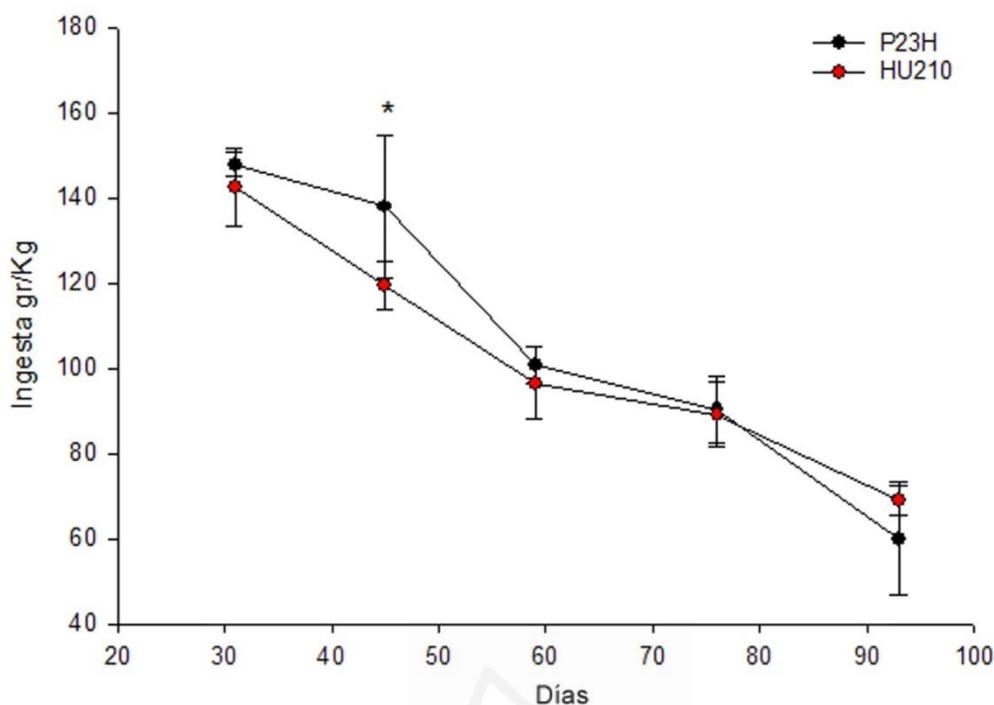
En cuanto a la ingesta de alimentos, pudimos comprobar el grupo de animales P23H tratado con HU210 ingieren menos alimentos (gr/día) en comparación con el grupo animales P23H tratado con vehículo a lo largo de todo el tratamiento (Figura 58).



**Figura 58.** Ingesta de las ratas P23H tratadas con vehículo o con HU210

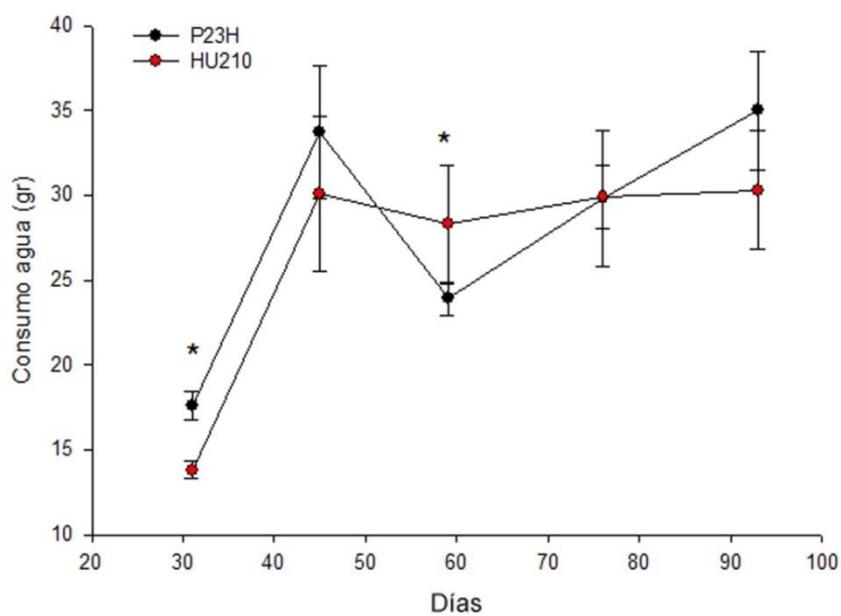
La gráfica muestra que la ingesta (expresado en gr/día) de las ratas P23H tratada con vehículo (negro) es mayor en comparación con las ratas tratadas con HU210 (rojo) a lo largo de todo el tratamiento. Test t de Student, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

Si la ingesta de alimento se expresa como gr/día aparecen diferencias significativas en el consumo de alimentos entre ambos grupos (test t de Student,  $p < 0.01$ , test t de Student,  $p < 0.001$ ) (Figura 58). Pero, al expresar el consumo de alimento como gr/Kg/día, solo se aprecian diferencias significativas en el consumo de alimentos tras dos semanas de tratamiento (test t de Student,  $p < 0.05$ ) (Figura 59). Después de un mes de tratamiento el consumo vuelve a ser similar en ambos grupos. Resultados similares fueron observados en anteriores estudios con la administración de la misma dosis de HU210 (Giuliani, Ottani et al. 2000).

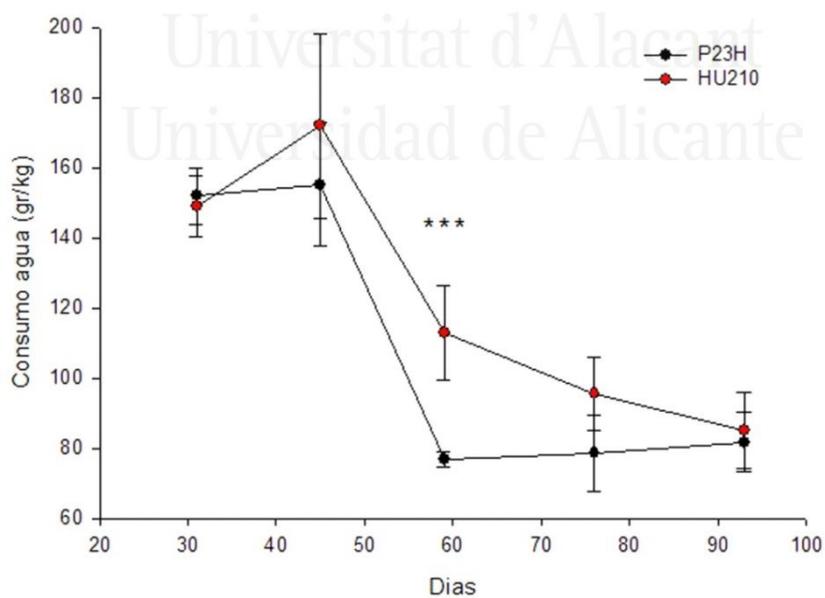


**Figura 59.** Ingesta de alimento de las ratas P23H tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo (gr/Kg/día), \* Test t de Student,  $p < 0.05$ .

Respecto a la cantidad de agua consumida por las ratas durante el tratamiento, se observaron diferencias significativas al inicio del tratamiento (P30) donde las ratas P23H tratadas con vehículo bebieron más agua (test t de Student,  $p < 0.05$ ) (Figura 60). Después de un mes de tratamiento (P54), la cantidad de agua ingerida por las ratas tratadas con HU210 fue significativamente mayor en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ). Si el consumo de agua se expresa en gr/Kg/día existen diferencias significativas en el consumo de agua del grupo tratado con HU210 en comparación con el grupo P23H tratado con vehículo. El grupo tratado con HU210 consume más agua (test t de Student,  $p < 0.05$ ) en términos relativos a lo largo del periodo P54 a P73, que corresponde aproximadamente a un tercio del tratamiento (Figura 61).



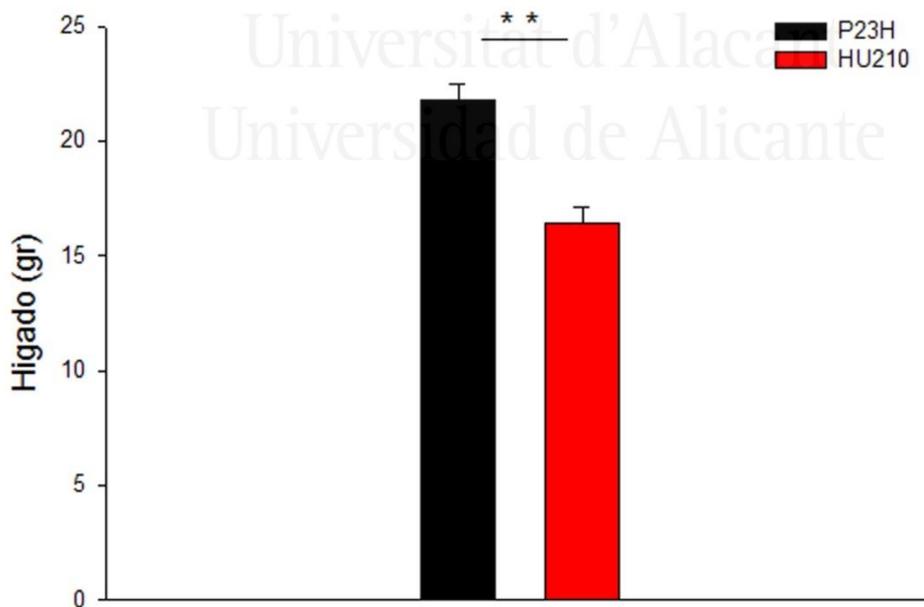
**Figura 60.** Consumo de agua por las ratas P23H tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo. \* Test t de Student, \*  $p < 0.05$



**Figura 61.** Consumo de agua de las ratas P23H tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo.\* Test t de Student,  $p < 0.001$

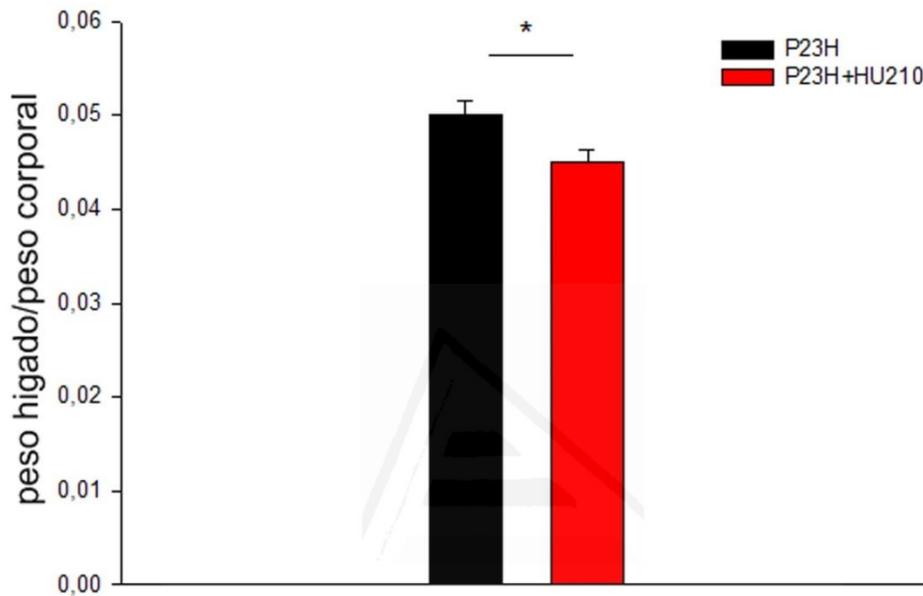
La administración aguda y crónica de CBs puede producir algunos efectos sobre el sistema endocrino e hipotalámico que podrían justificar los efectos anorexigenicos y/o reconducir la pérdida de peso a factores de estrés (Kubena, Perhach et al. 1971, Donohoe 1984). Otros estudios apuntan a posibles lesiones gastrointestinales determinadas por la administración de CBs en altas dosis, lo cual justificaría la pérdida de peso (Dewey 1986).

Debido a los efectos de la administración de HU210 sobre la ingesta y el crecimiento, quisimos comprobar si el tratamiento con HU210 tenía algún efecto sobre el hígado. La bibliografía indica que los CBs podrían participar en la modulación de la función hepática (Mallat, Lotersztajn 2008, Mallat, Lotersztajn 2010). Un indicador de posibles efectos del compuesto sobre el hígado consiste en determinar el peso del órgano en cuestión, en términos absolutos y relativos, en animales tratados y controles (Bailey, Zidell et al. 2004). Nuestros resultados indican que el peso de los hígados de las ratas P23H tratadas con HU210 era menor en comparación con el de las ratas P23H tratadas con vehículo. El peso medio de los hígados de los animales tratados con HU210 fue de  $16.4 \pm 0.6$  gr, en comparación a los animales no tratados donde el peso medio resultó ser de  $21.8 \pm 0.7$  gr (Figura 62). En termino relativo el peso de los hígados de los animales tratado con HU210 alcanzó el 84.2% del de los animales tratados con vehículo.



**Figura 62.** Representación gráfica del peso de los hígados de las ratas P23H tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo. \*\* Test t de Student,  $p < 0.01$ .

Si expresamos el peso de los hígados en relación al peso de los animales, encontramos que el peso y tamaño relativo de los hígados también era menor en los animales tratados con HU210, en relación con el valor obtenido en las ratas tratadas con vehículo (test t de Student,  $p < 0.05$ ). En términos relativos la ratio peso hígado/peso animal de los animales tratados con HU210 fue el 88.2% del valor obtenido analizando los animales P23H tratados con vehículo (Figura 63).



**Figura 63.** Ratio peso hígado/peso animal de las ratas P23H tratadas con HU210 y las ratas P23H tratadas con vehículo.\* Test t de Student,  $p < 0.05$

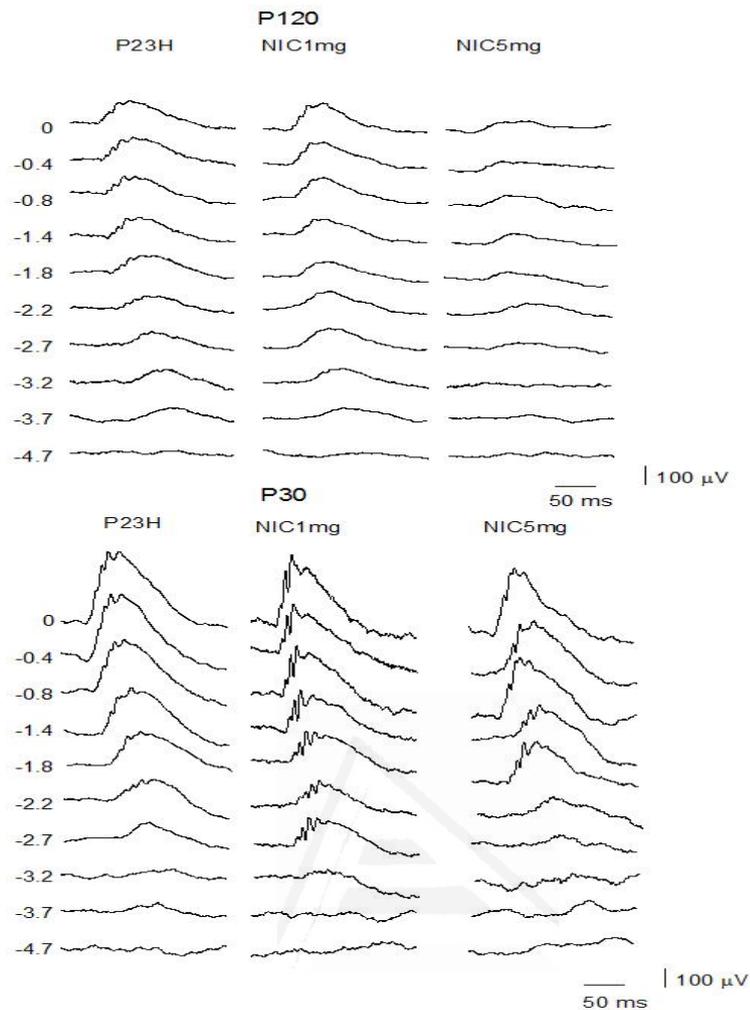
#### 4.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA SOBRE LA RESPUESTA VISUAL EN RATAS P23H.

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de nicotina sobre la degeneración de la retina de ratas P23H, se obtuvieron los registros electroretinográficos de 6 ratas P23H tratadas con nicotina 1 mg/Kg/día (N1mg), 6 ratas P23H tratadas con nicotina 5 mg/Kg/día (N5mg) y 7 ratas P23H tratadas con vehículo. Todos los ERGs se obtuvieron en condiciones escotópicas a las edades P30 y P120.

Los resultados obtenidos se muestran en los registros electroretinográficos representativos a P30 y P120 de una rata P23H tratada con vehículo, una rata P23H tratada con N1mg y una rata P23H tratada con N5mg (Figura 64).

En los ERGs a P30, con 9 días de tratamiento, en las ratas tratadas con N1mg se observó una disminución estadísticamente significativa (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ) en la amplitud de la onda *b* (*b* máxima:  $382.1 \pm 32.5 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H no tratadas (*b* máxima:  $468.6 \pm 19.2 \mu\text{V}$ ) (Figura 64). La amplitud media de la onda *b* máxima registrada en el grupo tratado con N1mg resultó a ser el 80.7% de la amplitud media de la onda *b* máxima de las ratas P23H no tratadas. A esa edad, la amplitud de la onda *a* no mostró diferencias significativas entre ratas P23H tratadas con N1mg (*a* máxima:  $48 \pm 11.4 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas del grupo P23H no tratado (*a* máxima:  $46.4 \pm 3.7 \mu\text{V}$ ).

En las ratas tratadas con N5mg, se observó a P30 una disminución estadísticamente significativa (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ) en la amplitud de la onda *b* (*b* máxima:  $378.1 \pm 31.5 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H no tratadas (*b* máxima:  $468.6 \pm 19.2 \mu\text{V}$ ). La amplitud media de la onda *b* máxima registrada en el grupo N5mg resultó a ser el 81.5% de la amplitud de la onda *b* máxima de las ratas P23H no tratadas (Figura 64, Tabla 10). La amplitud de la onda *a* no mostró diferencias significativas entre ratas P23H tratadas con N5mg (*a* máxima:  $55.2 \pm 17.4 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (*a* máxima:  $46.4 \pm 3.7 \mu\text{V}$ ). No encontramos diferencias significativas entre las amplitudes de las ondas *a* y *b* de los animales tratados con nicotina a diferentes concentraciones. La relación entre la administración de nicotina y la disminución de la onda *b* en condiciones escotópica ha sido demostrada en anteriores estudios (Varghese, Reid et al. 2011). Las diferencias encontradas posiblemente son debidas a los efectos agudos de la nicotina en los animales.



**Figura 64.** Electrorretinogramas de ratas P23H tratadas con vehículo o con nicotina

ERGs representativos registrados en condiciones escotópicas a P120 y P30 de ratas P23H tratadas con vehículo y a las dosis N1mg y N5mg. A la izquierda del gráfico se indica la intensidad del estímulo en  $\log \text{cd s m}^{-2}$ .

A P120, en las ratas tratadas con N1mg no se observaron diferencias significativas en la amplitud de la onda *b* (*b* máxima:  $132.9 \pm 29.7 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo (*b* máxima:  $136.6 \pm 24.3 \mu\text{V}$ ). En las ratas tratadas con N5mg tampoco se observaron diferencias significativas en la amplitud de la onda *b* (*b* máxima:  $121.3 \pm 31.1 \mu\text{V}$ ) en comparación con las ratas P23H tratadas con vehículo y tampoco con las tratadas con N1mg. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la amplitud de la onda *a* de los grupos tratados con nicotina en las diferentes dosis y el grupo tratado con vehículo (Figura 64, Tabla10).

ERG	Escotópico		Escotópico	
Onda	<i>a</i>		<i>b</i>	
Tiempo	P30	P120	P30	P120
P23H	46.4 ± 3.7	9.6 ± 2.4	468.6 ± 19.2	136.6 ± 24.3
N1mg	48 ± 11.4	9.3 ± 3	382.1 ± 32	132.9 ± 29.7
N5mg	55.2 ± 17.4	10.7 ± 2.8	378.1 ± 31.5	121.3 ± 31.1

**Tabla 10.** Amplitud máxima de las ondas *a* y *b* de ratas P23H tratadas con vehículo o con nicotina

La tabla muestra la amplitud máxima ± EEM ( $\mu V$ ) promediada de las ondas *a* y *b* de 7 ratas P23H tratadas con vehículo, 6 ratas P23H tratadas con nicotina N1mg (1mg/Kg/día) y 6 ratas P23H tratadas con N5mg (5 mg/Kg/día).

Con el fin de eliminar el posible efecto agudo de la nicotina sobre la respuesta visual, y poder evaluar así un posible efecto neuro-protector de la nicotina, normalizamos los resultados obtenidos a P120, comparándolos con lo registrado a P30. Aplicamos las ecuaciones:  $100 \times \text{onda } b \text{ a P120} / \text{onda } b \text{ a P30}$ , y  $100 \times \text{onda } a \text{ a P120} / \text{onda } a \text{ a P30}$ .

Los valores normalizados de respuesta visual mostraron que las ratas P23H tratadas con N1mg presentaban mayor amplitud relativa en la onda *b* que las ratas P23H no tratadas (ANOVA, test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ) (Tabla 11).

Los valores normalizados de onda *b* de las ratas P23H tratadas con N5mg no resultaron significativamente distintos de los obtenidos en las ratas P23H no tratadas. Los valores normalizados de onda *a* no mostraron diferencias significativas entre los animales tratados con nicotina y los tratado con vehículo. Estos resultados podrían indicar que la administración crónica de bajas dosis de nicotina ejerce un posible efecto neuro-protector en la degeneración retiniana de ratas P23H. Sin embargo, debido a que estos efectos resultan moderados, y solo evidentes tras la normalización de los registros, creemos necesaria la confirmación de los

resultados mediante la realización de nuevos experimentos en los que se evite el posible efecto agudo de la nicotina durante la realización de los electroretinogramas.

ERG		Escotópico	
Onda		<i>b</i>	
Tiempo	P30	P120	Normalizado
P23H	468.6 ± 19.2	136.6 ± 24.3	29.8 ± 5.9%
N1mg	382.1 ± 32	132.9 ± 29.7	37.5 ± 9.2%
N5mg	378.1 ± 31.5	121.3 ± 31.1	32.9 ± 10%

**Tabla 11.** Amplitud máxima y normalizada de las ondas *b* de ratas P23H tratadas con vehículo o con nicotina

Se indica la amplitud media máxima ( $\mu\text{V}$ ) y normalizada (P120 vs. P30) de las ondas *b* de 7 ratas P23H tratadas con vehículo y de 6 ratas P23H tratadas con nicotina a las concentraciones de 1 mg/Kg/día (N1mg) y 5 mg/Kg/día (N5 mg).

