



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Programa de doctorado en biomedicina y biotecnología

**Evaluación de estrategias terapéuticas
basadas en sustancias
antiinflamatorias y antioxidantes en
retinosis pigmentaria**

Lorena Olivares González

Tesis Doctoral

Julio 2020

Directora:

Regina Rodrigo Nicolás



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

La Dra. Regina Rodrigo Nicolás, investigadora principal del grupo Fisiopatología y Enfermedades de la visión perteneciente al Centro de Investigación Príncipe Felipe.

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral titulado “Evaluación de estrategias terapéuticas basadas en sustancias antiinflamatorias y antioxidantes en retinosis pigmentaria” que presenta Lorena Olivares González, graduada en Ciencias Biológicas, para optar al título de Doctora por la Universitat de València, ha sido realizado en el grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, y posteriormente en el grupo de Fisiopatología y Enfermedades de la Visión del Centro de Investigación Príncipe Felipe bajo su dirección y, que reúne las condiciones para ser defendido por su autora.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Valencia, a 1 de julio de 2020.

Directora Tesis

Fdo. Dra. Regina Rodrigo Nicolás

Vº Bº Tutora académica

Fdo. Dra. Elena Ruiz-García Trevijano

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar dando las gracias a las personas que me han dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

En primer lugar a **Regina**, mi jefa. Gracias por dejarme trabajar contigo y por el esfuerzo de todos estos años para que pudiera continuar. Gracias por todo lo que me has enseñado, por la paciencia, por los consejos, los científicos y los no tanto, por el apoyo, por la comprensión y por la ayuda. Gracias por ser mucho más que una jefa; no podía haber tenido una mejor.

A **Chema**, gracias por la confianza y por la oportunidad de formar parte del grupo. Gracias por preocuparte siempre por todos nosotros.

Gracias a todos los que forman o han formado parte del **grupo BMCG** durante estos años por ayudarme a crecer científicamente y también como persona. En especial, gracias a Teresa y a Elena, porque aunque sea desde un poco más lejos, estáis siempre pendientes de todos. Gracias por la calma y las soluciones para todo. A Rafa, gracias por la positividad y el entusiasmo. Gracias por los buenos consejos y también por las buenas ideas. A Gema, gracias por tu amabilidad y simpatía desde el primer momento. Gracias por los consejos y por la tranquilidad. A Cristina, que sigues formando parte del grupo en la distancia, gracias por enseñarme a empezar y por tu paciencia. A Loli, muchas gracias por enseñarme tantas cosas, por aguantarnos a todos en tantas ocasiones y por todos los buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Gracias también al nuevo **grupo de Fisiopatología y Enfermedades de la Visión**. A Isa, gracias por llegar con tus pergaminos y hacérmelo un poquito más fácil. Yo sola no hubiese podido con esta última locura. A Sheyla, gracias por llegar y querer quedarte. Gracias por recordarme la ilusión y las ganas del principio, que tantas veces se olvidan por el camino.

A los otros dos brazos de mi tridente, **Ana Pilar y Carla**. Mis compañeras de viaje, mis amigas. Gracias a las dos por los consejos, por la ayuda, por los silencios, por las discusiones, por las cenas, por las risas, por las lágrimas, por los buenos momentos, pero sobretodo, por estar siempre en los más duros. Sin duda sois la mayor suerte de estos años.

Gracias a **mis amigos**, que habéis estado ahí siempre para celebrar los éxitos, pero también para escuchar mis penas. Gracias por ser mi conexión con “el mundo real” fuera del laboratorio.

Gracias **a mi familia**. A mi madre, por hacer posible todo esto desde el primer día. Gracias por apoyarme siempre y por el esfuerzo enorme estos últimos años. Gracias a mi abuela, por el esfuerzo constante para entender lo que hago y poder contarlo a todo el mundo. A mi hermana, Nerea. Gracias por todo, por apoyarme, por aguantarme, por la paciencia, por las correcciones, por las comas, por las fotos, por no decirme que no nunca. Gracias por tener siempre las palabras que a mí me faltan.

A Emilio. Gracias por estar siempre; por escucharme, por aguantar las vacaciones interrumpidas, las visitas al animalario, los horarios impensables y mi mal ánimo en las épocas difíciles. Gracias por empujarme siempre hacia delante, cuando parece que todas las decisiones han sido incorrectas. En definitiva, gracias por acompañarme y no soltarme la mano nunca.