## 5. DISCUSIÓN

Estudios previos han mostrado que algunos factores neurotróficos y neuroprotectores tienen el potencial para ralentizar la degeneración de la retina en modelos animales (Green, Rendahl et al. 2001, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a, Okoye, Zimmer et al. 2003). Dentro del grupo de sustancias con acción neuroprotectora, los CBs se han postulado como un grupo de sustancias con potencial terapéutico en relación a las enfermedades de la retina.

### 5.1. CAMBIOS FUNCIONALES EN LA RETINA DE RATAS P23H Y EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CANNABINOIDE HU210

En este trabajo hemos detectado que la degeneración retiniana de las ratas P23H inicia a edad temprana. La mutación P23H cursa con una degeneración parecida a la observada en seres humanos (Machida, Kondo et al. 2000a). En los estudios previos realizados, los registros electroretinográficos de las ratas P23H mostraban una respuesta visual baja e inferior, como era de esperar, a la de las ratas SD (Lax, Ojalora et al. 2011, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a). En nuestro estudio, la amplitud de las ondas *a* y *b* registradas a P30, P60 y P90 en las ratas P23H tratadas con vehículo son inferiores en comparación a las obtenidas en ratas SD, de manera que la mutación deja patente sus efectos sobre la respuesta electroretinográfica a todas las edades analizadas en este estudio. Nuestros resultados muestran que la disminución de la onda *a* y *b* iba acompañada por el aumento de la latencia media de respuesta y el aumento del umbral de sensibilidad. La menor amplitud de la onda *a* en las ratas P23H concuerda con los hallazgos morfológicos en la ONL, donde encontramos pocas filas de fotorreceptores respecto a las 10-12 filas normalmente presentes en ratas silvestres SD (Garcia-Ayuso, Ortin-Martinez et al. 2013, Garcia-Ayuso, Salinas-Navarro et al. 2010). La pérdida de fotorreceptores tipo bastón, población mayoritaria en la retina de rata, podría justificar la menor onda *a* en las ratas P23H (Machida, Kondo et al. 2000a, Pinilla, Lund et al. 2005, Cuenca, Pinilla et al. 2004). La amplitud de la onda *b* se asocia, en buena parte, a la actividad de las células bipolares, de tal manera, que la pérdida de células bipolares, mayoritariamente de bastones, y de la conectividad sináptica a nivel de las capas plexiformes en los animales P23H, podría explicar, en buena parte, la menor amplitud de la onda *b* y el aumento de la latencia media de respuesta de dicha onda (Cuenca, Pinilla et al. 2004, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2011). Estudios previos han puesto en evidencia que los

CBs pueden atenuar daños neuronales de orígenes diferentes (Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Pertwee 2012, van der Stelt, Veldhuis et al. 2002, van der Stelt, Di Marzo 2005, Zogopoulos, Vasileiou et al. 2013). La presencia del sistema eCB en la retina ha sido demostrada (Cecyre, Zabouri et al. 2013, Zabouri, Bouchard et al. 2011). Los CBs han sido estudiados en relación con isquemias causadas por incremento de la presión ocular (Nucci, Bari et al. 2008, Pinar-Sueiro, Zorrilla Hurtado et al. 2013, Crandall, Matragoon et al. 2007). Otros estudios han mostrado los efectos neuroprotectores de los CBs en la retina (Yazulla 2008). Además, los agonistas del receptor CB1r protegen contra los efectos de excitotoxicidad por sobreproducción de glutamato (El-Remessy, Khalil et al. 2003a, Opere, Zheng et al. 2006). En nuestros resultados observamos que la administración i.p. de HU210 se asocia con una mejora de la actividad funcional, mostrada a través de los registros electroretinograficos de la retina. En primer lugar hemos observado que la administración de HU210 mejora la amplitud de los registros electroretinograficos (onda *a* y *b*). Recientes estudios han puesto de manifiesto la influencia del sistema eCB en la respuesta visual. La activación de los CBs participa en la modulación de la neurotransmisión de los fotorreceptores, y podría influenciar las conexiones sinápticas de las células bipolares, incluido el tráfico vesicular (Cecyre, Zabouri et al. 2013). No conocemos estudios previos que hayan puesto de manifiesto la preservación de los ERGs asociado a la administración de HU210, por lo que nuestros resultados adquieren más relevancia. La mayor amplitud de las ondas *a* y *b* en ratas P23H tratadas con HU210 iba acompañada de la preservación del umbral de sensibilidad y del tiempo implícito de respuesta. Las mejoras en la onda *b* de los ERGs fueron análogas a las observadas en la onda *a*. La ratio onda *b/a* puede ser útil a localizar las estructuras más afectadas (Perlman 1983), aunque entender el significado en términos estructurales de la ratio onda *b/a* es arduo. Los procesos degenerativos a nivel celular entre fotorreceptores y neuronas secundarias son dinámicos y las interacciones en estado patológico entre las varias neuronas no han sido aclaradas.

Decidimos realizar solo registro escotópico por dos motivos: porque en anteriores estudios realizados por nuestro grupo los resultados fotópicos a P90 no se mostraron interesantes, y porque en estadios relativamente tempranos de RP las alteraciones morfológicas y funcionales afectan principalmente a la vía escotópica, debido a la pérdida mayoritaria de bastones. Sin embargo, los resultados morfológicos obtenidos sugieren que puede resultar interesante analizar también la respuesta fotópica, evaluando así posibles efectos neuroprotectores de HU210 sobre la población de conos.

## *5.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA RETINA DE RATAS P23H Y EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CANNABINOIDE HU210*

Los resultados a nivel funcional se ven reforzados por los análisis morfológicos llevados a cabo. El aumento en la amplitud de las ondas *a* y *b* en condiciones escotópicas va acompañado de un aumento (o preservación) del espesor de la ONL. En ese sentido, otros estudios encontraron una correlación positiva entre el espesor de la ONL y la amplitud de las ondas *a* y *b* (Esteve-Rudd, Fernandez-Sanchez et al. 2011). Además, ha sido encontrada una correlación positiva entre el número de filas de fotorreceptores de la ONL y la amplitud de la onda *b* en ratas P23H (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a). En este contexto, nuestros resultados muestran una correlación positiva entre el mayor espesor de la ONL y la mayor amplitud de la onda *b* en ratas P23H tratadas con HU210. De manera que, el mayor número de fotorreceptores permitiría explicar el aumento en la amplitud de la onda *a* en las ratas tratadas con HU210.

### *5.2.1 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210 SOBRE LOS FOTORRECEPTORES*

La retina externa es la primera zona de la retina en mostrar los signos degenerativos en RP, por lo que centramos nuestra atención en la morfología y funcionalidad de los fotorreceptores. En la retina de ratas P23H, hemos observado una disminución en el número de fotorreceptores, así como una reducción de la conectividad sináptica con sus células postsinápticas: las neuronas horizontales y las bipolares. El marcaje con TO-PRO-3 puso de manifiesto la drástica disminución de las filas de fotorreceptores en la ONL de las ratas P23H a todas las edades consideradas. Estos resultados a nivel estructural se ven reforzados por los análisis funcionales llevados a cabo mediante los registros electrorretinográficos en las mismas edades. Además, anteriores estudios confirman que la ONL se reduce a 3-4 filas de fotorreceptores en sólo 40 días de edad, y análisis a P270 muestran sólo algún fotorreceptor esporádico (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Nuestros resultados permiten confirmar que la mutación P23H afecta en primera instancia a la estructura y función de la retina externa. En las ratas P23H encontramos una pérdida primaria de bastones (población mayoritaria). El inmunomarcaje para la recoverina (Cuenca, Pinilla et al. 2004) y para la rodopsina (Pinilla, Cuenca et al. 2007) pone de manifiesto la drástica reducción de bastones en nuestros animales. Por otra parte, los fotorreceptores que quedaron mostraron segmentos externos e internos en mal estado morfológico. Diferentes estudios sobre el modelo P23H muestran la

desestructuración de la ONL (Garcia-Ayuso, Ortin-Martinez et al. 2013, Cuenca, Pinilla et al. 2004), además de que en estadios tempranos los bastones y conos se muestran irregulares con segmento externo truncado. Cambios similares se han observados en cultivo humano de neuroretina (Fernandez-Bueno, Fernandez-Sanchez et al. 2012) y en estudios en RP (Martinez-Navarrete, Seiler et al. 2011, Pinilla, Cuenca et al. 2007).

Posteriormente a la muerte masiva de las células tipo bastón se puede observar el mismo proceso, aunque de manera paulatina, en los conos, como pusieron de manifiesto los inmunomarcajes para recoverina y para  $\gamma$ -transducina. En las ratas P23H, los fotorreceptores tipo cono estaban morfológicamente dañados, sin la presencia de la estructura axónica y con el pedículo sináptico unido directamente al cuerpo celular. Nuestros resultados confirman que en la RP, después de la muerte de los bastones, los conos experimentan la progresiva reducción de su tamaño, acompañado de la pérdida de la morfología y de un progresivo acortamiento de los segmentos externo e interno, además de alteraciones estructurales en el terminal axónico (Chrysostomou, Stone et al. 2008, Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014).

Estudios previos han demostrado que en el modelo P23H los conos degeneran posteriormente a los bastones (Garcia-Ayuso, Ortin-Martinez et al. 2013, Chrysostomou, Valter et al. 2009, Chrysostomou, Stone et al. 2009, Chrysostomou, Stone et al. 2008). De manera que el estado morfológico y funcional de los conos depende de la tasa de supervivencia de los bastones, en resumen de la tasa degenerativa. En consecuencia, el proceso degenerativo cursa de modo distinto para los dos tipos de fotorreceptores, comprobándose que los bastones degeneran considerablemente más rápido que los conos. Un patrón semejante se ha descrito en pacientes humanos afectados por retinosis pigmentaria (Milam, Li et al. 1998).

Se piensa que la apoptosis de las células tipo bastón altera de alguna manera el normal proceso de muerte de las células tipo cono, existen diferentes opiniones sobre el desarrollo de este fenómeno.

Algunos hipotetizan que la muerte posterior de los conos podría estar predeterminada genéticamente. Otros estudios apuntan que la muerte de los bastones impide la secreción de factores neurotróficos para los conos (Leveillard, Mohand-Said et al. 2004) o que la muerte de los bastones determina un estrés oxidativo para los conos (Stone, Maslim et al. 1999). Algunos estudios asocian los procesos degenerativos de los bastones a la producción de señales de muerte celular o de carácter tóxico, los cuales desde los bastones se transmitirían localmente por permeabilidad entre uniones celulares a las células colindantes (Ripps 2002). Otros

estudios teorizan que a consecuencia de la muerte celular de los bastones la desestructuración de la retina y la degeneración coroidal que la acompaña impiden progresivamente la capacidad de sustentar la vida de los conos (Marc, Jones 2003, Marc, Jones et al. 2003, Bovolenta, Cisneros 2009). En contra de esta hipótesis, se ha observado que en el caso de RP con mutación específica de conos, éstos degeneran hasta la muerte, pero los bastones, a pesar de la muerte de sus “vecinos”, sobreviven mucho más tiempo. Esto sugiere que la reacción general a la degeneración de la retina no es suficiente para justificar la pérdida de fotorreceptores (Bovolenta, Cisneros 2009). Es probable que haya algún mecanismo específico intrínseco a la muerte celular de los bastones aún por descubrir que predispone la muerte de los conos.

En cualquier caso, parece sensato afirmar que el rescate de los fotorreceptores tipo bastón tiene un efecto positivo sobre la preservación de los fotorreceptores tipo cono. En este sentido, el EPR localizado entre los fotorreceptores y la capa vascular suministra nutrientes y oxígeno a la retina externa y fagocita los residuos proteicos de los segmentos externos, asegurando su continua renovación. Este intercambio lo permiten un amplio número de contactos establecidos principalmente entre EPR y los bastones, siendo este tipo celular el 95% del número total de fotorreceptores en mamíferos (Bovolenta, Cisneros 2009). En cualquier caso, parece que los fotorreceptores tipo bastón son necesarios a la homeostasis general de la retina.

En general, encontramos que el tratamiento crónico con HU210 en los animales P23H disminuye la tasa de pérdida de ambos fotorreceptores (bastones y conos), preservándose las características morfológicas de los fotorreceptores. No comparamos un eventual cambio en la tasa de supervivencia de los dos tipos de fotorreceptores sucesivamente al tratamiento. Queda pendiente para ulteriores estudios.

El cannabinoide HU210 muestra un efecto neuroprotector. El número de filas de fotorreceptores “supervivientes” posteriores al tratamiento resulta ser mayor, con resultados positivos parecidos a otras sustancias neuroprotectoras investigadas por nuestro grupo (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012b, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2012a, Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2011, Lax, Ojalora et al. 2011, Lax, Esquivá et al. 2012). En general la tasa degenerativa de los fotorreceptores resulta ser ralentizada por HU210. HU210 logra preservar la estructura y el número de los fotorreceptores comparado con los animales P23H tratados con vehículo, además la preservación de los bastones está en concordancia con la mayor amplitud de las ondas *a* registradas con las técnicas electroretinográficas.

HU210 obtiene una buena preservación de los fotorreceptores tipo bastón, la cual va unida a una mejor preservación de los conos en los animales P23H tratados con HU210. Los fotorreceptores tipo cono del grupo tratado con HU210 muestran mayor longitud, presentan su forma típica, con segmentos externo e interno identificables, se preserva el terminal axónico y el pedículo mantiene su forma típica. Un posible mecanismo de acción directa de HU210 que podría favorecer la preservación parece estar relacionado con la inhibición de las sinapsis glutamatergicas a través del CB1r que limita los efectos de la excitotoxicidad por Glutamato (Ramirez-Franco, Bartolome-Martin et al. 2014).

### *5.2.2 CAMBIOS EN LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS BIPOLARES, EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210*

La retina externa es la primera zona de la retina en mostrar los signos degenerativos de la RP. En nuestro estudio, no solo estudiamos la morfología y funcionalidad de los fotorreceptores, sino también los efectos de HU210 sobre la degeneración de las conexiones sinápticas de los mismos con las neuronas secundarias de la retina. Con este fin, empleamos anticuerpos contra Bassoon, que es una proteína constituyente del pedículo de los conos y de la esférula de los bastones. A los 90 días de vida, la disminución de la inmunorreactividad pone de manifiesto la menor presencia de la proteína Bassoon en las ratas P23H, en comparación con las ratas SD, Se evidencian elementos sinápticos degenerados, mientras pudimos observar un parcial grado de preservación de la sinapsis en las ratas P23H tratadas con HU210, donde se evidenció mayor presencia de Bassoon como confirmación del mejor estado de la sinapsis. Los marcajes inmunohistoquímicos utilizados nos mostraron que la degeneración de la ONL está acompañada también por la degeneración de las sinapsis en la OPL en el modelo P23H.

En otros modelos animales de degeneración retiniana se ha observado la alteración de la cintilla sináptica de los fotorreceptores tipo bastón (Lopez-del Hoyo, Fazioli et al. 2012, Fuchs, Scholz et al. 2012). En un reciente estudio de nuestro grupo encontramos alteraciones en la cintilla sináptica en el modelo de RP con animales Royal College Surgeon (RCS), donde se evidenciaba la pérdida de contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las dendritas de células bipolares y horizontales (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2013). Esta retracción dendrítica también ha sido descrita en otras enfermedades degenerativas como la AMD (Sullivan, Woldemussie et al. 2007b). La pérdida de sinapsis de los fotorreceptores tipo bastón

es evidente también en el desprendimiento de retina en modelos animales y en humanos (Fisher, Lewis et al. 2005, Lewis, Linberg et al. 1998, Fariss, Li et al. 2000)

En la retina de ratas, las esférulas de los fotorreceptores tipo bastón establecen conexiones sinápticas con terminales dendríticas de células bipolares ON a través de un amplio árbol dendrítico en la OPL. En los animales P23H el proceso degenerativo en la OPL es difuso, la distribución de las sinapsis es irregular y desorganizada, y existe menor inmunoreactividad, con zonas periféricas de la retina que parecen carecer de sinapsis. En anteriores estudios se ha observado la pérdida en número y complejidad de terminales sinápticas en la OPL (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Se ha propuesto que la pérdida de señales procedentes de las células fotorreceptoras es la causa de la degeneración del árbol dendrítico de la célula bipolar de bastón (Strettoi, Pignatelli et al. 2003). En general, las alteraciones en la terminal sináptica conllevan seguidamente alteraciones en las neuronas postsinápticas, en particular células bipolares y horizontales.

El marcaje para PKC-  $\alpha$  en la retina de rata evidencia las células bipolares de bastones (Cuenca y cols. 2004), aunque esta proteína marca también células ganglionares, amacrinas y células del EPR. Aunque su función no está completamente conocida, algunos estudios asocian esta proteína con la modulación de la neurotransmisión por Glu, y parece de suma importancia en el cambio entre visión fotópica y escotópica (Ruether, Feigenspan et al. 2010).

Estudios previos han descrito una reducción del número de células bipolares positivas a PKC-  $\alpha$  en ratas P23H de edades comprendidas entre P150 y P270, si bien no se ha cuantificado la magnitud de esta pérdida (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Cambios morfológicos en las células bipolares de bastón similares a los registrados en nuestro modelo de degeneración se han puesto de manifiesto en ratones rd1 (Strettoi, Pignatelli 2000, Strettoi, Pignatelli et al. 2003), rd10 (Barhoum, Martinez-Navarrete et al. 2008, Gargini, Terzibasi et al. 2007) y crx-/- (Pignatelli, Cepko et al. 2004). Dichos cambios siguen, con algunas excepciones, un patrón común consistente en pérdida o alteración de la conexión sináptica en la OPL e IPL debido a una pérdida o modificación de la arborización de los procesos sinápticos de las neuronas. Este fenómeno se ha observado también en otros modelos murinos (Cuenca, Pinilla et al. 2005, Martinez-Navarrete, Seiler et al. 2011).

A P90 las ratas P23H mostraron poca inmunoreactividad a PKC- $\alpha$  asociada a las células bipolares, y se evidenciaron pocos cuerpos celulares y degenerados en su morfología. La degeneración se puso de manifiesto en las retinas de los animales P23H por lo general acompañada de retracción de las dendritas. Algunos cuerpos celulares incluso carecían de

dendritas y los somas no estaban alineados en la INL como ocurre en las ratas silvestres SD. Se observó, conforme a anteriores estudios, pérdida de complejidad e inmunoreactividad de las células bipolares de bastones (Cuenca, Pinilla et al. 2004). En este sentido, ese hallazgo, acompañado de los resultados sobre el estado de los fotorreceptores y sus terminales axónicas, sugiere que la pérdida de fotorreceptores, mayoritariamente bastones, desencadena la pérdida de las correspondientes células bipolares.

Los animales tratados con HU210 mostraron células bipolares mejor preservadas, la pérdida no se mostró tan extensa y un incremento de la inmunoreactividad se registró en los terminales axónicos y varicosidades laterales de la retina central y periférica.

En el modelo murino P23H no se muestran procesos de neodendritización de células bipolares como se ha encontrado en humanos u otros modelos animales (Dorfman, Cuenca et al. 2011, Sullivan, Woldemussie et al. 2007a). El motivo de la falta de neodendritización en el modelo P23H aún está por aclarar. La falta de neodendritas se ha asociado a una predeterminación genética. También se ha hipotetizado que la causa pueda ser la elevada tasa de muerte celular (Cuenca y cols. 2014). Cualquiera que sea la causa, en el modelo P23H no hallamos la capacidad de neodendritizar, como ocurre en otros modelos experimentales. Al parecer, la tasa de degeneración y de muerte de las células es tan rápida que impide regenerar las terminales dendríticas.

La atrofia progresiva de los árboles dendríticos de las células bipolares de bastón es muy similar a otros modelos murinos, y la rapidez con la que estas células pierden completamente sus dendritas es proporcional a la velocidad a la que degeneran las células fotorreceptoras. La preservación de la OPL con morfología y función normal es esencial de cara a la transmisión de la correcta información electrofisiológica al SNC. Numerosos estudios sugieren que los fotorreceptores y sus sinapsis son cruciales para la salud y el mantenimiento de las células postsinápticas en varias enfermedades retinodegenerativas (Sullivan, Woldemussie et al. 2007a, Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014). Nuestros resultados muestran un estado degenerativo de los fotorreceptores y de las sinapsis con las células bipolares relativamente avanzado en comparación con lo mostrado en anteriores estudios (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Las células bipolares normalmente alargan sus axones en la IPL, conectando con células ganglionares y células amacrinas. Los anticuerpos para la proteína recoverina marcan las células bipolares ON de cono tipo 8 con débil inmunoreactividad (Cuenca, Pinilla et al. 2004), y las OFF de cono tipo 2 con intensa inmunoreactividad (Martinez-Navarrete, Seiler et al. 2011). Ambos tipos se encontraron afectadas por el proceso degenerativo en las ratas P23H

tratadas con vehículo. En este sentido, en nuestro estudio, además de mostrarse disminución y retracción de los procesos dendríticos, la IPL se mostró menos rica de elementos axónicos y con menor inmunomarcaje.

A través del inmunomarcaje con SYP y GNB3 comprobamos la presencia de un buen número de conexiones entre fotorreceptores tipo bastón (SYP) y células bipolares ON (GNB3) en las ratas P23H tratadas con HU210. El inmunomarcaje se situó en las zonas adecuadas, mostrando que las terminales axónicas estaban bien conservadas, eran funcionales y no se evidenciaron inmunomarcajes erráticos, típicos de retinas degeneradas.

En la retina de ratas, las células bipolares de bastones expresan receptores de CBs tipo 1. Los CB1r se expresan también en células bipolares de bastones (Yazulla, Studholme et al. 1999). A nivel de capas plexiformes (OPL e IPL), parece que los CBs, uniéndose con sus receptores, actúan preferentemente sobre las sublamina que contienen las células bipolares tipo ON. Además, se ha visto que los CBs se expresan de manera intensa en las células de Müller (Yazulla, Studholme et al. 2000), aunque su función aun no ha sido aclarada.

Un posible mecanismo de acción neuroprotector sobre las células bipolares podría ejercerse a través de la inhibición de la sobresecreción de Glu por los fotorreceptores en degeneración. La excitotoxicidad por Glu es un mecanismo fisiopatológico que causa daños neuronales bajo condiciones de estrés, lesiones o isquemia. Anteriores estudios sobre conexiones sinápticas en el SNC han mostrado que la activación de CB1r inhibe la secreción de Glu en varias áreas cerebrales (Levenes, Daniel et al. 1998, Shen, Thayer 1999, Ramirez-Franco, Bartolome-Martin et al. 2014), aunque hay que tener en cuenta que la retina presenta un entorno diferente a otras zonas anatómicas del SNC. Se ha comprobado que el Glu inyectado vía vitreal es tóxico y causa pérdida de neuronas de la retina interna (Sisk, Kuwabara 1985). Además, causa alteraciones en los ERGs si es administrado vía intraperitoneal (Potts, Modrell et al. 1960).

El Glu se une a nivel de ONL a receptores metabotrópicos mGlu e ionotrópicos AMPA, la sobreactivación de estos receptores daría inicio a los procesos degenerativos y pérdida de células bipolares. Estudios en diferentes modelos animales han demostrado que subunidades del tipo Glu 2, 3 y 4 del receptor AMPA, junto con receptores de NMDA, se expresan en las dendritas de las células bipolares (Grünert, Haverkamp et al. 2002, Hare, Wheeler 2009) y están involucrados en ambas vías fotópica y escotópica.

Los efectos de la administración exógena de CBs contra la excitotoxicidad serían ejercidos a nivel de fotorreceptores, en las células bipolares, preferentemente del tipo ON, y también en

las células ganglionares. A través de esta extensa acción ejercerían una importante modulación sobre la señalización de la retina.

El cannabinoide HU210 inhibiría la secreción de Glu a través de la activación del CB1r. En este sentido, la activación de CB1r inhibe la adenilato ciclasa y reduce los niveles de cAMP intracelulares. Asimismo, es conocido que el cAMP modula el tráfico vesicular y que bajos niveles de cAMP bloquean los efectos estimuladores de la concentración de  $Ca^{2+}$  sobre el reclutamiento vesicular (Sakaba, Neher 2003). Parece plausible que a nivel retiniano la inhibición sináptica esté mediada por bajos niveles de cAMP, y que este mecanismo pueda limitar los procesos de excitotoxicidad por sobresecreción de glutamato. En contra de este mecanismo juega el hecho de que, especialmente a nivel retiniano, los CBrs no se expresan localmente alrededor de la sinapsis y no juegan un papel directo en el tráfico sináptico.

### *5.2.3 CAMBIOS EN LAS TERMINALES AXÓNICAS DE LOS FOTORRECEPTORES Y SUS CONTACTOS SINÁPTICOS CON LAS CÉLULAS HORIZONTALES, EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HU210*

Los cuerpos celulares de las células horizontales se sitúan en la parte más externa de la INL y establecen conexiones a nivel de OPL con conos y bastones. Anteriores estudios han puesto de manifiesto que, a diferencia de otros modelos animales, en la retina de ratas y ratones, existe un único subtipo de célula horizontal, el tipo B provisto de axón. Estas células normalmente poseen un axón muy arborizado que contacta con los bastones, y dendritas que contactan con los conos. El tipo B de células horizontales está comúnmente presente en la retina de los mamíferos y la morfología es similar entre las especies (Sandmann, Boycott et al. 1996, Boycott, Hopkins et al. 1987, Peichl, Gonzalez-Soriano 1994). La ausencia de células tipo A en la retina de ratas no se asocia a la composición de la población de fotorreceptores. No se han encontrado relaciones consistentes con la composición o características de los fotorreceptores (Sandmann, Boycott et al. 1996). Tampoco se ha encontrado una asociación entre las células horizontales y la distribución de los fotorreceptores en general. La célula horizontal tipo B establece conexiones dendríticas con los conos, pero tampoco se ha podido relacionar con la distribución topográfica de los conos, ni con células ganglionares. La ratio entre fotorreceptores tipo cono y horizontales tipo B parece constante entre las diferentes especies que muestran un mosaico retinal de células horizontales compuesto exclusivamente de células tipo B (Sandmann, Boycott et al. 1996).

En el modelo P23H, estudios anteriores han mostrado una cierta estabilidad en el número de células horizontales en estado avanzado de degeneración de la retina, aunque se ha observado una ubicación ligeramente más escleral de los somas celulares (Cuenca, Pinilla et al. 2004). Se desconoce el motivo por el cual el soma de las células horizontales se desplaza a posiciones más esclerales en nuestro modelo. Este mismo comportamiento de las células horizontales se ha observado en el modelo de ratones pcd/pcd (Marchena, Lara et al. 2011).

En ratas RCS, a pesar del estado degenerativo y de la retracción de las arborizaciones dendríticas, las células horizontales muestran cuerpos celulares regulares, sin cambios morfológicos evidentes y densidad normal (Chu, Humphrey et al. 1993, Cuenca, Pinilla et al. 2005). De manera similar, en otros modelos murinos el mosaico de las células resiste a la degeneración de los fotorreceptores. Al contrario que en nuestro modelo, la población de células horizontales sufre acusadas modificaciones en las retinas de los ratones mutantes rd. Así, se ha verificado la pérdida del 18% de estas células en los 3 primeros meses de vida en los animales rd1 (Strettoi, Pignatelli 2000), y del 19% en los ratones rd10 durante el mismo intervalo (Gargini, Terzibasi et al. 2007). Además de estas variaciones numéricas, en el modelo rd1 se ha observado que las células horizontales muestran ramificaciones orientadas radialmente que penetran de forma anómala en la INL de las retinas (Strettoi, Pignatelli et al. 2003), fenómeno que no se produce en las retinas de los animales rd10 (Gargini, Terzibasi et al. 2007). Tanto en los ratones rd1 como rd10, los complejos axónicos crecen paulatinamente para ser cada vez más gruesos (a la vez que van perdiendo los procesos más delgados), los somas de estas células se hipertrofian y se sitúan irregularmente a través de la retina, y se van perdiendo las dendritas más delgadas (Strettoi, Pignatelli et al. 2003, Gargini, Terzibasi et al. 2007).

En las ratas del modelo P23H, con el avance de la degeneración se manifiesta la retracción de los procesos sinápticos de las células horizontales, pero no se evidencia una importante pérdida en el número de células. Las células horizontales, al contrario que otras neuronas secundarias como las células bipolares, no muestran importantes cambios ni en número ni en la forma del cuerpo celular. En las ratas tratadas con HU210 el inmunomarcaje pone de manifiesto una cierta recuperación en el número de cuerpos celulares de células horizontales, lo que podría justificarse más bien con la mayor preservación de la retina en general. Esto, por un lado, indica que la pérdida de cuerpos celulares de horizontales podría estar enlazado al estado general de la retina y, por otro, que HU210 ejerce un efecto neuroprotector que se extiende a este tipo celular, preserva en mejor estado toda la retina, y permite la preservación

de las células horizontales. En general, la degeneración retiniana provoca remodelación de las neuronas. En este sentido, las células horizontales buscan nuevos contactos sinápticos en la OPL a través de nuevas dendritas o de las terminales axónicas (Cuenca, Pinilla et al. 2005). En el modelo de ratones CNGA3/CNGB1 las células horizontales forman nuevas sinapsis dentro de la ONL (Michalakis, Schaferhoff et al. 2013). Se ha observado en procesos degenerativos de diferente etiología que las células horizontales pueden extender sus procesos hasta la IPL (Cuenca, Pinilla et al. 2005, Strettoi, Pignatelli 2000, Strettoi, Pignatelli et al. 2003, Park, Kim et al. 2001). Todo indica que las células horizontales, como las bipolares, buscan nuevas conexiones sinápticas, hasta que la retracción causada por la degeneración de los fotorreceptores y de las dendritas de las mismas células no permita más conexiones. La degeneración de la retina en el modelo P23H mostró afectar a las células horizontales y bipolares a los 90 días de edad. Además, la pérdida de dendritas ocurría en concomitancia con la pérdida en las filas de fotorreceptores.

Con el fin de explorar la preservación de las arborizaciones dendríticas de las células horizontales y sus contactos con los fotorreceptores, realizamos un doble marcaje con Bassoon y calbindina. En las ratas P23H tratadas con vehículo observamos escasa respuesta inmunopunteada para el Bassoon, correspondiente a las conexiones con los bastones. Mientras, pudimos observar un mayor número de conexiones en las ratas tratadas con HU210. El doble inmunomarcaje con Bassoon y calbindina puso de manifiesto las típicas conexiones sinápticas en forma de herradura entre axones de fotorreceptores y células horizontales en las ratas P23H tratadas con HU210. Este dato indica que HU210 tiene un buen efecto protector sobre las conexiones entre fotorreceptores y células horizontales, este dato se confirma también por la anterior observación sobre la concomitancia entre la pérdida de dendritas y de filas de fotorreceptores.

En resumen, podemos decir que el cannabinoide HU210 preserva el número células horizontales, de células bipolares de bastón, así como los procesos dendríticos de estas células y la densidad de contactos sinápticos en la OPL. HU210 muestra así ejercer una acción neuroprotectora sobre los fotorreceptores y las neuronas secundarias bipolares y horizontales. Este efecto podría extenderse a otras células de la retina, haciendo de HU210 un neuroprotector con efecto sistémico retiniano. Las próximas investigaciones podrían dirigirse a conocer eventuales beneficios de HU210 sobre otros tipos celulares de la retina como la microglía, y a conocer los mecanismos mediante los cuales HU210 ejerce los efectos hallados.

### 5.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE HU210 EN LA RETINA DE RATAS P23H

En la retina, las opsinas son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso situado en el segmento interno y transportadas por vía vesicular hasta los discos membranosos del segmento externo. Este proceso es muy dinámico y necesita el continuo reemplazo de las opsinas. Los procesos degenerativos de la RP conllevan la imposibilidad de sustituir correctamente las opsinas y tienen lugar, entre otras manifestaciones, alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma con acumulación de residuos glucoprotéicos e imposibilidad de fagocitosis por el EPR (Kaushal, Khorana 1994, Balastik, Ferraguti et al. 2008, Campello, Esteve-Rudd et al. 2013). Este proceso patológico determina la muerte de los fotorreceptores. Por otro lado, los estudios llevados a cabo hasta ahora indican que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la muerte de fotorreceptores en la RP (Shen, Yang et al. 2005). Otros estudios indican que los mecanismos de la RP determinan respuestas alteradas al estrés celular (Cuenca, Fernandez-Sanchez et al. 2014, Illing, Rajan et al. 2002). Además, se ha demostrado en modelos animales y humanos de RP que la muerte de los fotorreceptores involucra la activación de vías apoptóticas (Sizova, Shinde et al. 2014). Pero, estos mecanismos no solo involucran los procesos apoptóticos, sino también procesos autofágicos, de excitotoxicidad y de necrosis celular, entre otros (Opere, Zheng et al. 2006, Sahaboglu, Paquet-Durand et al. 2013, Mohlin, Taylor et al. 2014, Sato, Li et al. 2013). La combinación de estos factores ha sido, y debe ser, tenido en cuenta a la hora de investigar estrategias neuroprotectoras efectivas contra la pérdida de fotorreceptores.

En general los CBs muestran actividad neuroprotectora contra isquemia (Pellegrini-Giampietro, Mannaioni et al. 2009), lesiones traumáticas cerebrales (Shohami, Novikov et al. 1993), protegen contra procesos inflamatorios derivados de daños neuronales (Eljaschewitsch, Witting et al. 2006) y neurotoxicidad (van der Stelt, Di Marzo 2005, van der Stelt, Veldhuis et al. 2002). Se proponen diferentes mecanismos de acción de los CBs como inhibición de activación microglial (Ramirez, Blazquez et al. 2005), incremento de producción de factores neurotróficos (Khaspekov, Brenz Verca et al. 2004), actividad antioxidante (El-Remessy, Khalil et al. 2003b) y modulación de flujo de  $Ca^{2+}$  (Nadler, Mechoulam et al. 1993). La inmunoreactividad de los receptores de CBs ha sido demostrada en retina de roedores y primates (Bouskila, Burke et al. 2012, Bouskila, Javadi et al. 2013a, Cecyre, Zabouri et al. 2013, Lopez, Tagliaferro et al. 2011, Straiker, Stella et al. 1999, Yazulla 2008, Yazulla, Studholme et al. 1999, Straiker, Maguire et al. 1999). Además se indica la presencia del sistema eCB en células ganglionares (Lalonde, Jollimore et al. 2006, Middleton, Protti 2011), células bipolares

(Straiker, Stella et al. 1999, Straiker, Maguire et al. 1999, Yazulla, Studholme et al. 2000) y fotoreceptores (Fan, Yazulla 2003, Straiker, Sullivan 2003). Algunos de los mecanismos de acción de los CBs son mediados por el CB1r (ej. inhibición de secreción de Glu, modulación de concentración citosólica de  $Ca^{2+}$ ), otros parecen implicar el CB2r principalmente a través de una serie de acciones anti-inflamatorias, glia-dependientes (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007).

El Glu es el principal neurotransmisor de la retina y actúa a través de receptores ionotrópicos o metabotrópicos que se expresan en la retina (Brandstatter 2002). En este sentido se han descrito daños excitotóxicos en modelos murinos de retinosis pigmentaria (Delyfer, Forster et al. 2005). El Glu, a nivel de la OPL, se une a receptores metabotrópicos mGlu y ionotrópicos AMPA (Qin, Pourcho 1999, Massey 1990, Kalloniatis, Marc et al. 1996, Marc, Murry et al. 1995). La activación de estos últimos, localizados en células bipolares de conos y horizontales, permite la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  y conlleva una gran demanda energética en forma de ATP (Ames, Li 1992, Qin, Pourcho 1999). Cuando la retina está degenerando, las disfunciones conllevan el progresivo colapso del tejido, el cual va acompañado de una elevada tasa metabólica, con un gasto energético importante. En este sentido, en el terminal axónico de los bastones se localiza una única mitocondria gigante, y en el caso de los conos se observa una acumulación de 5 mitocondrias (Johnson, Perkins et al. 2007). Éstas proporcionan la energía necesaria para el tráfico vesicular asociado a las sinapsis y regulan los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico en la región presináptica de los fotorreceptores (Johnson, Perkins et al. 2007), por consiguiente las mitocondrias juegan un papel crucial.

En condiciones normales las mitocondrias hacen frente a esta demanda energética, pero en estado degenerado tienen lugar disfunciones mitocondriales, en consecuencia, aumentaría el estrés oxidativo intracelular, con el consiguiente daño oxidativo, como se ha observado que ocurre en neuronas del cerebelo en cultivo (Yadava, Nicholls 2007, Nicholls, Johnson-Cadwell et al. 2007, Nicholls 2008). Anteriores estudios de nuestro grupo confirman la desaparición de las mitocondrias de retinas en estado degenerado (Fernandez-Sanchez, Lax et al. 2011). Las mitocondrias son un elemento clave en la regulación de la función celular, en particular a nivel neuronal, donde la tasa metabólica es alta (Harris, Jolivet et al. 2012, MacAskill, Kittler 2010). En el pasado, se mostró que el THC influye sobre la función mitocondrial (Bartova, Birmingham 1976). La naturaleza altamente lipofílica de los CBs implica que puedan unirse a receptores no solo de membrana sino intracelulares (Benard, Massa et al. 2012). Otros estudios han observado la implicación de CB1r en la membrana de lisosomas y endosomas

(Rozenfeld, Devi 2008). Además la administración de CBs en ratones reduce la tasa respiración mitocondrial (Fisar, Singh et al. 2014).

Estudios previos muestran la capacidad de los CBs de actuar contra los procesos neurodegenerativos y de preservar los tejidos afectados (Bisogno, Di Marzo 2010, Sarne, Mechoulam 2005, Zogopoulos, Vasileiou et al. 2013). Algunos estudios han mostrado la presencia de CBs en la retina externa, que incidirían sobre la excitabilidad de la célula fotorreceptora (Yazulla, Studholme et al. 1999, Zabouri, Bouchard et al. 2011, Cecyre, Zabouri et al. 2013), y el sistema eCB retiniano modula el flujo de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  a nivel de retina (Fan, Yazulla 2003, Straiker, Sullivan 2003). De manera que los CBs podrían influir sobre la inhibición de los canales  $Ca^{2+}$  limitando fenómenos de excitotoxicidad por Glu en el modelo P23H.

Otros autores indican el efecto modulador del CB1r sobre la excitabilidad de células amacrinas (Warrier, Wilson 2007b), mientras otros indican la expresión del CB2r en las dendritas y axones de las células bipolares con participación en la respuesta excitatoria (Cecyre, Zabouri et al. 2013). El CB1r se expresa en los pedículos de conos y ocasionalmente en los de bastones. En cualquier caso los CBs no se expresan alrededor de la cintilla sináptica sino en los procesos de los fotorreceptores (Yazulla, Studholme et al. 2000).

Los CBs modulan también la actividad antiinflamatoria, aunque los mecanismos de acción aún no han sido completamente descubiertos (Michler, Storr et al. 2013, Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007). Un mecanismo plausible, entre otros, parece la regulación de la actividad microglial. En este sentido se ha determinado que los CBs pueden influir sobre la actividad antiinflamatoria *in vitro* y *in vivo*, a través del receptor de adenosina denominado AR2A, entre otros. Este receptor se expresa abundantemente en la microglía de retina de ratas, y se ha demostrado que inhibe la secreción de factores neurotóxicos como el factor TNF- $\alpha$ , ejerciendo un papel antiinflamatorio a nivel retinal (Liou, Auchampach et al. 2008).

La activación de receptores CB1 modula la producción de diversas citoquinas inflamatorias por parte de las células de la glía, entre ellas, IL-1, IL6 e IL-12, que participan al desarrollo del daño asociado a procesos de neuroinflamación. La activación del CB1r también parece estar ligada a un aumento en la producción de moléculas antiinflamatorias (IL-10), factores tróficos y neurotrofinas que podrían rescatar a las neuronas de la muerte en un ambiente inflamatorio (Molina-Holgado, Pinteaux et al. 2003). Todos los estudios indican que en estado de alteración por fenómenos degenerativos en primera instancia los CBs ejercen un efecto modulador de

carácter inhibitor. Este efecto participaría en preservar la estructura y funcionalidad de la retina.

Los efectos neuroprotectores de HU210 podrían ejercerse a través del sistema eCB. Nuestros resultados no permiten aclarar los mecanismos involucrados en el papel neuroprotector mostrado por HU210 en la retina de animales P23H. Se necesitan ulteriores estudios usando agonistas específicos para los receptores CB1r y CB2r con el fin de determinar cuáles son los efectos son mediados por el sistema eCB, y cuáles son las acciones que están influenciadas por cada receptor. Estos estudios podrían establecer si HU210 ejerce su acción directamente sobre los fotorreceptores y neuronas secundarias, o si también actúa indirectamente mediante acción glial-dependiente u otro mecanismo. Además, será necesario establecer la dosis óptima para ejercer el mejor efecto neuroprotector posible sobre los diferentes tejidos.

HU210 muestra ser un potente agonista y manifiesta similar afinidad para los receptores CB1r y CB2r (Howlett, Barth et al. 2002, Pertwee 1999). HU210 muestra una vida media más larga que otros CBs y una potencia entre 100 y 800 veces superior que el THC (Little, Compton et al. 1989b, Ottani, Giuliani 2001). Las capacidades neuroprotectoras de HU210 han sido demostradas en patologías degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Ramirez, Blazquez et al. 2005), la enfermedad de Parkinson (Walsh, Gorman et al. 2010) y en condiciones de neurotoxicidad (Rubio, Villain et al. 2011, Pope, Mechoulam et al. 2010), entre otras.

Por ser compuestos altamente lipofílicos, a los CBs se les atribuyen capacidades neuroprotectoras independientes de la mediación de sus receptores (Marsicano, Moosmann et al. 2002, Chen, Buck 2000). Estudios previos han reportado efectos neuroprotectores contra ROS (Hampson, Grimaldi et al. 1998, Hampson, Mu et al. 2000). Los resultados de otros estudios muestran que tienen propiedades antioxidantes en relación con la enfermedad de Parkinson (Garcia-Arencibia, Gonzalez et al. 2007).

HU210 es un potente antioxidante lipofílico, y se comporta como un agente contra el estrés oxidativo (Benard, Massa et al. 2012, Marsicano, Moosmann et al. 2002). Además, se han demostrado los efectos antioxidantes de HU210 sobre daños neuronales en ratones diabéticos (Dagon, Avraham et al. 2007a). Está por determinar si en la retina HU210 puede actuar sobre la actividad mitocondrial y este mecanismo podría explicar en parte los resultados obtenidos con HU210 sobre la preservación de la retina en el modelo murino P23H.

Por último, HU210 podría desarrollar una cierta capacidad neuroregenerativa. Un estudio in vitro sobre neuronas de ratas indica la posibilidad de que HU210 estimule la proliferación neuronal (aunque no la diferenciación) (Jiang, Zhang et al. 2005).

No se han realizado muchos estudios sobre los efectos de los CBs en la retina (Yazulla 2008). Ésta es la primera investigación conocida sobre el posible carácter terapéutico del cannabinoide HU210 en la RP con en el modelo murino P23H, lo que confiere adicional relevancia a los resultados obtenidos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

#### *5.4. EFECTOS DE HU210 SOBRE EL PESO CORPORAL, EL CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA Y LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA*

Durante este trabajo se han evidenciado conductas alimenticias que ponen de manifiesto que el sistema eCB está implicado en la ingesta y el control del peso en la rata. Los CBs son compuestos que ejercen sus efectos mayoritariamente enlazándose a sus receptores específicos; de esta manera, el sistema eCB influye en muchos sistemas fisiológicos, modulando funciones endocrinas, metabólicas, inmunitarias, cardiovasculares y neuronales. Todas estas funciones están reguladas a nivel periférico y central y no solo involucran mecanismos neuronales sino que los CBs ejercen también acciones directas sobre tejidos no neuronales. Algunas funciones son reguladas a nivel del SNC, principalmente a través de CB1r, mientras que CB2r parece expresarse sobre todo a nivel periférico.

Varios estudios han demostrado que los CBs endógenos o exógenos se unen a los CB1r, estimulando el apetito. Esta propiedad ha sido utilizada con el fin de combatir la anorexia y caquexia en enfermedades cancerígenas en fase terminal (Cota, Marsicano et al. 2003). Además, el refuerzo estimulante determinado por la visión del alimento puede determinar la activación de los eCBs e influenciar la motivación por los alimentos a través de las interacciones con las vías mesolímbicas implicadas en los mecanismos de recompensa y hedónicos (Li, Jones et al. 2011b, Bermudez-Silva, Viveros et al. 2010b, André, Gonthier 2010b, Tam, Vemuri et al. 2010b). Por otro lado, el GABA actúa en el control de la ingesta a nivel postsináptico para estimular la saciedad. La activación del sistema eCB a nivel postsináptico puede inhibir los efectos del GABA en términos de saciedad y favorecer la ingesta de alimentos. Esto explicaría, en parte, las propiedades orexigénicas de los CBs (Pagotto, Pasquali 2005). Además, existen evidencias de que el sistema eCB controla la homeostasis energética a través de CB1r expresado a nivel neuronal, y dirige el organismo hacia la acumulación y establecimiento de reservas energéticas (Piazza, Lafontan et al. 2007). Asimismo, los eCBs son producidos a demanda y se sintetizan a nivel local, lo que conlleva que disfunciones o diferentes dosis exógenas de magnitud no fisiológicas puedan determinar efectos muy diferentes.

HU210 muestra diferentes efectos farmacológicos (Mechoulam, Feigenbaum et al. 1988, Little, Compton et al. 1989b, Ottani, Ferrari et al. 2002) y actúa en: antiemesis (Ferrari, Ottani et al. 1999a), espermatogénesis (Lewis, Paro et al. 2012), decremento de la actividad psicomotora, peso, comportamiento (Giuliani, Ferrari et al. 2000, Giuliani, Ottani et al. 2000), alteraciones

de la temperatura corporal (Leker, Gai et al. 2003) y de la actividad psicotrópica (Mechoulam, Feigenbaum et al. 1988).

A pesar del efecto estimulante del apetito descrito en CBs, estudios previos han mostrado la pérdida de peso corporal en animales tratados con HU210 (Howlett, Champion et al. 1990, Dalton, Wang et al. 2009), que se asocia a los efectos sobre CB1r (Giuliani, Ottani et al. 2000). Nuestro estudio muestra que los animales tratados con HU210 pierden peso en la primera semana de tratamiento y luego la diferencia de peso se mantiene estable. Estos resultados confirman los obtenidos en otros estudios (Dalton, Wang et al. 2009, Dalton, Zavitsanou 2010). El mantenimiento del peso corporal después de la primera semana de tratamiento podría estar relacionado con tolerancia a HU210. Algunos estudios evidencian que tras la administración repetida crónica o subcrónica de HU210, los animales desarrollan una tolerancia a dicha sustancia y comienzan a ingerir alimentos y beber agua de forma regular, aumentando su peso corporal (Dalton, Wang et al. 2009, Dalton, Zavitsanou 2010). El desarrollo de la curva del peso corporal con pérdida de peso en los primeros días parece relacionarse con la dosis de HU210 administrada. En anteriores estudios, se mostró que los animales tratados con HU210 perdían peso, y esta variación era dosis-dependiente. En altas dosis, HU210 provoca mayor pérdida de peso, y a partir de los 10 días de tratamiento el peso corporal de los animales ya no presentaba diferencias significativas. Además, se observó que la tolerancia a HU210 se desarrolla de forma más rápida en animales jóvenes que en adultos (Dalton, Wang et al. 2009, Dalton, Zavitsanou 2010). Este mismo efecto de reducción de peso se ha hallado en modelos de exposición crónica con antagonistas de los CBrs.

La modulación del peso está relacionada con la regulación de la ingesta, aunque no dependa solo de ella. Estudios en ratones carentes de CB1r (knockout) muestran la influencia de este receptor sobre el control del peso, independientemente de la ingesta (Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005). Sin embargo, en otro estudio realizado en un modelo murino sin receptores CB1r, antagonistas de los CBr produjeron cambios sobre la conducta alimenticia (Tam, Vemuri et al. 2010b). Esto podría ser debido a efectos producidos por el CB2r y/o se relacionaría con posibles efectos no conocidos sobre órganos periféricos o sistémicos inespecíficos. Nuestros resultados indican, en relación a la pérdida de peso, un probable efecto de HU210, en altas dosis, sobre CB1r, parecido al determinado por antagonistas del CB1r estudiados hasta ahora. En este sentido, parece necesario investigar en profundidad los mecanismos de acción, las dosis y las dianas terapéuticas de HU210.

La posibilidad de fármacos selectivos con acción sobre CB1r y que no afecten al SNC podría representar una estrategia alternativa en el control del peso corporal. Los datos conocidos a día de hoy no indican fármacos antagonistas eficaces en la reducción de peso corporal que no actúen sobre CB1r a nivel neuronal. Vista la complejidad y el escaso conocimiento del sistema eCB, la estrategia terapéutica de bloquear este sistema con el fin de controlar el peso es arriesgada, ya que hace falta conocer mucho más en profundidad este sistema y los órganos afectados; en resumen hace falta más investigación en lugar de comercialización.

Después de dos décadas de estudio, el rol del sistema eCB sobre la conducta alimenticia ha conocido avances en modelos murinos. Estos avances presentan algunas discrepancias, y algunos estudios evidencian cómo los resultados dependen de la dosis y las condiciones del experimento, dando lugar a aparentes incongruencias (Cota, Marsicano et al. 2003). La estimulación del apetito que producen los CBs ha sido ampliamente investigada (Bermudez-Silva, Viveros et al. 2010b, Bermudez-Silva, Cardinal et al. 2012, Marco, Romero-Zerbo et al. 2012, Chavez-Tapia, Tellez-Avila et al. 2009, Ravinet Trillou, Delgorge et al. 2004) En general, la mayoría de agonistas de los receptores de cannabinoides producen efectos estimulantes del apetito (Kirkham, Williams et al. 2002, Williams, Kirkham 1999, Di Marzo, Goparaju et al. 2001, Jamshidi, Taylor 2001, Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005). En referencia a la ingesta, algunos estudios registran hiperfagia con la administración de CBs (Gamber, Macarthur et al. 2005, Hao, Avraham et al. 2000), otros registran efectos anorexigénicos (Giuliani, Ottani et al. 2000), mientras que otros no encuentran diferencias significativas (Crawley, Corwin et al. 1993, Graceffo, Robinson 1998).

Nuestro trabajo pone de manifiesto que HU210, en la dosis suministrada, reduce la ingesta de alimentos al inicio del tratamiento. Un estudio con administración de HU210 tiene resultados parecidos, mostrando que una dosis subcrónica de HU210 (100 µg/Kg) produce efectos visibles, incluso 24 h después de la inyección, como son la disminución marcada de la ingesta de alimentos y la disminución del consumo de agua, lo que resulta en una disminución del peso corporal (Giuliani, Ottani et al. 2000). Se ha sugerido que este efecto anorexigénico de HU210 pueda depender de una reducida motivación hacia los alimentos, y que pueda ser mediado por el sistema de recompensa (Cota, Marsicano et al. 2003), aunque también podría relacionarse con hipoexpresión de CB1r (Dalton, Wang et al. 2009).

La diferencia de ingesta entre los dos grupos de estudio en nuestro trabajo se evidencia en las primeras semanas. Posteriormente, el consumo de alimentos en el grupo tratado con HU210 se iguala a los animales tratados con vehículo, dato que podría poner de manifiesto el

desarrollo de una tolerancia al efecto anorexigénico en los animales P23H tratados con HU210. En este sentido, los efectos registrados con el agonista HU210 a la dosis de 100 µg/Kg son parecidos a los registrados con antagonistas de los CBs, donde se observa una tolerancia al efecto hipofágico tras una semana o incluso días de tratamiento, mientras permanece el efecto sobre la disminución del peso corporal (Thornton-Jones, Kennett et al. 2006, Jbilo, Ravinet-Trillou et al. 2005, Poirier, Bidouard et al. 2005, Vickers, Webster et al. 2003). A la vez, no podemos descartar que a la pérdida de peso corporal y disminución de la ingesta pudiera contribuir el factor de estrés, producido por la inyección trisemanal de HU210 (Seyle 1936, Szabo, Tache et al. 2012).

Los CBs no parecen tener efectos importantes sobre la ingesta de agua. La bibliografía al respecto es escasa y los efectos de los CBs sobre el consumo de agua parecen ser de carácter inespecífico, y se asocian a alteraciones en la ingesta de comida. En referencia a HU210, algún estudio pone en evidencia alteraciones en el consumo de agua en las primeras 24 h sucesivas a la administración (Giuliani, Ottani et al. 2000). El estudio de Giuliani y colaboradores puede ser contrastado con nuestros resultados en cuanto utiliza la misma dosis (100 µg/Kg) que se ha administrado en nuestro estudio, y registra que el efecto sobre el consumo de agua persiste hasta 7 días después de la administración.

Nuestro estudio muestra un significativo mayor consumo de agua en las ratas tratadas con HU210 en el periodo P54 a P73 en comparación con las ratas tratadas con vehículo. Este dato corresponde temporalmente a las semanas siguientes a la recuperación del apetito y a la regulación del peso.

Diferentes estudios previos excluyen un rol importante del sistema CB en el consumo de agua. (Bojanowska, Radziszewska 2011, Wierucka-Rybak, Wolak et al. 2014). Un estudio relativo al consumo de agua relaciona el sistema eCB con la hormona neurohipofisaria oxitocina (Verty, McFarlane et al. 2004). La oxitocina y el CB1r modulan, cada uno de manera independiente, la ingesta de alimentos, y se ha estudiado una posible interacción entre estos dos sistemas (Gimpl, Fahrenholz 2001, Verty, McFarlane et al. 2004). Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de proteínas G, y ambos se localizan en el hipotálamo y otras zonas anatómicas del SNC relacionadas con el control de la ingesta de alimentos y el consumo de agua. (Carter 2003, Herkenham, Lynn et al. 1991). En general, el comportamiento en el consumo de alimentos y agua inevitablemente están interconectado; de hecho, en mamíferos la alteración de uno conlleva alteración del otro (Steiger Burgos, Senn et al. 2001). Los escasos estudios referentes al consumo de agua no aclaran el papel de HU210 aún faltan datos para

comprender los posibles efectos de HU210 sobre la hidratación corporal. La diferencia evidenciada en nuestro estudio en la mitad del tratamiento podría ser un efecto inespecífico debido a la tolerancia desarrollada por los animales tratados con HU210, o podría estar relacionado con la recuperación del apetito, pero para poder confirmar esta hipótesis hacen falta más investigaciones en este sentido.

Los CBs se relacionan con alteraciones en la actividad motora; el CB1r se expresa densamente en zonas anatómicas relacionadas con la coordinación y el movimiento (Breivogel, Childers 1998). El CB1r se encuentra expresado en alta densidad en las células granulosas glutamatérgicas del cerebelo y en las terminales axónicas de las neuronas GABAérgicas de los ganglios basales. En general, en la mayoría de bibliografía hay consenso sobre un efecto de reducción de la actividad locomotora debido a la administración de CBs.

Algunos estudios muestran que el efecto de los CBs sobre la actividad motora es dosis-dependiente. En este sentido, se ha demostrado que altas dosis de CBs suprimen la actividad motora, mientras que bajas dosis resultan incrementar tal actividad (Polissidis, Chouliara et al. 2010, Smirnov, Kiyatkin 2008, Sanudo-Pena, Romero et al. 2000, Katsidoni, Kastellakis et al. 2013, Bosier, Sarre et al. 2010). La relación entre administración crónica de CBs y actividad motora ha sido investigada (Biscaia, Marin et al. 2003, Schneider, Drews et al. 2005), pero no hemos encontrado estudios previos de administración crónica de HU210 en relación con la actividad motora. Los estudios analizados en su gran mayoría hacen referencia a efectos agudos o sub-crónicos, por ese motivo nuestros resultados suministran datos útiles. Estudios anteriores demostraron que los CBs producen catalepsia, la cual aparece a los 20 min tras la administración (Ferrari, Ottani et al. 1999b, Ferrari, Ottani et al. 1999a, Little, Compton et al. 1989a, Martin-Calderon, Munoz et al. 1998). Nuestro experimento confirma los resultados de la bibliografía existente, dado que encontramos una marcada reducción (-49.2%) de la actividad motora durante la primera hora tras la administración. Siendo nuestro tratamiento crónico, podemos afirmar que la catalepsia persiste a los 3 meses de tratamiento y no se observaron fenómenos de tolerancias como los que observamos p.e. en la ingesta y en el peso de los animales. La dosis de HU210 suministrada parece tener así un efecto cataléptico agudo profundo sobre las ratas en tratamiento agudo y crónico.

En otros estudios, la administración de CBs, aunque disminuye la actividad locomotora total, promueve conductas motoras específicas, caracterizadas por patrones de inquietud, que se manifiesta con locomoción alterada, y los efectos parecen relacionarse con la dosis (Ferrari, Ottani et al. 1999a, Ferrari, Ottani et al. 1999b). Los animales tienden a dar más vueltas, a

moverse más de un lado a otro de la jaula y a mostrar un estado de inquietud elevado en comparación con las ratas del grupo control (Ferrari, Ottani et al. 1999a, Ferrari, Ottani et al. 1999b).

En nuestro estudio, el tratamiento crónico con HU210 durante 67 días en dosis 100 µg/Kg pone de manifiesto un incremento de la actividad locomotora general al final del tratamiento. Estos datos difieren de la mayoría de bibliografía sobre CBs y de estudios con HU210 (Giuliani, Ferrari et al. 2000, Ferrari, Ottani et al. 1999a, Ferrari, Ottani et al. 1999b). No tenemos conocimiento de otros estudios sobre actividad locomotora asociada a tratamiento crónico con HU210, lo que confiere a nuestro estudio adicional relevancia.

Anteriores estudios asocian administración de alta dosis de HU210 con una mayor vocalización en las ratas. Este fenómeno podría representar una respuesta irritante asociada a un mayor miedo o a un estado de estrés (Zimmer, Zimmer et al. 1999, Giuliani, Ferrari et al. 2000). En humanos, después de altas dosis de cannabinoides es frecuente que aparezcan estados de disforia, ansiedad o pánico. Esto también podría ocurrir en animales y ser una posible causa de su aumento de actividad locomotora, estrés y sonidos emitidos (Ferrari, Ottani et al. 1999b, Ferrari, Ottani et al. 1999a, Dalton, Wang et al. 2009, Giuliani, Ferrari et al. 2000).

Nuestro estudio puso de manifiesto un posible estado de estrés en los animales en experimentación. En este sentido los animales mostraron alteraciones de la actividad motora los días de no administración intraperitoneal en horarios coincidentes con los de administración. Aunque este comportamiento parece ligeramente más notable en los animales tratados con HU210, aparece también en parte en los animales tratados con vehículo, y creemos que este comportamiento podría ser atribuible en buena parte a un estrés de carácter traumático debido a la manipulación y administración intraperitoneal (Seyle 1936, Szabo, Tache et al. 2012). No se puede descartar que las diferencias intergrupales sean consecuencia de un efecto aditivo asociado al consumo de CBs.

El sistema eCB se manifiesta también a nivel hepático. Hace menos de una década fue puesto en evidencia el papel del sistema eCB en la función hepática (Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005). Estudios sobre el órgano hepático han puesto de manifiesto la expresión de CB1r en este tejido (Jourdan, Djaouti et al. 2010, Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005, Jeong, Osei-Hyiaman et al. 2008, Quarta, Bellocchio et al. 2010), en particular en los hepatocitos (Jeong, Osei-Hyiaman et al. 2008, Mukhopadhyay, Pan et al. 2010) y células endoteliales vasculares (Moezi, Gaskari et al. 2006). Fisiológicamente, la expresión del CB1r a nivel hepático es baja,

pero en algunos estudios se registraron niveles de expresión muchos mayores en patologías como hepatocarcinoma y cirrosis de varia etiología (Floreani, Lazzari et al. 2010, Xu, Liu et al. 2006). El CB2r es indetectable a nivel hepático en estado fisiológico, pero también se evidenció su expresión en estados patológicos en enfermedades como esteatosis o fibrosis (Mallat, Lotersztajn 2008, Mallat, Lotersztajn 2010, Mendez-Sanchez, Zamora-Valdes et al. 2007, Julien, Grenard et al. 2005, Xu, Liu et al. 2006).

Nuestro estudio pone en evidencia que HU210 ejerce un efecto de reducción de peso del órgano hepático. No realizamos análisis inmunohistoquímicos, ya que no entraban en nuestros objetivos, pero la reducción del peso del órgano nos suministra una indicación general del estado del mismo (Bailey, Zidell et al. 2004). En general, el menor peso de los animales podría justificar el menor peso del órgano, sin embargo los CBs pueden activar procesos lipogénicos a nivel hepático a través del CB1r en modelos de roedores (Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005).

El modelo P23H no manifiesta alteraciones hepáticas, y la administración exógena de un potente agonista de CBr como HU210 no conlleva aumento de peso del hígado. Normalmente el aumento de peso del hígado se asocia a acumulación lipídica; en este sentido podemos excluir que la administración exógena de HU210 conlleve un aumento de peso del órgano en nuestro estudio. Esto podría sugerir que un aporte exógeno de HU210 en hígados sanos no conlleve acumulación lipídica. El mecanismo por el cual, a través de la activación del CB1r en los adipocitos, se estimularía la lipogenesis, y los ácidos grasos se convertirían en triglicéridos a nivel hepático (Cota, Marsicano et al. 2003, Jourdan, Djaouti et al. 2010) no parece tener un papel trascendente en animales P23H hepáticamente sanos.

Nuestros resultados muestran que la administración de HU210 en altas dosis en las ratas P23H, que normalmente podrían tender a sobrepeso por escaso movimiento en las jaulas, reduce el peso general del animal y el peso del órgano hepático. Se necesitan estudios más específicos para aclarar el mecanismo que determina este efecto de reducción de peso a nivel hepático.

### 5.5. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA SOBRE LA FUNCIÓN VISUAL EN RATAS P23H.

Las neuronas colinérgicas han sido identificadas en la retina de diferentes especies de mamíferos (Tauchi, Masland 1984, Masland, Livingstone 1976, Pourcho, Osman 1986) y también han sido identificadas en la rata (Eckenstein, Thoenen 1982, Yasuhara, Tooyama et al. 2003). Ambos receptores, muscarínicos y nicotínicos, han sido identificados en retina, y sugieren un posible papel fisiológico del sistema colinérgico en la retina de ratas.

La retina expresa receptores nicotínicos repartidos en diferentes capas. La expresión de nAChRs sugiere que el sistema colinérgico tenga un papel en la función visual. Los receptores nicotínicos parecen ser importantes para el sistema visual en su organización y funcionamiento normal. La administración de nicotina en etapas de desarrollo puede dar lugar a cambios en la organización de este sistema (Yan, Zhao et al. 2006).

Varios estudios centran la atención en la expresión del receptor nicotínico  $\alpha 7$ nACh en la retina, el cual se expresa en células bipolares tipo ON de conos, células amacrinas glicinérgicas y GABAérgicas, células ganglionares y células del RPE (Dmitrieva, Strang et al. 2007, Maneu, Gerona et al. 2010, Wehrwein, Thompson et al. 2004).

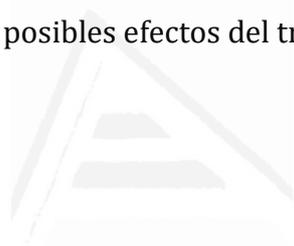
Algunos estudios han puesto en evidencia que, a través de los receptores nicotínicos, la nicotina podría ejercer un papel neuroprotector contra daños neuronales de origen diferente (Iwamoto, Birkholz et al. 2014, Iwamoto, Mata et al. 2013, Hijioka Masanori, Katsuki et al. 2011, Quik, Perez et al. 2012). Nuestro estudio consistió en analizar el efecto de la administración de nicotina sobre la respuesta visual de ratas P23H.

Nuestros resultados muestran que la administración aguda de diferentes dosis de nicotina deprime significativamente las amplitudes de las ondas b escotópicas registradas en ratas P23H. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en conejos (Jurklics, Kaelin-Lang et al. 1996) y humanos (Junemann, Damaske 1968, Varghese, Reid et al. 2011), que sugieren que la nicotina puede disminuir la amplitud de la onda b en fase aguda y en condiciones escotópicas y fotópicas. No encontramos diferencias significativas en la amplitud de la onda a.

A P120, tras la administración de nicotina durante el estudio, no encontramos diferencias significativas de amplitud de la onda a y b entre animales tratados con nicotina y animales tratados con vehículo. Sin embargo la bibliografía evidencia que, en tratamiento crónico, la nicotina podría ejercer un cierto efecto neuroprotector, dependiente de la dosis, tiempo de exposición y patología (Hijioka Masanori, Katsuki et al. 2011). Los resultados funcionales no

evidencian un efecto neuroprotector en régimen de cronicidad. Este resultado puede depender del posible solapamiento de éste efecto crónico, neuroprotector, con el efecto agudo, inhibidor de la respuesta electroretinográfica. Con el fin de separar el efecto agudo de la nicotina de un posible efecto crónico, normalizamos los datos obtenidos a P120 en base a los registros a P30. Después de la normalización, encontramos una mayor amplitud media de la onda *b* a bajas dosis de nicotina (N1mg). Este dato concordaría con la bibliografía existente en relación a los posibles efectos neuroprotectores de la nicotina. A la vez, la bibliografía indica que estos efectos por administración crónica a nivel de SNC difieren según el receptor nicotínico involucrado, la dosis y la zona anatómica interesada (Buckingham, Jones et al. 2009, Nguyen, Rasmussen et al. 2003). En particular, el  $\alpha 7$ nACh ha sido asociado con posibles efectos neuroprotectores y antiinflamatorios (Iwamoto, Birkholz et al. 2014, Iwamoto, Mata et al. 2013, Takada, Yonezawa et al. 2003, Kihara, Shimohama et al. 2001)

Creemos útil la realización de nuevas investigaciones en condiciones diferentes, en las que se evalúen de forma independiente los posibles efectos del tratamiento crónico de la nicotina.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5.6. EPIGENÉTICA ASOCIADA A LA RETINOSIS PIGMENTARIA

*“He querido dedicar un breve apartado a la epigenética porque es un fenómeno que me fascina y creo en el uso de la epigenética como potente herramienta, aun poco estudiada, que puede ayudar el avance del conocimiento científico”.*

La epigenética es una rama emergente de la genética referida al estudio de cambios heredables en la expresión génica, que no implican la modificación de la secuencia de DNA genómico subyacente. Desde sus inicios, la investigación de los mecanismos epigenéticos se ha centrado en la metilación del DNA, la modificación de las histonas, y la remodelación de la cromatina, aunque dicho concepto se ha ido ampliando hasta incluir recientemente la implicación de microRNAs (miRNAs) y RNAs de interferencia o silenciadores (siRNA) (Bartel 2004, Rutar, Natoli et al. 2012).

Esta ciencia se basa en la observación de patrones epigenéticos que, al ser modificados por los factores ambientales, pueden determinar o predisponer el desarrollo o la inhibición de una enfermedad. La desregulación epigenética se asocia con una gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo cáncer, trastornos neurológicos, y enfermedades autoinmunes.

En el campo de la oftalmología, la epigenética está abriendo una nueva vía para la comprensión del desarrollo ocular y de las enfermedades relacionadas. Las evidencias científicas sugieren un posible vínculo entre la expresión génica, la estructura de la cromatina, los RNA no codificantes y las últimas etapas de desarrollo de la retina (Popova, Barnstable et al. 2014). La ruptura del balance epigenético podría predisponer o predeterminar la etiología de varias enfermedades oculares e influenciar otras como la RP. Estos mecanismos de acetilación-desacetilación con transcendencia epigenética están muy activos en células bipolares y fotorreceptores en fase de desarrollo (Chen, Cepko 2009), y están presentes en menor medida en la retina madura. Los mismos mecanismos de acetilación también están involucrados en la apoptosis de fotorreceptores (Sancho-Pelluz, Alavi et al. 2010, Chen, Cepko 2009).

La sirtuina es una enzima con acción de desacetilación, que está presente tanto en el SNC como en la retina, y se asocia con longevidad. En estados patológicos se relaciona con varias enfermedades neurodegenerativas de la retina como la RP (Jaliffa, Ameqrane et al. 2009, Ban, Ozawa et al. 2013).

Los miRNA también están involucrados en la degeneración retiniana. En este sentido, en el modelo de RP con modificación en la rodopsina P347S y en otros modelos de degeneración

retiniana se destaca que la expresión alterada de los miRNAs produce cambios en el silenciamiento post-transcripcional de los genes (Loscher, Hokamp et al. 2008, Loscher, Hokamp et al. 2007).

Estos hallazgos invitan a la implementación de la epigenética en oftalmología, pudiendo abrir una puerta al futuro en base a un nuevo enfoque y perspectiva, poniendo en relación la epigenética con los mecanismos implicados en los fenómenos degenerativos. Esto podría encaminar la investigación hacia la determinación de terapias en ciertos estadios tempranos, incluso en estadios embrionarios de la RP. Debido a la falta de modificaciones estructurales en el ADN, junto con la utilización de mecanismos epigenéticos refinados y presentes en la naturaleza, las ventajas de estos tratamientos son altas y los riesgos mínimos, de cara a eventuales enfoques terapéuticos para las nuevas generaciones. A la espera de que el nivel de conocimiento genético de las enfermedades sea completo, la previsión de posibles aplicaciones de estrategias epigenéticas es esperanzadora.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 6. CONCLUSIONES

1. Las ratas P23H-3, modelo de retinosis pigmentaria, experimentan un deterioro progresivo de la respuesta electroretinográfica, asociado a la pérdida progresiva de fotorreceptores y neuronas secundarias en la retina, y al deterioro de la conectividad sináptica entre éstas células.
2. El cannabinoide sintético HU210 produce una ralentización en el deterioro de la respuesta eléctrica en condiciones escotópicas en los animales P23H-3, lo que demuestra su eficacia en la preservación de la función visual en estos animales.
3. La administración sistémica de HU210 ralentiza la degeneración de los fotorreceptores: preserva el número de filas de fotorreceptores en la ONL y conserva la morfología de bastones y conos.
4. El cannabinoide HU210 previene la degeneración de las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y sus neuronas postsinápticas: células bipolares y horizontales. Las estructuras presinápticas y postsinápticas, así como la densidad de contactos sinápticos entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales, se encontraron preservadas en las retinas de ratas P23H-3 tratadas con HU210.
5. Los efectos neuroprotectores del cannabinoide sintético HU210 podrían ser potencialmente útiles para el ensayo de nuevas terapias encaminadas a retrasar la degeneración funcional y estructural provocada por la retinosis pigmentaria.
6. La administración crónica del cannabinoide sintético HU210 provoca un aumento de la actividad locomotora media en los animales P23H-3, a la vez que provoca catalepsia durante la primera hora tras la administración; si bien, las diferencias observadas no resultaron significativas.
7. El cannabinoide sintético HU210 disminuye significativamente el crecimiento, el peso y la ingesta de los animales en los primeros días de administración prolongada. Estos cambios se mantienen a lo largo del tratamiento.
8. La administración aguda de nicotina disminuye la respuesta visual en condiciones escotópicas en los animales P23H-3. Además, la administración crónica de bajas dosis de nicotina ejerce una mejora en la respuesta electroretinográfica normalizada de estos animales, lo que indica un posible efecto neuroprotector de la nicotina en animales P23H-3.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AHNELT, P., KERI, C. and KOLB, H., 1990. Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina. *The Journal of comparative neurology*, **293**(1), pp. 39-53.
- AKBAS, F., GASTEYGER, C., SJÖDIN, A., ASTRUP, A. and LARSEN, T.M., 2009. A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. *Obesity Reviews*, **10**(1), pp. 58-67.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M. and ROGERS, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, **89**(1), pp. 73-120.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., CASTRO, N.G., ALKONDON, M., REINHARDT, S., SCHRODER, H. and MAELICKE, A., 1995. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **757**, pp. 48-72.
- AL-MERJAN, J.I., PANDOVA, M.G., AL-GHANIM, M., AL-WAYEL, A. and AL-MUTAIRI, S., 2005. Registered blindness and low vision in Kuwait. *Ophthalmic epidemiology*, **12**(4), pp. 251-257.
- ALOISI, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia*, **36**(2), pp. 165-179.
- AMES, A., 3rd and LI, Y.Y., 1992. Energy requirements of glutamatergic pathways in rabbit retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **12**(11), pp. 4234-4242.
- ANDRÉ, A. and GONTHIER, M., 2010a. The endocannabinoid system: Its roles in energy balance and potential as a target for obesity treatment. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **42**(11), pp. 1788-1801.
- ANDRÉ, A. and GONTHIER, M., 2010b. The endocannabinoid system: Its roles in energy balance and potential as a target for obesity treatment. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **42**(11), pp. 1788-1801.
- ARAUJO, D.M., LAPCHAK, P.A., COLLIER, B. and QUIRION, R., 1988. Characterization of N-[<sup>3</sup>H]methylcarbamylcholine binding sites and effect of N-methylcarbamylcholine on acetylcholine release in rat brain. *J Neurochem*, **51**(1), pp. 292-299.
- ASHTON, J.C., RAHMAN, R.M., NAIR, S.M., SUTHERLAND, B.A., GLASS, M. and APPLETON, I., 2007. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neuroscience letters*, **412**(2), pp. 114-117.
- BAILEY, S.A., ZIDELL, R.H. and PERRY, R.W., 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicologic pathology*, **32**(4), pp. 448-466.

- BAN, N., OZAWA, Y., INABA, T., MIYAKE, S., WATANABE, M., SHINMURA, K. and TSUBOTA, K., 2013. Light-dark condition regulates sirtuin mRNA levels in the retina. *Experimental gerontology*, **48**(11), pp. 1212-1217.
- BARHOUM, R., MARTINEZ-NAVARRETE, G., CORROCHANO, S., GERMAIN, F., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., DE LA ROSA, E.J., DE LA VILLA, P. and CUENCA, N., 2008. Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience*, **155**(3), pp. 698-713.
- BARTEL, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**(2), pp. 281-297.
- BARTOVA, A. and BIRMINGHAM, M.K., 1976. Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial NADH-oxidase activity. *The Journal of biological chemistry*, **251**(16), pp. 5002-5006.
- BÁTKAI, S., OSEI-HYIAMAN, D., PAN, H., EL-ASSAL, O., RAJESH, M., MUKHOPADHYAY, P., HONG, F., HARVEY-WHITE, J., JAFRI, A., HASKÓ, G., HUFFMAN, J.W., GAO, B., KUNOS, G. and PACHER, P., 2007. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *The FASEB Journal*, **21**(8), pp. 1788-1800.
- BAYLOR, D.A., 1987. Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, **28**(1), pp. 34-49.
- BENARD, G., MASSA, F., PUENTE, N., LOURENCO, J., BELLOCCHIO, L., SORIA-GOMEZ, E., MATIAS, I., DELAMARRE, A., METNA-LAURENT, M., CANNICH, A., HEBERT-CHATELAIN, E., MULLE, C., ORTEGA-GUTIERREZ, S., MARTIN-FONTECHA, M., KLUGMANN, M., GUGGENHUBER, S., LUTZ, B., GERTSCH, J., CHAULOUFF, F., LOPEZ-RODRIGUEZ, M.L., GRANDES, P., ROSSIGNOL, R. and MARSICANO, G., 2012. Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience*, **15**(4), pp. 558-564.
- BENOWITZ, N.L., 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **36**, pp. 597-613.
- BERDYSHEV, E.V., 2000. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chemistry and physics of lipids*, **108**(1-2), pp. 169-190.
- BERMUDEZ-SILVA, F.J., CARDINAL, P. and COTA, D., 2012. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, **26**(1), pp. 114-124.
- BERMUDEZ-SILVA, F.J., VIVEROS, M.P., MCPARTLAND, J.M. and RODRIGUEZ DE FONSECA, F., 2010a. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **95**(4), pp. 375-382.
- BERMUDEZ-SILVA, F.J., VIVEROS, M.P., MCPARTLAND, J.M. and RODRIGUEZ DE FONSECA, F., 2010b. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **95**(4), pp. 375-382.

- BERNAL, S., AYUSO, C., ANTINOLO, G., GIMENEZ, A., BORREGO, S., TRUJILLO, M.J., MARCOS, I., CALAF, M., DEL RIO, E. and BAIGET, M., 2003. Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *Journal of medical genetics*, **40**(1), pp. e8.
- BERSOL, E.L., 1990. *Ocular findings in a form of retinitis pigmentosa with a rhodopsin gene defect*.
- BERSON, D.M., 2007. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **454**(5), pp. 849-855.
- BERSON, D.M., DUNN, F.A. and TAKAO, M., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, **295**(5557), pp. 1070-1073.
- BERSON, E.L., 1990. Ocular findings in a form of retinitis pigmentosa with a rhodopsin gene defect. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, **88**, pp. 355-388.
- BHATTACHARYA, S.S., CLAYTON, J.F., HARPER, P.S., HOARE, G.W., JAY, M.R., LYNESS, A.L. and WRIGHT, A.F., 1985. A genetic linkage study of a kindred with X-linked retinitis pigmentosa. *The British journal of ophthalmology*, **69**(5), pp. 340-347.
- BIEGON, A. and KERMAN, I.A., 2001. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *NeuroImage*, **14**(6), pp. 1463-1468.
- BISCAIA, M., MARIN, S., FERNANDEZ, B., MARCO, E.M., RUBIO, M., GUAZA, C., AMBROSIO, E. and VIVEROS, M.P., 2003. Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology*, **170**(3), pp. 301-308.
- BISOGLIO, T. and DI MARZO, V., 2010. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, **9**(5), pp. 564-573.
- BODIS-WOLLNER, I., 1990. Visual deficits related to dopamine deficiency in experimental animals and Parkinson's disease patients. *Trends in neurosciences*, **13**(7), pp. 296-302.
- BOJANOWSKA, E. and RADZISZEWSKA, E., 2011. Combined stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor and inhibition of cannabinoid CB1 receptor act synergistically to reduce food intake and body weight in the rat. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, **62**(4), pp. 395-402.
- BOSIER, B., SARRE, S., SMOLDERS, I., MICHOTTE, Y., HERMANS, E. and LAMBERT, D.M., 2010. Revisiting the complex influences of cannabinoids on motor functions unravels pharmacodynamic differences between cannabinoid agonists. *Neuropharmacology*, **59**(6), pp. 503-510.
- BOUSKILA, J., BURKE, M.W., ZABOURI, N., CASANOVA, C., PTITO, M. and BOUCHARD, J.F., 2012. Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys. *Neuroscience*, **202**, pp. 117-130.

- BOUSKILA, J., JAVADI, P., CASANOVA, C., PTITO, M. and BOUCHARD, J.F., 2013a. Muller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *The Journal of comparative neurology*, **521**(11), pp. Spc1.
- BOUSKILA, J., JAVADI, P., CASANOVA, C., PTITO, M. and BOUCHARD, J.F., 2013b. Rod photoreceptors express GPR55 in the adult vervet monkey retina. *PloS one*, **8**(11), pp. e81080.
- BOVOLENTA, P. and CISNEROS, E., 2009. Retinitis pigmentosa: cone photoreceptors starving to death. *Nature neuroscience*, **12**(1), pp. 5-6.
- BOYCOTT, B.B., HOPKINS, J.M. and SPERLING, H.G., 1987. Cone connections of the horizontal cells of the rhesus monkey's retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **229**(1257), pp. 345-379.
- BOYCOTT, B.B. and WASSLE, H., 1991. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *The European journal of neuroscience*, **3**(11), pp. 1069-1088.
- BRANDSTATTER, J.H., 2002. Glutamate receptors in the retina: the molecular substrate for visual signal processing. *Current eye research*, **25**(6), pp. 327-331.
- BRANDSTATTER, J.H., FLETCHER, E.L., GARNER, C.C., GUNDELFINGER, E.D. and WASSLE, H., 1999. Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *The European journal of neuroscience*, **11**(10), pp. 3683-3693.
- BREIVOGEL, C.S. and CHILDERS, S.R., 1998. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiology of disease*, **5**(6 Pt B), pp. 417-431.
- BREIVOGEL, C.S., GRIFFIN, G., DI MARZO, V. and MARTIN, B.R., 2001. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Molecular pharmacology*, **60**(1), pp. 155-163.
- BRENNEISEN, R., 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. *Marijuana and the Cannabinoids*. ElSohly, M.A., Ed.; Humana edn. Totowa Press, pp. 17-49.
- BROWN, A.J., 2007. Novel cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology*, **152**(5), pp. 567-575.
- BUCH, H., VINDING, T., LA COUR, M., APPELYARD, M., JENSEN, G.B. and NIELSEN, N.V., 2004. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology*, **111**(1), pp. 53-61.
- BUCKINGHAM, S.D., JONES, A.K., BROWN, L.A. and SATTELLE, D.B., 2009. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacological reviews*, **61**(1), pp. 39-61.
- CARLISLE, S.J., MARCIANO-CABRAL, F., STAAB, A., LUDWICK, C. and CABRAL, G.A., 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and

macrophage-like cells in relation to cell activation. *International immunopharmacology*, **2**(1), pp. 69-82.

CARLSON, N.R., 2012. *Physiology of behavior*. 11 edn. Harlow, UK: Pearson-Prentice Hall.

CARTER, G.T., ABOOD, M.E., AGGARWAL, S.K. and WEISS, M.D., 2010. Cannabis and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Hypothetical and Practical Applications, and a Call for Clinical Trials. *Am J Hosp Palliat Care*, .

CARTER, C.S., 2003. Developmental consequences of oxytocin. *Physiology & Behavior*, **79**(3), pp. 383-397.

CASAGRANDE, V.A., 1994. A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends in neurosciences*, **17**(7), pp. 305-310.

CECYRE, B., ZABOURI, N., HUPPE-GOURGUES, F., BOUCHARD, J.F. and CASANOVA, C., 2013. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, **54**(13), pp. 8079-8090.

CHAN, T.L., MARTIN, P.R., CLUNAS, N. and GRUNERT, U., 2001. Bipolar cell diversity in the primate retina: morphologic and immunocytochemical analysis of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *The Journal of comparative neurology*, **437**(2), pp. 219-239.

CHAVEZ-TAPIA, N.C., TELLEZ-AVILA, F.I., BEDOGNI, G., CROCE, L.S., MASUTTI, F. and TIRIBELLI, C., 2009. Systematic review and meta-analysis on the adverse events of rimonabant treatment: considerations for its potential use in hepatology. *BMC gastroenterology*, **9**, pp. 75-230X-9-75.

CHEN, B. and CEPKO, C.L., 2009. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science (New York, N.Y.)*, **323**(5911), pp. 256-259.

CHEN, Y. and BUCK, J., 2000. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **293**(3), pp. 807-812.

CHRYSOSTOMOU, V., STONE, J., STOWE, S., BARNETT, N.L. and VALTER, K., 2008. The status of cones in the rhodopsin mutant P23H-3 retina: light-regulated damage and repair in parallel with rods. *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**(3), pp. 1116-1125.

CHRYSOSTOMOU, V., STONE, J. and VALTER, K., 2009. Life history of cones in the rhodopsin-mutant P23H-3 rat: evidence of long-term survival. *Investigative ophthalmology & visual science*, **50**(5), pp. 2407-2416.

CHRYSOSTOMOU, V., VALTER, K. and STONE, J., 2009. Cone-rod dependence in the rat retina: variation with the rate of rod damage. *Investigative ophthalmology & visual science*, **50**(6), pp. 3017-3023.

CHU, Y., HUMPHREY, M.F. and CONSTABLE, I.J., 1993. Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina: a wholemount study using immunolabelling for the 28-kDa calcium-binding protein. *Experimental eye research*, **57**(2), pp. 141-148.

CITRARO, R., RUSSO, E., SCICCHITANO, F., VAN RIJN, C.M., COSCO, D., AVAGLIANO, C., RUSSO, R., D'AGOSTINO, G., PETROSINO, S., GUIDA, F., GATTA, L., VAN LUIJTELAAR, G., MAIONE, S., DI MARZO, V., CALIGNANO, A. and DE SARRO, G., 2013. Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR-alpha receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*, **69**, pp. 115-126.

COLES, B.L., ANGENIEUX, B., INOUE, T., DEL RIO-TSONIS, K., SPENCE, J.R., MCINNES, R.R., ARSENIJEVIC, Y. and VAN DER KOOY, D., 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(44), pp. 15772-15777.

COTA, D., MARSICANO, G., LUTZ, B., VICENNATI, V., STALLA, G.K., PASQUALI, R. and PAGOTTO, U., 2003. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, **27**(3), pp. 289-301.

CRAGG, S.J., 2006. Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends in neurosciences*, **29**(3), pp. 125-131.

CRANDALL, J., MATRAGOON, S., KHALIFA, Y.M., BORLONGAN, C., TSAI, N.T., CALDWELL, R.B. and LIOU, G.I., 2007. Neuroprotective and intraocular pressure-lowering effects of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol in a rat model of glaucoma. *Ophthalmic research*, **39**(2), pp. 69-75.

CRAVATT, B.F., DEMAREST, K., PATRICELLI, M.P., BRACEY, M.H., GIANG, D.K., MARTIN, B.R. and LICHTMAN, A.H., 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(16), pp. 9371-9376.

CRAWLEY, J.N., CORWIN, R.L., ROBINSON, J.K., FELDER, C.C., DEVANE, W.A. and AXELROD, J., 1993. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **46**(4), pp. 967-972.

CRISTINO, L., DE PETROCELLIS, L., PRYCE, G., BAKER, D., GUGLIELMOTTI, V. and DI MARZO, V., 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, **139**(4), pp. 1405-1415.

CROCI, T., MANARA, L., AUREGGI, G., GUAGNINI, F., RINALDI-CARMONA, M., MAFFRAND, J.P., LE FUR, G., MUKENGE, S. and FERLA, G., 1998. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *British journal of pharmacology*, **125**(7), pp. 1393-1395.

CUENCA, N., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., CAMPELLO, L., MANEU, V., DE LA VILLA, P., LAX, P. and PINILLA, I., 2014. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in retinal and eye research*, **43**, pp. 17-75.

CUENCA, N., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., MCGILL, T.J., LU, B., WANG, S., LUND, R., HUHN, S. and CAPELA, A., 2013. Phagocytosis of photoreceptor outer segments by transplanted human

neural stem cells as a neuroprotective mechanism in retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, **54**(10), pp. 6745-6756.

CUENCA, N., PINILLA, I., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., SALINAS-NAVARRO, M., ALARCON-MARTINEZ, L., AVILES-TRIGUEROS, M., DE LA VILLA, P., MIRALLES DE IMPERIAL, J., VILLEGAS-PEREZ, M.P. and VIDAL-SANZ, M., 2010. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Experimental eye research*, **91**(2), pp. 273-285.

CUENCA, N., PINILLA, I., SAUVE, Y., LU, B., WANG, S. and LUND, R.D., 2004. Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience*, **127**(2), pp. 301-317.

CUENCA, N., PINILLA, I., SAUVE, Y. and LUND, R., 2005. Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *The European journal of neuroscience*, **22**(5), pp. 1057-1072.

DAGON, Y., AVRAHAM, Y., LINK, G., ZOLOTAREV, O., MECHOULAM, R. and BERRY, E.M., 2007a. The synthetic cannabinoid HU-210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma PC12 cells. *Neurobiology of disease*, **27**(2), pp. 174-181.

DAGON, Y., AVRAHAM, Y., LINK, G., ZOLOTAREV, O., MECHOULAM, R. and BERRY, E.M., 2007b. The synthetic cannabinoid HU-210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma PC12 cells. *Neurobiology of disease*, **27**(2), pp. 174-181.

DALTON, V.S., WANG, H. and ZAVITSANOU, K., 2009. HU210-induced downregulation in cannabinoid CB1 receptor binding strongly correlates with body weight loss in the adult rat. *Neurochemical research*, **34**(7), pp. 1343-1353.

DALTON, V.S. and ZAVITSANOU, K., 2010. Cannabinoid effects on CB1 receptor density in the adolescent brain: an autoradiographic study using the synthetic cannabinoid HU210. *Synapse (New York, N.Y.)*, **64**(11), pp. 845-854.

D'CRUZ, P.M., YASUMURA, D., WEIR, J., MATTHES, M.T., ABDERRAHIM, H., LAVAIL, M.M. and VOLLRATH, D., 2000. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Human molecular genetics*, **9**(4), pp. 645-651.

DELGADO-PELAYO, A., 2012. Retinosis Pigmentaria. *Revista Médica MD*, **3**(3),.

DELYFER, M.N., FORSTER, V., NEVEUX, N., PICAUD, S., LEVEILLARD, T. and SAHEL, J.A., 2005. Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Molecular vision*, **11**, pp. 688-696.

DEUTSCH, D.G. and CHIN, S.A., 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical pharmacology*, **46**(5), pp. 791-796.

DEVANE, W.A., DYSARZ, F.A., 3rd, JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S. and HOWLETT, A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, **34**(5), pp. 605-613.

- DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. and MECHOULAM, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **258**(5090), pp. 1946-1949.
- DEWEY, W.L., 1986. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews*, **38**(2), pp. 151-178.
- DI MAIO, R., CANNON, J.R. and GREENAMYRE, J.T., 2015. Post-status epilepticus treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents chronic epileptic hippocampal damage in rats. *Neurobiology of disease*, **73**, pp. 356-365.
- DI MARZO, V., BREIVOGEL, C.S., TAO, Q., BRIDGEN, D.T., RAZDAN RK, Z., A.M. and MARTIN, B.R., 2000. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem*, **75**(6), pp. 2434-2444.
- DI MARZO, V., GOPARAJU, S.K., WANG, L., LIU, J., BATKAI, S., JARAI, Z., FEZZA, F., MIURA, G.I., PALMITER, R.D., SUGIURA, T. and KUNOS, G., 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, **410**(6830), pp. 822-825.
- DICK, O., TOM DIECK, S., ALTROCK, W.D., AMMERMULLER, J., WEILER, R., GARNER, C.C., GUNDELFINGER, E.D. and BRANDSTATTER, J.H., 2003. The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron*, **37**(5), pp. 775-786.
- DJAMGOZ, M.B., HANKINS, M.W., HIRANO, J. and ARCHER, S.N., 1997. Neurobiology of retinal dopamine in relation to degenerative states of the tissue. *Vision research*, **37**(24), pp. 3509-3529.
- DMITRIEVA, N.A., STRANG, C.E. and KEYSER, K.T., 2007. Expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors by bipolar, amacrine, and ganglion cells of the rabbit retina. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, **55**(5), pp. 461-476.
- DONOHOE, T.P., 1984. Stress-induced anorexia: implications for anorexia nervosa. *Life Sciences*, **34**(3), pp. 203-218.
- DORFMAN, A.L., CUENCA, N., PINILLA, I., CHEMTOB, S. and LACHAPPELLE, P., 2011. Immunohistochemical evidence of synaptic retraction, cytoarchitectural remodeling, and cell death in the inner retina of the rat model of oxygen-induced retinopathy (OIR). *Investigative ophthalmology & visual science*, **52**(3), pp. 1693-1708.
- DRYJA, T.P., MCEVOY, J.A., MCGEE, T.L. and BERSON, E.L., 2000. Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, **41**(10), pp. 3124-3127.
- DRYJA, T.P., MCGEE, T.L., REICHEL, E., HAHN, L.B., COWLEY, G.S., YANDELL, D.W., SANDBERG, M.A. and BERSON, E.L., 1990. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*, **343**(6256), pp. 364-366.

ECKENSTEIN, F. and THOENEN, H., 1982. Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *The EMBO journal*, **1**(3), pp. 363-368.

EGERTOVA, M. and ELPHICK, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *The Journal of comparative neurology*, **422**(2), pp. 159-171.

EGERTOVA, M., GIANG, D.K., CRAVATT, B.F. and ELPHICK, M.R., 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*, **265**(1410), pp. 2081-2085.

EL-AMRAOUI, A. and PETIT, C., 2014. The retinal phenotype of Usher syndrome: pathophysiological insights from animal models. *Comptes rendus biologies*, **337**(3), pp. 167-177.

ELJASCHEWITSCH, E., WITTING, A., MAWRIN, C., LEE, T., SCHMIDT, P.M., WOLF, S., HOERTNAGL, H., RAINE, C.S., SCHNEIDER-STOCK, R., NITSCH, R. and ULLRICH, O., 2006. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*, **49**(1), pp. 67-79.

ELPHICK, M.R., 2012. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **367**(1607), pp. 3201-3215.

ELPHICK, M.R. and EGERTOVA, M., 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **356**(1407), pp. 381-408.

EL-REMESSY, A.B., KHALIL, I.E., MATRAGOON, S., ABOU-MOHAMED, G., TSAI, N.J., ROON, P., CALDWELL, R.B., CALDWELL, R.W., GREEN, K. and LIOU, G.I., 2003a. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *The American journal of pathology*, **163**(5), pp. 1997-2008.

EL-REMESSY, A.B., KHALIL, I.E., MATRAGOON, S., ABOU-MOHAMED, G., TSAI, N.J., ROON, P., CALDWELL, R.B., CALDWELL, R.W., GREEN, K. and LIOU, G.I., 2003b. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *The American journal of pathology*, **163**(5), pp. 1997-2008.

EL-REMESSY, A.B., RAJESH, M., MUKHOPADHYAY, P., HORVATH, B., PATEL, V., AL-GAYYAR, M.M., PILLAI, B.A. and PACHER, P., 2011. Cannabinoid 1 receptor activation contributes to vascular inflammation and cell death in a mouse model of diabetic retinopathy and a human retinal cell line. *Diabetologia*, **54**(6), pp. 1567-1578.

EL-REMESSY, A.B., AL-SHABRAWAY, M., KHALIFA, Y., TSAI, N., CALDWELL, R.B. and LIOU, G.I., 2006. Neuroprotective and Blood-Retinal Barrier-Preserving Effects of Cannabidiol in Experimental Diabetes. *The American Journal of Pathology*, **168**(1), pp. 235-244.

- ESQUIVA, G., LAX, P. and CUENCA, N., 2013. Impairment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells associated with late stages of retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, **54**(7), pp. 4605-4618.
- ESTEVE-RUDD, J., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., LAX, P., DE JUAN, E., MARTIN-NIETO, J. and CUENCA, N., 2011. Rotenone induces degeneration of photoreceptors and impairs the dopaminergic system in the rat retina. *Neurobiology of disease*, **44**(1), pp. 102-115.
- EVEREKLIOGLU, C., ALAŞEHIRLI, B., SARI, I., CENGİZ, B. and BAGCI, C., 2004. Effect of nicotine exposure during gestation on neonatal rat crystalline lenses. *Eye*, **18**(1), pp. 67-73.
- FAN, S.F. and YAZULLA, S., 2003. Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Visual neuroscience*, **20**(2), pp. 177-188.
- FARISS, R.N., LI, Z.Y. and MILAM, A.H., 2000. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *American Journal of Ophthalmology*, **129**(2), pp. 215-223.
- FERNANDEZ-BUENO, I., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., GAYOSO, M.J., GARCIA-GUTIERREZ, M.T., PASTOR, J.C. and CUENCA, N., 2012. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Experimental eye research*, **104**, pp. 26-38.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., GARCIA, C., SAGREDO, O., GOMEZ-RUIZ, M. and DE LAGO, E., 2010. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert opinion on therapeutic targets*, **14**(4), pp. 387-404.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., ROMERO, J., VELASCO, G., TOLON, R.M., RAMOS, J.A. and GUZMAN, M., 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends in pharmacological sciences*, **28**(1), pp. 39-45.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, L., DE SEVILLA MULLER, L.P., BRECHA, N.C. and CUENCA, N., 2014. Loss of outer retinal neurons and circuitry alterations in the DBA/2J mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, **55**(9), pp. 6059-6072.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, L., LAX, P., ESQUIVA, G., MARTIN-NIETO, J., PINILLA, I. and CUENCA, N., 2012a. Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PloS one*, **7**(8), pp. e43074.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, L., LAX, P., ISIEGAS, C., AYUSO, E., RUIZ, J.M., DE LA VILLA, P., BOSCH, F., DE LA ROSA, E.J. and CUENCA, N., 2012b. Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa. *Human Gene Therapy*, **23**(12), pp. 1290-1300.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, L., LAX, P., PINILLA, I., MARTIN-NIETO, J. and CUENCA, N., 2011. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, **52**(8), pp. 4998-5008.

- FERRARI, F., OTTANI, A. and GIULIANI, D., 1999a. Cannabimimetic activity in rats and pigeons of HU 210, a potent antiemetic drug. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **62**(1), pp. 75-80.
- FERRARI, F., OTTANI, A. and GIULIANI, D., 1999b. Influence of the cannabinoid agonist HU 210 on cocaine- and CQP 201-403-induced behavioural effects in rat. *Life Sciences*, **65**(8), pp. 823-831.
- FERRARI, S., DI IORIO, E., BARBARO, V., PONZIN, D., SORRENTINO, F.S. and PARMEGGIANI, F., 2011. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current Genomics*, **12**(4), pp. 238-249.
- FISAR, Z., SINGH, N. and HROUDOVA, J., 2014. Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicology letters*, **231**(1), pp. 62-71.
- FISHER, S.K., LEWIS, G.P., LINBERG, K.A. and VERARDO, M.R., 2005. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Progress in retinal and eye research*, **24**(3), pp. 395-431.
- FLOREANI, A., LAZZARI, R., MACCHI, V., PORZIONATO, A., VARIOLA, A., COLAVITO, D., LEON, A., GUIDO, M., BALDO, V., DE CARO, R. and BERGASA, N.V., 2010. Hepatic expression of endocannabinoid receptors and their novel polymorphisms in primary biliary cirrhosis. *Journal of gastroenterology*, **45**(1), pp. 68-76.
- FLORES-RODRÍGUEZ, P., LOMA SERRANO, E., GILI, P. and CARRACEDO, G., 2013. Retinitis pigmentosa. *Gaceta de optometria y optica oftalmica*, **481**.
- FUCHS, M., SCHOLZ, M., SENDELBECK, A., ATORF, J., SCHLEGEL, C., ENZ, R. and BRANDSTATTER, J.H., 2012. Rod photoreceptor ribbon synapses in DBA/2J mice show progressive age-related structural changes. *PloS one*, **7**(9), pp. e44645.
- GAMBER, K.M., MACARTHUR, H. and WESTFALL, T.C., 2005. Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology*, **49**(5), pp. 646-652.
- GARCIA-ARENCEBIA, M., GONZALEZ, S., DE LAGO, E., RAMOS, J.A., MECHOULAM, R. and FERNANDEZ-RUIZ, J., 2007. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain research*, **1134**(1), pp. 162-170.
- GARCIA-AYUSO, D., ORTIN-MARTINEZ, A., JIMENEZ-LOPEZ, M., GALINDO-ROMERO, C., CUENCA, N., PINILLA, I., VIDAL-SANZ, M., AGUDO-BARRIUSO, M. and VILLEGAS-PEREZ, M.P., 2013. Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival. *Investigative ophthalmology & visual science*, **54**(8), pp. 5888-5900.
- GARCIA-AYUSO, D., SALINAS-NAVARRO, M., AGUDO, M., CUENCA, N., PINILLA, I., VIDAL-SANZ, M. and VILLEGAS-PEREZ, M.P., 2010. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Experimental eye research*, **91**(6), pp. 800-810.

GARGINI, C., TERZIBASI, E., MAZZONI, F. and STRETTOLI, E., 2007. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *The Journal of comparative neurology*, **500**(2), pp. 222-238.

GAWIENOWSKI, A.M., CHATTERJEE, D., ANDERSON, P.J., EPSTEIN, D.L. and GRANT, W.M., 1982. Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on monoamine oxidase activity in bovine eye tissues, in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*, **22**(4), pp. 482-485.

GENESER, F., 2000. El ojo. *Histología*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, pp. 24: 706-708.

GERARD, C.M., MOLLEREAU, C., VASSART, G. and PARMENTIER, M., 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *The Biochemical journal*, **279** ( Pt 1)(Pt 1), pp. 129-134.

GIACOPPO, S., MANDOLINO, G., GALUPPO, M., BRAMANTI, P. and MAZZON, E., 2014. Cannabinoids: New Promising Agents in the Treatment of Neurological Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **19**(11), pp. 18781-18816.

GIMPL, G. and FAHRENHOLZ, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, **81**(2), pp. 629-683.

GIULIANI, D., FERRARI, F. and OTTANI, A., 2000. The Cannabinoid Agonist Hu 210 Modifies Rat Behavioural Responses to Novelty and Stress. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **41**(1), pp. 45-51.

GIULIANI, D., OTTANI, A. and FERRARI, F., 2000. Effects of the cannabinoid receptor agonist, HU 210, on ingestive behaviour and body weight of rats. *European journal of pharmacology*, **391**(3), pp. 275-279.

GLASS, M., FAULL, R.L.M. and DRAGUNOW, M., 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, **77**(2), pp. 299-318.

GOTTI, C. and CLEMENTI, F., 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in neurobiology*, **74**(6), pp. 363-396.

GRACEFFO, T.J. and ROBINSON, J.K., 1998. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) fails to stimulate consumption of a highly palatable food in the rat. *Life Sciences*, **62**(8), pp. PL85-8.

GREGORY-EVANS, C.Y., WALLACE, V.A. and GREGORY-EVANS, K., 2013. Gene networks: dissecting pathways in retinal development and disease. *Progress in retinal and eye research*, **33**, pp. 40-66.

GROSSMANN, R., STENCE, N., CARR, J., FULLER, L., WAITE, M. and DAILEY, M.E., 2002. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia*, **37**(3), pp. 229-240.

GRÜNERT, U., HAVERKAMP, S., FLETCHER, E.L. and WÄSSLE, H., 2002. Synaptic distribution of ionotropic glutamate receptors in the inner plexiform layer of the primate retina. *The Journal of comparative neurology*, **447**(2), pp. 138-151.

- GUNDOGAN, F.C., ERDURMAN, C., DURUKAN, A.H., SOBACI, G. and BAYRAKTAR, M.Z., 2007. Acute effects of cigarette smoking on multifocal electroretinogram. *Clinical & experimental ophthalmology*, **35**(1), pp. 32-37.
- GUPTA, N., BROWN, K.E. and MILAM, A.H., 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental eye research*, **76**(4), pp. 463-471.
- HAMPSON, A.J., GRIMALDI, M., AXELROD, J. and WINK, D., 1998. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(14), pp. 8268-8273.
- HAMPSON, R.E., MU, J. and DEADWYLER, S.A., 2000. Cannabinoid and kappa opioid receptors reduce potassium K current via activation of G(s) proteins in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology*, **84**(5), pp. 2356-2364.
- HAO, S., AVRAHAM, Y., MECHOULAM, R. and BERRY, E.M., 2000. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *European journal of pharmacology*, **392**(3), pp. 147-156.
- HARE, W.A. and WHEELER, L., 2009. Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: Block by memantine. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **50**(6), pp. 2940-2948.
- HARRIS, J., JOLIVET, R. and ATTWELL, D., 2012. Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*, **75**(5), pp. 762-777.
- HARTONG, D.T., BERSON, E.L. and DRYJA, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, **368**(9549), pp. 1795-1809.
- HATA, H., YONEZAWA, M., NAKANISHI, T., RI T. and ET AL., 2003. **Causes of entering institutions for visually handicapped persons during the past fifteen years.** *Japanese Journal of Clinical Ophthalmology (Rinsho Ganka)*, **57**, pp. 259-262.
- HENKIND, P., HANSEN, R.I. and SZALAY, J., 1979. Ocular circulation. *Physiology of the human eye and visual system*. Record, pp. 98-155.
- HERKENHAM, M., LYNN, A.B., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE COSTA, B.R. and RICE, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **11**(2), pp. 563-583.
- HIGGS, S., BARBER, D.J., COOPER, A.J. and TERRY, P., 2005. Differential effects of two cannabinoid receptor agonists on progressive ratio responding for food and free-feeding in rats. *Behavioural pharmacology*, **16**(5-6), pp. 389-393.
- HIJIOKA MASANORI, M., KATSUKI, H., HIJIOKA, M., HISATSUNE, A., ISOHAMA, Y. and MATSUSHITA, H., 2011. Therapeutic effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **338**(3), pp. 741-9.

- HILLARD, C.J., 2000. Endocannabinoids and Vascular Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **294**(1), pp. 27-32.
- HILLARD, C.J., MUTHIAN, S. and KEARN, C.S., 1999. Effects of CB1 cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity. *FEBS letters*, **459**(2), pp. 277-281.
- HOON, M., OKAWA, H., DELLA SANTINA, L. and WONG, R.O., 2014. Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in retinal and eye research*, **42**, pp. 44-84.
- HOPKINS, J.M. and BOYCOTT, B.B., 1995. Synapses between cones and diffuse bipolar cells of a primate retina. *Journal of neurocytology*, **24**(9), pp. 680-694.
- HOWLETT, A.C., BARTH, F., BONNER, T.I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W.A., FELDER, C.C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B.R., MECHOULAM, R. and PERTWEE, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, **54**(2), pp. 161-202.
- HOWLETT, A.C., CHAMPION, T.M., WILKEN, G.H. and MECHOULAM, R., 1990. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology*, **29**(2), pp. 161-165.
- HU, S.S., ARNOLD, A., HUTCHENS, J.M., RADICKE, J., CRAVATT, B.F., WAGER-MILLER, J., MACKIE, K. and STRAIKER, A., 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, **518**(18), pp. 3848-3866.
- HUMPHRIES, M.M., RANCOURT, D., FARRAR, G.J., KENNA, P., HAZEL, M., BUSH, R.A., SIEVING, P.A., SHEILS, D.M., MCNALLY, N., CREIGHTON, P., ERVEN, A., BOROS, A., GULYA, K., CAPECCHI, M.R. and HUMPHRIES, P., 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nature genetics*, **15**(2), pp. 216-219.
- IWAMOTO, K., BIRKHOLZ, P., SCHIPPER, A., MATA, D., LINN, D.M. and LINN, C.L., 2014. A nicotinic acetylcholine receptor agonist prevents loss of retinal ganglion cells in a glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **55**(2), pp. 1078-1087.
- IWAMOTO, K., MATA, D., LINN, D.M. and LINN, C.L., 2013. Neuroprotection of rat retinal ganglion cells mediated through alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*, **237**, pp. 184-198.
- JALIFFA, C., AMEQRANE, I., DANSAULT, A., LEEMPUT, J., VIEIRA, V., LACASSAGNE, E., PROVOST, A., BIGOT, K., MASSON, C., MENASCHE, M. and ABITBOL, M., 2009. Sirt1 involvement in rd10 mouse retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, **50**(8), pp. 3562-3572.
- JAMSHIDI, N. and TAYLOR, D.A., 2001. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British journal of pharmacology*, **134**(6), pp. 1151-1154.
- JÁRAI, Z., WAGNER, J.A., VARGA, K., LAKE, K.D., COMPTON, D.R., MARTIN, B.R., ZIMMER, A.M., BONNER, T.I., BUCKLEY, N.E., MEZEY, E., RAZDAN, R.K., ZIMMER, A. and KUNOS, G., 1999.

Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(24), pp. 14136-14141.

JBILLO, O., RAVINET-TRILLOU, C., ARNONE, M., BUISSON, I., BRIBES, E., PELERAUX, A., PENARIER, G., SOUBRIE, P., LE FUR, G., GALIEGUE, S. and CASELLAS, P., 2005. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**(11), pp. 1567-1569.

JELINEK, H.F., RISTANOVIC, D. and MILOSEVIC, N.T., 2011. The morphology and classification of alpha ganglion cells in the rat retinae: a fractal analysis study. *Journal of neuroscience methods*, **201**(1), pp. 281-287.

JEONG, W.I., OSEI-HYIAMAN, D., PARK, O., LIU, J., BATKAI, S., MUKHOPADHYAY, P., HORIGUCHI, N., HARVEY-WHITE, J., MARSICANO, G., LUTZ, B., GAO, B. and KUNOS, G., 2008. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell metabolism*, **7**(3), pp. 227-235.

JIANG, W., ZHANG, Y., XIAO, L., VAN CLEEMPUT, J., JI, S.P., BAI, G. and ZHANG, X., 2005. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *The Journal of clinical investigation*, **115**(11), pp. 3104-3116.

JOHNSON, J.E., Jr, PERKINS, G.A., GIDDABASAPPA, A., CHANEY, S., XIAO, W., WHITE, A.D., BROWN, J.M., WAGGONER, J., ELLISMAN, M.H. and FOX, D.A., 2007. Spatiotemporal regulation of ATP and Ca<sup>2+</sup> dynamics in vertebrate rod and cone ribbon synapses. *Molecular vision*, **13**, pp. 887-919.

JOURDAN, T., DJAOUTI, L., DEMIZIEUX, L., GRESE, J., VERGES, B. and DEGRACE, P., 2010. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, **59**(4), pp. 926-934.

JULIEN, B., GRENARD, P., TEIXEIRA-CLERC, F., VAN NHIEU, J.T., LI, L., KARSAK, M., ZIMMER, A., MALLAT, A. and LOTERSZTAJN, S., 2005. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, **128**(3), pp. 742-755.

JUNEMANN, G. and DAMASKE, E., 1968. The effect of smoking on the human electroretinogram (ERG). *Munchener medizinische Wochenschrift (1950)*, **110**(10), pp. 586-590.

JURKLIES, B., KAELIN-LANG, A. and NIEMEYER, G., 1996. Cholinergic effects on cat retina In vitro: changes in rod- and cone-driven b-wave and optic nerve response. *Vision research*, **36**(6), pp. 797-816.

KALLONIATIS, M., MARC, R.E. and MURRY, R.F., 1996. Amino acid signatures in the primate retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**(21), pp. 6807-6829.

KATSIDONI, V., KASTELLAKIS, A. and PANAGIS, G., 2013. Biphasic effects of Delta9-tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. *The international*

*journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, **16**(10), pp. 2273-2284.

KHALKI, H., KHALKI, L., ABOUFATIMA, R., OUACHRIF, A., MOUNTASSIR, M., BENHARREF, A. and CHAIT, A., 2012. Prenatal exposure to tobacco extract containing nicotinic alkaloids produces morphological and behavioral changes in newborn rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **101**(3), pp. 342-347.

KHASPEKOV, L.G., BRENZ VERCA, M.S., FRUMKINA, L.E., HERMANN, H., MARSICANO, G. and LUTZ, B., 2004. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *The European journal of neuroscience*, **19**(7), pp. 1691-1698.

KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., HONDA, K., NAKAMIZO, T., SHIBASAKI, H., KUME, T. and AKAIKE, A., 2001. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, **276**(17), pp. 13541-13546.

KIM, J., LI, Y. and WATKINS, B.A., 2011. Endocannabinoid signaling and energy metabolism: A target for dietary intervention. *Nutrition*, **27**(6), pp. 624-632.

KIRKHAM, T.C., WILLIAMS, C.M., FEZZA, F. and DI MARZO, V., 2002. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British journal of pharmacology*, **136**(4), pp. 550-557.

KOLB H. ET AL., 2013-last update, Webvision. The organization of the retina and visual system. Available: <http://webvision.med.utah.edu> ; <http://webvision.umh.es/webvision/index.html>.

KOLB, H., 1991. The neural organization of the human retina. *Principles and practices of clinical electrophysiology of vision*. Heckenlively JR, Arden GB, editors, Mosby Year Book Inc., pp. 25-52.

KOLB, B., 1989. Brain development, plasticity, and behavior. *American Psychologist*, **44**(9), pp. 1203-1212.

KRISHNAN, G. and CHATTERJEE, N., 2015. Anandamide rescues retinal barrier properties in Muller glia through nitric oxide regulation. *Neuroscience*, **284**, pp. 536-545.

KUBENA, R.K., PERHACH, J.L., Jr and BARRY, H., 3rd, 1971. Corticosterone elevation mediated centrally by delta 1-tetrahydrocannabinol in rats. *European journal of pharmacology*, **14**(1), pp. 89-92.

KUTE, V.B., VANIKAR, A.V., GUMBER, M.R., PATEL, H.V., SHAH, P.R., PATIL, S.B. and TRIVEDI, H.L., 2013. Bardet-biedl syndrome: a rare cause of chronic kidney disease. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, **28**(2), pp. 201-205.

LALONDE, M.R., JOLLIMORE, C.A., STEVENS, K., BARNES, S. and KELLY, M.E., 2006. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Molecular vision*, **12**, pp. 1160-1166.

- LAMBERS, D.S. and CLARK, K.E., 1996. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Seminars in perinatology*, **20**(2), pp. 115-126.
- LAX, P., ESQUIVA, G., ESTEVE-RUDD, J., OTALORA, B.B., MADRID, J.A. and CUENCA, N., 2012. Circadian dysfunction in a rotenone-induced parkinsonian rodent model. *Chronobiology international*, **29**(2), pp. 147-156.
- LAX, P., OTALORA, B.B., ESQUIVA, G., ROL MDE, L., MADRID, J.A. and CUENCA, N., 2011. Circadian dysfunction in P23H rhodopsin transgenic rats: effects of exogenous melatonin. *Journal of pineal research*, **50**(2), pp. 183-191.
- LE NOVERE, N., ZOLI, M. and CHANGEUX, J.P., 1996. Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *The European journal of neuroscience*, **8**(11), pp. 2428-2439.
- LEKER, R.R., GAI, N., MECHOULAM, R. and OVADIA, H., 2003. Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **34**(8), pp. 2000-2006.
- LEVEILLARD, T., MOHAND-SAID, S., LORENTZ, O., HICKS, D., FINTZ, A.C., CLERIN, E., SIMONUTTI, M., FORSTER, V., CAVUSOGLU, N., CHALMEL, F., DOLLE, P., POCH, O., LAMBROU, G. and SAHEL, J.A., 2004. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nature genetics*, **36**(7), pp. 755-759.
- LEVENES, C., DANIEL, H., SOUBRIE, P. and CREPEL, F., 1998. Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *The Journal of physiology*, **510** ( Pt 3)(Pt 3), pp. 867-879.
- LEWIS, G.P., LINBERG, K.A. and FISHER, S.K., 1998. Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment. *Investigative ophthalmology & visual science*, **39**(2), pp. 424-434.
- LEWIS, S.E., PARO, R., BORRIELLO, L., SIMON, L., ROBINSON, L., DINCER, Z., RIEDEL, G., BATTISTA, N. and MACCARRONE, M., 2012. Long-term use of HU210 adversely affects spermatogenesis in rats by modulating the endocannabinoid system. *International journal of andrology*, **35**(5), pp. 731-740.
- LI, C., JONES, P.M. and PERSAUD, S.J., 2011a. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacology & therapeutics*, **129**(3), pp. 307-320.
- LI, C., JONES, P.M. and PERSAUD, S.J., 2011b. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacology & therapeutics*, **129**(3), pp. 307-320.
- LI, Z., SCHMIDT, S.F. and FRIEDMAN, J.M., 2013. Developmental role for endocannabinoid signaling in regulating glucose metabolism and growth. *Diabetes*, **62**(7), pp. 2359-2367.
- LIN, B., MASLAND, R.H. and STRETTOI, E., 2009. Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Experimental eye research*, **88**(3), pp. 589-599.

- LIU, G.I., AUCHAMPACH, J.A., HILLARD, C.J., ZHU, G., YOUSUFZAI, B., MIAN, S., KHAN, S. and KHALIFA, Y., 2008. Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**(12), pp. 5526-5531.
- LIPINA, C., IRVING, A.J. and HUNDAL, H.S., 2014. Mitochondria: a possible nexus for the regulation of energy homeostasis by the endocannabinoid system? *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **307**(1), pp. E1-13.
- LITTLE, P.J., COMPTON, D.R., MECHOULAM, R. and MARTIN, B.R., 1989a. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-THC-dimethylheptyl in mice and dogs. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **32**(3), pp. 661-666.
- LITTLE, P.J., COMPTON, D.R., MECHOULAM, R. and MARTIN, B.R., 1989b. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-THC-dimethylheptyl in mice and dogs. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **32**(3), pp. 661-666.
- LOGRANO, M.D. and ROMANO, M.R., 2004. Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *European journal of pharmacology*, **494**(1), pp. 55-62.
- LONDON, E.D., CONNOLLY, R.J., SZIKSZAY, M., WAMSLEY, J.K. and DAM, M., 1988. Effects of nicotine on local cerebral glucose utilization in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **8**(10), pp. 3920-3928.
- LOPEZ, E.M., TAGLIAFERRO, P., ONAIVI, E.S. and LOPEZ-COSTA, J.J., 2011. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse (New York, N.Y.)*, **65**(5), pp. 388-392.
- LOPEZ-DEL HOYO, N., FAZIOLI, L., LOPEZ-BEGINES, S., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., CUENCA, N., LLORENS, J., DE LA VILLA, P. and MENDEZ, A., 2012. Overexpression of guanylate cyclase activating protein 2 in rod photoreceptors in vivo leads to morphological changes at the synaptic ribbon. *PloS one*, **7**(8), pp. e42994.
- LOSCHER, C.J., HOKAMP, K., KENNA, P.F., IVENS, A.C., HUMPHRIES, P., PALFI, A. and FARRAR, G.J., 2007. Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome biology*, **8**(11), pp. R248.
- LOSCHER, C.J., HOKAMP, K., WILSON, J.H., LI, T., HUMPHRIES, P., FARRAR, G.J. and PALFI, A., 2008. A common microRNA signature in mouse models of retinal degeneration. *Experimental eye research*, **87**(6), pp. 529-534.
- LUCAS, R.J., FREEDMAN, M.S., MUNOZ, M., GARCIA-FERNANDEZ, J.M. and FOSTER, R.G., 1999. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science (New York, N.Y.)*, **284**(5413), pp. 505-507.
- LUNN, C.A., FINE, J.S., ROJAS-TRIANA, A., JACKSON, J.V., FAN, X., KUNG, T.T., GONSIORREK, W., SCHWARZ, M.A., LAVEY, B., KOZLOWSKI, J.A., NARULA, S.K., LUNDELL, D.J., HIPKIN, R.W. and BOBER, L.A., 2006. A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptor-selective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **316**(2), pp. 780-788.

- LUTZ, B., 2002. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, **66**(2-3), pp. 123-142.
- MACASKILL, A.F. and KITTLER, J.T., 2010. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends in cell biology*, **20**(2), pp. 102-112.
- MACHIDA, S., KONDO, M., JAMISON, J.A., KHAN, N.W., KONONEN, L.T., SUGAWARA, T., BUSH, R.A. and SIEVING, P.A., 2000a. P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Investigative ophthalmology & visual science*, **41**(10), pp. 3200-3209.
- MACHIDA, S., KONDO, M., JAMISON, J.A., KHAN, N.W., KONONEN, L.T., SUGAWARA, T., BUSH, R.A. and SIEVING, P.A., 2000b. P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology. *Investigative ophthalmology & visual science*, **41**(10), pp. 3200-3209.
- MACKIE, K., 2008. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J. Neuroendocrinol.*, **20**(1), pp. 10-4.
- MALLAT, A. and LOTERSZTAJN, S., 2010. Endocannabinoids and their role in fatty liver disease. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, **28**(1), pp. 261-266.
- MALLAT, A. and LOTERSZTAJN, S., 2008. Cannabinoid receptors as novel therapeutic targets for the management of non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes & metabolism*, **34**(6 Pt 2), pp. 680-684.
- MANEU, V., GERONA, G., FERNANDEZ, L., CUENCA, N. and LAX, P., 2010. Evidence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression in retinal pigment epithelial cells. *Visual neuroscience*, **27**(5-6), pp. 139-147.
- MARC, R.E. and JONES, B.W., 2003. Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations. *Molecular neurobiology*, **28**(2), pp. 139-147.
- MARC, R.E., JONES, B.W., WATT, C.B. and STRETTOI, E., 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. *Progress in retinal and eye research*, **22**(5), pp. 607-655.
- MARC, R.E., MURRY, R.F. and BASINGER, S.F., 1995. Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**(7 Pt 2), pp. 5106-5129.
- MARCHENA, M., LARA, J., AIJON, J., GERMAIN, F., DE LA VILLA, P. and VELASCO, A., 2011. The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Experimental eye research*, **93**(5), pp. 607-617.
- MARCO, E.M., ROMERO-ZERBO, S.Y., VIVEROS, M.P. and BERMUDEZ-SILVA, F.J., 2012. The role of the endocannabinoid system in eating disorders: pharmacological implications. *Behavioural pharmacology*, **23**(5-6), pp. 526-536.
- MARENCO, T., BERNSTEIN, S., CUMMING, P. and CLARKE, P.B., 2000. Effects of nicotine and chlorisondamine on cerebral glucose utilization in immobilized and freely-moving rats. *British journal of pharmacology*, **129**(1), pp. 147-155.

- MARESZ, K., CARRIER, E.J., PONOMAREV, E.D., HILLARD, C.J. and DITTEL, B.N., 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry*, **95**(2), pp. 437-445.
- MARIANI, A.P., 1990. Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *The Journal of comparative neurology*, **301**(3), pp. 382-400.
- MARSICANO, G., MOOSMANN, B., HERMANN, H., LUTZ, B. and BEHL, C., 2002. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *Journal of neurochemistry*, **80**(3), pp. 448-456.
- MARTIN, B.R., MECHOULAM, R. and RAZDAN, R.K., 1999. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sciences*, **65**(6-7), pp. 573-595.
- MARTIN-CALDERON, J.L., MUNOZ, R.M., VILLANUA, M.A., DEL ARCO, I., MORENO, J.L., DE FONSECA, F.R. and NAVARRO, M., 1998. Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *European journal of pharmacology*, **344**(1), pp. 77-86.
- MARTINEZ-NAVARRETE, G., SEILER, M.J., ARAMANT, R.B., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., PINILLA, I. and CUENCA, N., 2011. Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats. *Experimental eye research*, **92**(3), pp. 227-237.
- MASLAND, R.H. and LIVINGSTONE, C.J., 1976. Effect of stimulation with light on synthesis and release of acetylcholine by an isolated mammalian retina. *Journal of neurophysiology*, **39**(6), pp. 1210-1219.
- MASLOV, L.N., KRYLATOV, A.V. and LISHMANOV, Y.B., 2014. Role of cyclic nucleotides and NO synthase in mechanisms of cardioprotective effects of cannabinoid HU-210. *Bulletin of experimental biology and medicine*, **157**(5), pp. 588-591.
- MASLOV, L.N., LASUKOVA, O.V., KRYLATOV, A.V., KHANUSH, L. and LISHMANOV, I., 2012. Mediated role of NO-synthase, protein kinase C and KATP-channels in realization of cardioprotective impact of cannabinoid HU-210. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*, **75**(12), pp. 15-18.
- MASSEY, S.C., 1990. Chapter 11 Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Progress in Retinal Research*, **9**, pp. 399-425.
- MATHERS, C.D. and LONCAR, D., 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, **3**(11), pp. e442.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. and BONNER, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**(6284), pp. 561-564.
- MCGEE SANFTNER, L.H., ABEL, H., HAUSWIRTH, W.W. and FLANNERY, J.G., 2001. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **4**(6), pp. 622-629.

MECHOULAM, R., FEIGENBAUM, J.J., LANDER, N., SEGAL, M., JARBE, T.U., HILTUNEN, A.J. and CONSROE, P., 1988. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*, **44**(9), pp. 762-764.

MECHOULAM, R. and GAONI, Y., 1965. A Total Synthesis of D<sub>L</sub>-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, **87**, pp. 3273-3275.

MENDEZ-SANCHEZ, N., ZAMORA-VALDES, D., PICHARDO-BAHENA, R., BARREDO-PRIETO, B., PONCIANO-RODRIGUEZ, G., BERMEJO-MARTINEZ, L., CHAVEZ-TAPIA, N.C., BAPTISTA-GONZALEZ, H.A. and URIBE, M., 2007. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, **27**(2), pp. 215-219.

MERZOUKI, A. and MOLERO MESA, J., 1999. La [sic] chanvre (*Cannabis sativa* L.) dans la pharmacopée traditionnelle du Rif (nord du Maroc). *Ars Pharmaceutica*, **40**, pp. 233-240.

MEZEY, É, TÓTH, Z.E., CORTRIGHT, D.N., ARZUBI, M.K., KRAUSE, J.E., ELDE, R., GUO, A., BLUMBERG, P.M. and SZALLASI, A., 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(7), pp. 3655-3660.

MICHALAKIS, S., SCHAFFERHOFF, K., SPIWOKS-BECKER, I., ZABOURI, N., KOCH, S., KOCH, F., BONIN, M., BIEL, M. and HAVERKAMP, S., 2013. Characterization of neurite outgrowth and ectopic synaptogenesis in response to photoreceptor dysfunction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **70**(10), pp. 1831-1847.

MICHLER, T., STORR, M., KRAMER, J., OCHS, S., MALO, A., REU, S., GOKE, B. and SCHAFFER, C., 2013. Activation of cannabinoid receptor 2 reduces inflammation in acute experimental pancreatitis via intra-acinar activation of p38 and MK2-dependent mechanisms. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **304**(2), pp. G181-92.

MIDDLETON, T.P. and PROTTI, D.A., 2011. Cannabinoids modulate spontaneous synaptic activity in retinal ganglion cells. *Visual neuroscience*, **28**(5), pp. 393-402.

MILAM, A.H., LI, Z.Y. and FARISS, R.N., 1998. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Progress in retinal and eye research*, **17**(2), pp. 175-205.

MIWA, J.M., FREEDMAN, R. and LESTER, H.A., 2011. Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses. *Neuron*, **70**(1), pp. 20-33.

MOEZI, L., GASKARI, S.A., LIU, H., BAIK, S.K., DEHPOUR, A.R. and LEE, S.S., 2006. Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via CB(1) and VR(1) receptors. *British journal of pharmacology*, **149**(7), pp. 898-908.

MOHAND-SAID, S., DEUDON-COMBE, A., HICKS, D., SIMONUTTI, M., FORSTER, V., FINTZ, A.C., LEVEILLARD, T., DREYFUS, H. and SAHEL, J.A., 1998. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(14), pp. 8357-8362.

- MOLINA-HOLGADO, F., PINTEAUX, E., MOORE, J.D., MOLINA-HOLGADO, E., GUAZA, C., GIBSON, R.M. and ROTHWELL, N.J., 2003. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**(16), pp. 6470-6474.
- MONTERO, C., CAMPILLO, N.E., GOYA, P. and PAEZ, J.A., 2005. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *European journal of medicinal chemistry*, **40**(1), pp. 75-83.
- MOSINGER, J.L., PRICE, M.T., BAI, H.Y., XIAO, H., WOZNIAK, D.F. and OLNEY, J.W., 1991. Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Experimental neurology*, **113**(1), pp. 10-17.
- MOYANO, M., PORTEROS, A. and DOWLING, J.E., 2013. The effects of nicotine on cone and rod b-wave responses in larval zebrafish. *Visual neuroscience*, **30**(4), pp. 141-145.
- MUKHOPADHYAY, P., PAN, H., RAJESH, M., BATKAI, S., PATEL, V., HARVEY-WHITE, J., MUKHOPADHYAY, B., HASKO, G., GAO, B., MACKIE, K. and PACHER, P., 2010. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *British journal of pharmacology*, **160**(3), pp. 657-668.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L. and ABU-SHAAR, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**(6441), pp. 61-65.
- NADLER, V., MECHOULAM, R. and SOKOLOVSKY, M., 1993. Blockade of  $45\text{Ca}^{2+}$  influx through the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel by the non-psychoactive cannabinoid HU-211. *Brain research*, **622**(1-2), pp. 79-85.
- NAKATA, M. and YADA, T., 2008. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regulatory peptides*, **145**(1-3), pp. 49-53.
- NAVEH, N., WEISSMAN, C., MUCHTAR, S., BENITA, S. and MECHOULAM, R., 2000. A submicron emulsion of HU-211, a synthetic cannabinoid, reduces intraocular pressure in rabbits. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, **238**(4), pp. 334-338.
- NAWY, S., 2000. Regulation of the on bipolar cell mGluR6 pathway by  $\text{Ca}^{2+}$ . *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**(12), pp. 4471-4479.
- NGUYEN, H.N., RASMUSSEN, B.A. and PERRY, D.C., 2003. Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **307**(3), pp. 1090-1097.
- NICHOLLS, D.G., 2008. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1147**, pp. 53-60.

- NICHOLLS, D.G., JOHNSON-CADWELL, L., VESCE, S., JEKABSONS, M. and YADAVA, N., 2007. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *Journal of neuroscience research*, **85**(15), pp. 3206-3212.
- NUCCI, C., BARI, M., SPANO, A., CORASANITI, M., BAGETTA, G., MACCARRONE, M. and MORRONE, L.A., 2008. Potential roles of (endo)cannabinoids in the treatment of glaucoma: from intraocular pressure control to neuroprotection. *Progress in brain research*, **173**, pp. 451-464.
- ONAIVI, E.S., CHAKRABARTI, A. and CHAUDHURI, G., 1996. Cannabinoid receptor genes. *Progress in neurobiology*, **48**(4-5), pp. 275-305.
- ONAIVI, E.S., ISHIGURO, H., GONG, J.P., PATEL, S., MEOZZI, P.A., MYERS, L., PERCHUK, A., MORA, Z., TAGLIAFERRO, P.A., GARDNER, E., BRUSCO, A., AKINSHOLA, B.E., HOPE, B., LUJILDE, J., INADA, T., IWASAKI, S., MACHARIA, D., TEASENFITZ, L., ARINAMI, T. and UHL, G.R., 2008. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PloS one*, **3**(2), pp. e1640.
- OPERE, C.A., ZHENG, W.D., ZHAO, M., LEE, J.S., KULKARNI, K.H. and OHIA, S.E., 2006. Inhibition of potassium- and ischemia-evoked [3H] D-aspartate release from isolated bovine retina by cannabinoids. *Current eye research*, **31**(7-8), pp. 645-653.
- OSEI-HYIAMAN, D., DEPETRILLO, M., PACHER, P., LIU, J., RADAIEVA, S., BATKAI, S., HARVEY-WHITE, J., MACKIE, K., OFFERTALER, L., WANG, L. and KUNOS, G., 2005. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*, **115**(5), pp. 1298-1305.
- O'SULLIVAN, S.E., 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British journal of pharmacology*, **152**(5), pp. 576-582.
- OTORI, Y., WEI, J.Y. and BARNSTABLE, C.J., 1998. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, **39**(6), pp. 972-981.
- OTTANI, A., FERRARI, F. and GIULIANI, D., 2002. Neuroleptic-like profile of the cannabinoid agonist, HU 210, on rodent behavioural models. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **26**(1), pp. 91-96.
- OTTANI, A. and GIULIANI, D., 2001. Hu 210: a potent tool for investigations of the cannabinoid system. *CNS drug reviews*, **7**(2), pp. 131-145.
- OVADIA, H., WOHLMAN, A., MECHOULAM, R. and WEIDENFELD, J., 1995. Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*, **34**(2), pp. 175-180.
- PAGOTTO, U. and PASQUALI, R., 2005. Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *Lancet*, **365**(9468), pp. 1363-1364.

- PANIKASHVILI, D., SIMEONIDOU, C., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., BREUER, A., MECHOULAM, R. and SHOHAMI, E., 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, **413**(6855), pp. 527-531.
- PARK, S.J., KIM, I.B., CHOI, K.R., MOON, J.I., OH, S.J., CHUNG, J.W. and CHUN, M.H., 2001. Reorganization of horizontal cell processes in the developing FVB/N mouse retina. *Cell and tissue research*, **306**(2), pp. 341-346.
- PEICHL, L. and GONZALEZ-SORIANO, J., 1994. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Visual neuroscience*, **11**(3), pp. 501-517.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E., MANNAIONI, G. and BAGETTA, G., 2009. Post-ischemic brain damage: the endocannabinoid system in the mechanisms of neuronal death. *The FEBS journal*, **276**(1), pp. 2-12.
- PENA, V.S., MIRAVITLLES, M., GABRIEL, R., JIMENEZ-RUIZ, C.A., VILLASANTE, C., MASA, J.F., VIEJO, J.L. and FERNANDEZ-FAU, L., 2000. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*, **118**(4), pp. 981-989.
- PEREZ-LEON, J.A., WARREN, E.J., ALLEN, C.N., ROBINSON, D.W. and BROWN, R.L., 2006. Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock. *The European journal of neuroscience*, **24**(4), pp. 1117-1123.
- PERLMAN, I., 1983. Relationship between the amplitudes of the b wave and the a wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. *The British Journal of Ophthalmology*, **67**(7), pp. 443-448.
- PERTWEE, R.G., 2012. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **367**(1607), pp. 3353-3363.
- PERTWEE, R.G., 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current medicinal chemistry*, **6**(8), pp. 635-664.
- PIAZZA, P.V., LAFONTAN, M. and GIRARD, J., 2007. Integrated physiology and pathophysiology of CB1-mediated effects of the endocannabinoid system. *Diabetes & metabolism*, **33**(2), pp. 97-107.
- PIERELLI, F., STANZIONE, P., PEPPE, A., STEFANO, E., RIZZO, P., BERNARDI, G. and MOROCUTTI, C., 1988. Electrophysiological (PERG, VEP) abnormalities in Parkinson disease are reversed by LDOPA. Dopaminergic Mechanisms. *Vision*. pp. 253-265.
- PIGNATELLI, V., CEPKO, C.L. and STRETTOI, E., 2004. Inner retinal abnormalities in a mouse model of Leber's congenital amaurosis. *The Journal of comparative neurology*, **469**(3), pp. 351-359.
- PINAR-SUEIRO, S., ZORRILLA HURTADO, J.A., VEIGA-CRESPO, P., SHARMA, S.C. and VECINO, E., 2013. Neuroprotective effects of topical CB1 agonist WIN 55212-2 on retinal ganglion cells

after acute rise in intraocular pressure induced ischemia in rat. *Experimental eye research*, **110**, pp. 55-58.

PINILLA, I., CUENCA, N., SAUVE, Y., WANG, S. and LUND, R.D., 2007. Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human RPE cells in the Royal College of Surgeons rat. *Experimental eye research*, **85**(3), pp. 381-392.

PINILLA, I., LUND, R.D. and SAUVE, Y., 2005. Enhanced cone dysfunction in rats homozygous for the P23H rhodopsin mutation. *Neuroscience letters*, **382**(1-2), pp. 16-21.

POIRIER, B., BIDOUARD, J.P., CADROUVELE, C., MARNIQUET, X., STAELS, B., O'CONNOR, S.E., JANIAC, P. and HERBERT, J.M., 2005. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes, obesity & metabolism*, **7**(1), pp. 65-72.

POLISSIDIS, A., CHOULIARA, O., GALANOPOULOS, A., RENTESI, G., DOSI, M., HYPHANTIS, T., MARSELOS, M., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z., NOMIKOS, G.G., SPYRAKI, C., TZAVARA, E.T. and ANTONIOU, K., 2010. Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, **13**(9), pp. 1175-1191.

POPE, C., MECHOULAM, R. and PARSONS, L., 2010. Endocannabinoid signaling in neurotoxicity and neuroprotection. *Neurotoxicology*, **31**(5), pp. 562-571.

POPOVA, E.Y., BARNSTABLE, C.J. and ZHANG, S.S., 2014. Cell type-specific epigenetic signatures accompany late stages of mouse retina development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **801**, pp. 3-8.

PORCELLA, A., MAXIA, C., GESSA, G.L. and PANI, L., 2000. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *European Journal of Neuroscience*, **12**(3), pp. 1123-1127.

POTTS, A.M., MODRELL, R.W. and KINGSBURY, C., 1960. Permanent fractionation of the electroretinogram by sodium glutamate. *American Journal of Ophthalmology*, **50**, pp. 900-907.

POURCHO, R.G. and OSMAN, K., 1986. Cytochemical identification of cholinergic amacrine cells in cat retina. *The Journal of comparative neurology*, **247**(4), pp. 497-504.

PUGH, P.C. and MARGIOTTA, J.F., 2000. Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Promote Survival and Reduce Apoptosis of Chick Ciliary Ganglion Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **15**(2), pp. 113-122.

PUTHUSSEY, T., GAYET-PRIMO, J., PANDEY, S., DUVOISIN, R.M. and TAYLOR, W.R., 2009. Differential loss and preservation of glutamate receptor function in bipolar cells in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *The European journal of neuroscience*, **29**(8), pp. 1533-1542.

QIN, P. and POURCHO, R.G., 1999. AMPA-selective glutamate receptor subunits GluR2 and GluR4 in the cat retina: an immunocytochemical study. *Visual neuroscience*, **16**(6), pp. 1105-1114.

QUARTA, C., BELLOCCHIO, L., MANCINI, G., MAZZA, R., CERVINO, C., BRAULKE, L.J., FEKETE, C., LATORRE, R., NANNI, C., BUCCI, M., CLEMENS, L.E., HELDMAIER, G., WATANABE, M., LESTE-LASSERE, T., MAITRE, M., TEDESCO, L., FANELLI, F., REUSS, S., KLAUS, S., SRIVASTAVA, R.K., MONORY, K., VALERIO, A., GRANDIS, A., DE GIORGIO, R., PASQUALI, R., NISOLI, E., COTA, D., LUTZ, B., MARSICANO, G. and PAGOTTO, U., 2010. CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell metabolism*, **11**(4), pp. 273-285.

QUIK, M., PEREZ, X.A. and BORDIA, T., 2012. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **27**(8), pp. 947-957.

QURESHI, J., SAADY, M., CARDOUNEL, A. and KALIMI, M., 1998. Identification and characterization of a novel synthetic cannabinoid CP 55,940 binder in rat brain cytosol. *Molecular and cellular biochemistry*, **181**(1-2), pp. 21-27.

RAMIREZ, B.G., BLAZQUEZ, C., GOMEZ DEL PULGAR, T., GUZMAN, M. and DE CEBALLOS, M.L., 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**(8), pp. 1904-1913.

RAMIREZ, J.M., RAMIREZ, A.I., SALAZAR, J.J., DE HOZ, R. and TRIVINO, A., 2001. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Experimental eye research*, **73**(5), pp. 601-615.

RAMIREZ-FRANCO, J., BARTOLOME-MARTIN, D., ALONSO, B., TORRES, M. and SANCHEZ-PRIETO, J., 2014. Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells. *PloS one*, **9**(2), pp. e88594.

RANDALL, D., BURGGREN, W. and FRENCH, K., 1998. *Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones*. 4a ed. edn. McGraw-Hill/Interamericana de España.

RANDALL, M.D., ALEXANDER, S.P.H., BENNETT, T., BOYD, E.A., FRY, J.R., GARDINER, S.M., KEMP, P.A., MCCULLOCH, A.I. and KENDALL, D.A., 1996. An Endogenous Cannabinoid as an Endothelium-Derived Vasorelaxant. *Biochemical and biophysical research communications*, **229**(1), pp. 114-120.

RAVINET TRILLOU, C., DELGORGE, C., MENET, C., ARNONE, M. and SOUBRIE, P., 2004. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, **28**(4), pp. 640-648.

REESE, K.M., 1991. Cannabis seems to improve night vision of fisherman. *Chem. Eng. News*, **69**, pp. 44.

REGUS-LEIDIG, H., FUCHS, M., LOHNER, M., LEIST, S.R., LEAL-ORTIZ, S., CHIODO, V.A., HAUSWIRTH, W.W., GARNER, C.C. and BRANDSTATTER, J.H., 2014. In vivo knockdown of Piccolino disrupts presynaptic ribbon morphology in mouse photoreceptor synapses. *Frontiers in cellular neuroscience*, **8**, pp. 259.

- RIPPS, H., 2002. Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Experimental eye research*, **74**(3), pp. 327-336.
- RIZZO, V., CARLETTI, F., GAMBINO, G., SCHIERA, G., CANNIZZARO, C., FERRARO, G. and SARDO, P., 2014. Role of CB2 receptors and cGMP pathway on the cannabinoid-dependent antiepileptic effects in an in vivo model of partial epilepsy. *Epilepsy research*, **108**(10), pp. 1711-1718.
- ROZENFELD, R. and DEVI, L.A., 2008. Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**(7), pp. 2311-2322.
- RUBIO, M., VILLAIN, H., DOCAGNE, F., ROUSSEL, B.D., RAMOS, J.A., VIVIEN, D., FERNANDEZ-RUIZ, J. and ALI, C., 2011. Pharmacological activation/inhibition of the cannabinoid system affects alcohol withdrawal-induced neuronal hypersensitivity to excitotoxic insults. *PloS one*, **6**(8), pp. e23690.
- RUETHER, K., FEIGENSPAN, A., PIRNGRUBER, J., LEITGES, M., BAEHR, W. and STRAUSS, O., 2010. PKC{alpha} is essential for the proper activation and termination of rod bipolar cell response. *Investigative ophthalmology & visual science*, **51**(11), pp. 6051-6058.
- RUSSO, E.B., MERZOUKI, A., MESA, J.M., FREY, K.A. and BACH, P.J., 2004. Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, **93**(1), pp. 99-104.
- RUTAR, M., NATOLI, R. and PROVIS, J.M., 2012. Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Muller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *Journal of neuroinflammation*, **9**, pp. 221-2094-9-221.
- SAADE, C.J., ALVAREZ-DELFIN, K. and FADOOL, J.M., 2013. Rod photoreceptors protect from cone degeneration-induced retinal remodeling and restore visual responses in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**(5), pp. 1804-1814.
- SAKABA, T. and NEHER, E., 2003. Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature*, **424**(6950), pp. 775-778.
- SALZET, M., BRETON, C., BISOGNO, T. and DI MARZO, V., 2000. Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *European journal of biochemistry / FEBS*, **267**(16), pp. 4917-4927.
- SAM, A.H., SALEM, V. and GHATEI, M.A., 2011. Rimonabant: From RIO to Ban. *Journal of obesity*, **2011**, pp. 432607.
- SANCHO-PELLUZ, J., ALAVI, M.V., SAHABOGLU, A., KUSTERMANN, S., FARINELLI, P., AZADI, S., VAN VEEN, T., ROMERO, F.J., PAQUET-DURAND, F. and EKSTROM, P., 2010. Excessive HDAC activation is critical for neurodegeneration in the rd1 mouse. *Cell death & disease*, **1**, pp. e24.

SANDMANN, D., BOYCOTT, B.B. and PEICHL, L., 1996. Blue-cone horizontal cells in the retinae of horses and other equidae. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**(10), pp. 3381-3396.

SANUDO-PENA, M.C., ROMERO, J., SEALE, G.E., FERNANDEZ-RUIZ, J.J. and WALKER, J.M., 2000. Activational role of cannabinoids on movement. *European journal of pharmacology*, **391**(3), pp. 269-274.

SARNE, Y. and MECHOULAM, R., 2005. Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. *Current drug targets.CNS and neurological disorders*, **4**(6), pp. 677-684.

SCHLICKER, E., TIMM, J. and GOTHERT, M., 1996. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **354**(6), pp. 791-795.

SCHNEIDER, M., DREWS, E. and KOCH, M., 2005. Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behavioural pharmacology*, **16**(5-6), pp. 447-454.

SCHROCK, H. and KUSCHINSKY, W., 1991. Effects of nicotine withdrawal on the local cerebral glucose utilization in conscious rats. *Brain research*, **545**(1-2), pp. 234-238.

SEKIRNJAK, C., JEPSON, L.H., HOTTOWY, P., SHER, A., DABROWSKI, W., LITKE, A.M. and CHICHILNISKY, E.J., 2011. Changes in physiological properties of rat ganglion cells during retinal degeneration. *Journal of neurophysiology*, **105**(5), pp. 2560-2571.

SELTZMAN, H.H., 1999. Structure and receptor activity for classical cannabinoids. *Current medicinal chemistry*, **6**(8), pp. 685-704.

SEYLE, H., 1936. **A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents**. *Nature*, **138**, pp. 32-33.

SHEN, J., YANG, X., DONG, A., PETERS, R.M., PENG, Y., WONG, F. and CAMPOCHIARO, P.A., 2005. Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of cellular physiology*, **203**(3), pp. 457-464.

SHEN, M. and THAYER, S.A., 1999. Delta9-tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture. *Molecular pharmacology*, **55**(1), pp. 8-13.

SHOHAMI, E., NOVIKOV, M. and MECHOULAM, R., 1993. A nonpsychotropic cannabinoid, HU-211, has cerebroprotective effects after closed head injury in the rat. *Journal of neurotrauma*, **10**(2), pp. 109-119.

SIEBER, M., 2012. Neuroprotective properties of nicotine. *Current medicinal chemistry*, **19**(2), pp. 292-297.

SISK, D.R. and KUWABARA, T., 1985. Histologic changes in the inner retina of albino rats following intravitreal injection of monosodium L-glutamate. *Graefe's archive for clinical and*

*experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, **223**(5), pp. 250-258.

SMIRNOV, M.S. and KIYATKIN, E.A., 2008. Behavioral and temperature effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in human-relevant doses in rats. *Brain research*, **1228**, pp. 145-160.

SMITH, M.L., SOUZA, F.G., BRUCE, K.S., STRANG, C.E., MORLEY, B.J. and KEYSER, K.T., 2014. Acetylcholine receptors in the retinas of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mouse. *Molecular vision*, **20**, pp. 1328-1356.

STAMER, W.D., GOLIGHTLY, S.F., HOSOHATA, Y., RYAN, E.P., PORTER, A.C., VARGA, E., NOECKER, R.J., FELDER, C.C. and YAMAMURA, H.I., 2001. Cannabinoid CB(1) receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues. *European journal of pharmacology*, **431**(3), pp. 277-286.

STASHEFF, S.F., SHANKAR, M. and ANDREWS, M.P., 2011. Developmental time course distinguishes changes in spontaneous and light-evoked retinal ganglion cell activity in rd1 and rd10 mice. *Journal of neurophysiology*, **105**(6), pp. 3002-3009.

STEIGER BURGOS, M., SENN, M., SUTTER, F., KREUZER, M. and LANGHANS, W., 2001. Effect of water restriction on feeding and metabolism in dairy cows. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **280**(2), pp. R418-27.

STEINBERG, R.H., FLANNERY, J.G., NAASH, M., OH, P., MATTHES, M.T., YASUMURA, D., LAUVILLACORTA, C., CHEN, J. and LAVAIL, M.M., 1996. *Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes*.

STERLING, P. and MATTHEWS, G., 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci*, (28), pp. 20-29.

STONE, J., MASLIM, J., VALTER-KOCSI, K., MERVIN, K., BOWERS, F., CHU, Y., BARNETT, N., PROVIS, J., LEWIS, G., FISHER, S.K., BISTI, S., GARGINI, C., CERVETTO, L., MERIN, S. and PEER, J., 1999. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, **18**(6), pp. 689-735.

STRAIKER, A., STELLA, N., PIOMELLI, D., MACKIE, K., KARTEN, H.J. and MAGUIRE, G., 1999. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(25), pp. 14565-14570.

STRAIKER, A. and SULLIVAN, J.M., 2003. Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *Journal of neurophysiology*, **89**(5), pp. 2647-2654.

STRAIKER, A.J., MAGUIRE, G., MACKIE, K. and LINDSEY, J., 1999. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, **40**(10), pp. 2442-2448.

STRETTOI, E. and PIGNATELLI, V., 2000. Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(20), pp. 11020-11025.

STRETTOI, E., PIGNATELLI, V., ROSSI, C., PORCIATTI, V. and FALSINI, B., 2003. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision research*, **43**(8), pp. 867-877.

SUGIURA, T. and WAKU, K., 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chemistry and physics of lipids*, **108**(1-2), pp. 89-106.

SULLIVAN, R.K., WOLDEMUSSIE, E. and POW, D.V., 2007a. Dendritic and synaptic plasticity of neurons in the human age-related macular degeneration retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, **48**(6), pp. 2782-2791.

SULLIVAN, R.K., WOLDEMUSSIE, E. and POW, D.V., 2007b. Dendritic and synaptic plasticity of neurons in the human age-related macular degeneration retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, **48**(6), pp. 2782-2791.

SZABO, S., TACHE, Y. and SOMOGYI, A., 2012. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, **15**(5), pp. 472-478.

TAKADA, Y., YONEZAWA, A., KUME, T., KATSUKI, H., KANEKO, S., SUGIMOTO, H. and AKAIKE, A., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **306**(2), pp. 772-777.

TAM, J., VEMURI, V.K., LIU, J., BATKAI, S., MUKHOPADHYAY, B., GODLEWSKI, G., OSEI-HYIAMAN, D., OHNUMA, S., AMBUDKAR, S.V., PICKEL, J., MAKRIYANNIS, A. and KUNOS, G., 2010a. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *The Journal of clinical investigation*, **120**(8), pp. 2953-2966.

TAM, J., VEMURI, V.K., LIU, J., BATKAI, S., MUKHOPADHYAY, B., GODLEWSKI, G., OSEI-HYIAMAN, D., OHNUMA, S., AMBUDKAR, S.V., PICKEL, J., MAKRIYANNIS, A. and KUNOS, G., 2010b. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *The Journal of clinical investigation*, **120**(8), pp. 2953-2966.

TAUCHI, M. and MASLAND, R.H., 1984. The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **223**(1230), pp. 101-119.

THORNTON-JONES, Z.D., KENNETT, G.A., BENWELL, K.R., REVELL, D.F., MISRA, A., SELLWOOD, D.M., VICKERS, S.P. and CLIFTON, P.G., 2006. The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **84**(2), pp. 353-359.

TOM DIECK, S., ALTROCK, W.D., KESSELS, M.M., QUALMANN, B., REGUS, H., BRAUNER, D., FEJTOVA, A., BRACKO, O., GUNDELFINGER, E.D. and BRANDSTATTER, J.H., 2005. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE

is essential for the assembly of the ribbon complex. *The Journal of cell biology*, **168**(5), pp. 825-836.

VAN DER STELT, M. and DI MARZO, V., 2005. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular medicine*, **7**(1-2), pp. 37-50.

VAN DER STELT, M., VELDHUIS, W.B., MACCARRONE, M., BAR, P.R., NICOLAY, K., VELDINK, G.A., DI MARZO, V. and VLIEGENTHART, J.F., 2002. Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Molecular neurobiology*, **26**(2-3), pp. 317-346.

VAN SICKLE, M.D., DUNCAN, M., KINGSLEY, P.J., MOUIHATE, A., URBANI, P., MACKIE, K., STELLA, N., MAKRIYANNIS, A., PIOMELLI, D., DAVISON, J.S., MARNETT, L.J., DI MARZO, V., PITTMAN, Q.J. and PATEL, K.D.S., K.A., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**(5746), pp. 329-32.

VARGHESE, S.B., REID, J.C., HARTMANN, E.E. and KEYSER, K.T., 2011. The effects of nicotine on the human electroretinogram. *Investigative ophthalmology & visual science*, **52**(13), pp. 9445-9451.

VERTY, A.N., MCFARLANE, J.R., MCGREGOR, I.S. and MALLET, P.E., 2004. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and oxytocin receptors in food and water intake. *Neuropharmacology*, **47**(4), pp. 593-603.

VICKERS, S.P., WEBSTER, L.J., WYATT, A., DOURISH, C.T. and KENNETT, G.A., 2003. Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology*, **167**(1), pp. 103-111.

VUGLER, A.A., 2010. Progress toward the maintenance and repair of degenerating retinal circuitry. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, **30**(7), pp. 983-1001.

WALSH, S., GORMAN, A.M., FINN, D.P. and DOWD, E., 2010. The effects of cannabinoid drugs on abnormal involuntary movements in dyskinetic and non-dyskinetic 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research*, **1363**, pp. 40-48.

WANG, L., LIU, J., HARVEY-WHITE, J., ZIMMER, A. and KUNOS, G., 2003. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(3), pp. 1393-1398.

WARRIER, A. and WILSON, M., 2007a. Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Visual neuroscience*, **24**(1), pp. 25-35.

WARRIER, A. and WILSON, M., 2007b. Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Visual neuroscience*, **24**(1), pp. 25-35.

WEHRWEIN, E., THOMPSON, S.A., COULIBALY, S.F., LINN, D.M. and LINN, C.L., 2004. Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Investigative ophthalmology & visual science*, **45**(5), pp. 1531-1543.

- WEST, M.E., 1991. Cannabis and night vision. *Nature*, **351**, pp. 703-704.
- WIERUCKA-RYBAK, M., WOLAK, M. and BOJANOWSKA, E., 2014. The effects of leptin in combination with a cannabinoid receptor 1 antagonist, AM 251, or cannabidiol on food intake and body weight in rats fed a high-fat or a free-choice high sugar diet. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, **65**(4), pp. 487-496.
- WILLIAMS, C.M. and KIRKHAM, T.C., 1999. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, **143**(3), pp. 315-317.
- WINTER, C., TOM DIECK, S., BOECKERS, T.M., BOCKMANN, J., KÄMPF, U., SANMARTÍ-VILA, L., LANGNAESE, K., ALTROCK, W., STUMM, M., SOYKE, A., WIEACKER, P., GARNER, C.C. and GUNDELFINGER, E.D., 1999. The Presynaptic Cytomatrix Protein Bassoon: Sequence and Chromosomal Localization of the HumanBSNGene. *Genomics*, **57**(3), pp. 389-397.
- WITTEN, I.B., LIN, S.C., BRODSKY, M., PRAKASH, R., DIESTER, I., ANIKEEVA, P., GRADINARU, V., RAMAKRISHNAN, C. and DEISSEROTH, K., 2010. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, **330**(6011), pp. 1677-1681.
- XIN, D. and BLOOMFIELD, S.A., 1999. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *The Journal of comparative neurology*, **405**(1), pp. 75-87.
- XU, J.Y. and CHEN, C., 2015. Endocannabinoids in synaptic plasticity and neuroprotection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, **21**(2), pp. 152-168.
- XU, X., LIU, Y., HUANG, S., LIU, G., XIE, C., ZHOU, J., FAN, W., LI, Q., WANG, Q., ZHONG, D. and MIAO, X., 2006. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*, **171**(1), pp. 31-38.
- YADAVA, N. and NICHOLLS, D.G., 2007. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**(27), pp. 7310-7317.
- YAN, X., ZHAO, B., BUTT, C.M. and DEBSKI, E.A., 2006. Nicotine exposure refines visual map topography through an NMDA receptor-mediated pathway. *European Journal of Neuroscience*, **24**(11), pp. 3026-3042.
- YASUHARA, O., TOOYAMA, I., AIMI, Y., BELLIER, J.P., HISANO, T., MATSUO, A., PARK, M. and KIMURA, H., 2003. Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**(7), pp. 2872-2881.
- YAZULLA, S., 2008. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Progress in retinal and eye research*, **27**(5), pp. 501-526.

- YAZULLA, S., STUDHOLME, K.M., MCINTOSH, H.H. and DEUTSCH, D.G., 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *The Journal of comparative neurology*, **415**(1), pp. 80-90.
- YAZULLA, S., STUDHOLME, K.M., MCINTOSH, H.H. and FAN, S.F., 2000. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Visual neuroscience*, **17**(3), pp. 391-401.
- ZABOURI, N., BOUCHARD, J.F. and CASANOVA, C., 2011. Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *The Journal of comparative neurology*, **519**(7), pp. 1258-1280.
- ZIMMER, A., ZIMMER, A.M., HOHMANN, A.G., HERKENHAM, M. and BONNER, T.I., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(10), pp. 5780-5785.
- ZOGOPOULOS, P., VASILEIOU, I., PATSOURIS, E. and THEOCHARIS, S., 2013. The neuroprotective role of endocannabinoids against chemical-induced injury and other adverse effects. *Journal of applied toxicology : JAT*, **33**(4), pp. 246-264.



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha acordó otorgar, por \_\_\_\_\_

a la Tesis Doctoral de Don. Cesare Altavilla la calificación de \_\_\_\_\_

Alicante \_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

El Secretario,

El Presidente,

UNIVERSIDAD DE ALICANTE



La presente Tesis de D. Cesare Altavilla ha sido registrada con el nº \_\_\_\_\_ del registro de entrada correspondiente.

Alicante \_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

El Encargado del Registro,