Y por supuesto, gracias a ti papá. Aunque nunca vas a poder leerla, esta tesis ha sido por y para ti. Gracias por conducirme siempre hacia lo que estoy consiguiendo.

Finalmente me gustaría dar las gracias a la **Asociación Retina Comunidad Valenciana**, por vuestra ayuda y profesionalidad, y en especial a todos los **pacientes y familiares** que han participado en este estudio. Gracias por vuestra disposición y vuestras ganas, esto no sería posible sin vosotros. Estoy segura de que algún día conseguiremos que valga la pena; sin duda, ponemos todo de nuestra parte para que ocurra.

RESUMEN

La retinosis pigmentaria comprende un grupo de distrofias hereditarias de retina, caracterizadas por la pérdida progresiva e irreversible de la visión, debida a la muerte de las células fotorreceptoras. Se trata de una enfermedad rara, que constituye la principal causa genética de ceguera, con una prevalencia de un afectado por cada 4000 habitantes. Mientras que la degeneración retiniana empieza con la muerte de los bastones debida a mutaciones genéticas, la muerte de los conos parece ser consecuencia de un progresivo daño oxidativo, inflamación y desequilibrio metabólico, influenciado por la liberación de sustancias tóxicas por parte de los bastones y otras células del entorno. La muerte de los bastones da lugar a la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, como la ceguera nocturna y la visión en túnel, y la muerte de los conos termina produciendo la pérdida de la visión central.

Los fotorreceptores son especialmente susceptibles al daño oxidativo y a la peroxidación lipídica debido a su elevada tasa metabólica y a los riesgos ambientales a los que están expuestos. Distintas evidencias en modelos experimentales y pacientes con retinosis pigmentaria muestran alteraciones en el estado antioxidante-oxidante y presencia de estrés oxidativo que pueden correlacionarse con una peor función visual. Según esta hipótesis oxidativa, la muerte de los bastones, principales consumidores de oxígeno de la retina durante las primeras etapas de la enfermedad, provocaría un aumento de la concentración de oxígeno o hiperoxia, que produciría estrés oxidativo, exacerbando la muerte de los bastones y contribuyendo a la muerte de los conos. En los últimos años también se ha observado una gran implicación de la inflamación en la progresión de la enfermedad, que conlleva activación de la microglía y conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), entre otras moléculas de señalización. El mantenimiento prolongado de elevados niveles de estas moléculas, especialmente de las citoquinas, puede acelerar el propio proceso de degeneración de la enfermedad.

Actualmente, no existen terapias efectivas para el tratamiento de la retinosis pigmentaria, por lo que el objetivo general de esta tesis es abordar diferentes estrategias farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad, intentando actuar sobre los diferentes procesos que ocurren durante el proceso de degeneración retiniana y ralentizar así su avance.

Para ello, en primer lugar, corroboramos la presencia de marcadores inflamatorios en pacientes y en ratones con retinosis pigmentaria. A continuación, evaluamos el efecto de la administración intravítrea de Adalimumab, un anticuerpo anti-TNF α , sobre la degeneración

retiniana en un modelo murino de retinosis pigmentaria, el ratón *rd10*, profundizando en los mecanismos de muerte implicados en el proceso de degeneración. Los estudios *in vitro* sugieren que el TNF α induce la activación de las poli (ADP) ribosa polimerasas (PARPs) y de caspasas, el aumento de la proteína RIPK3 (*receptor-interacting protein*) y la disminución de RIPK1 en fotorreceptores de ratón. Los estudios *in vivo* sugieren que la muerte celular en la retina de los ratones está medida por activación de PARP y del inflammasoma NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*), y, en menor medida, por los mecanismos dependientes de caspasas a día postnatal 23. El tratamiento con Adalimumab intravítreo reduce la degeneración retiniana, disminuyendo la activación de PARP, de la microglía y del inflammasoma NLRP3. Además, con las inyecciones intravítreas conseguimos aumentar la ventana terapéutica con respecto a la administración intraperitoneal, pues el efecto neuroprotector del tratamiento se observa durante más tiempo en los ratones.

En tercer lugar, evaluamos el efecto de la estabilización del factor 1 de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) en el ratón *rd10*. Los resultados de este estudio muestran una disminución generalizada de la proteína HIF-1 α y sus genes diana, lo que sugiere que la retina se encuentra expuesta a un ambiente hiperóxico durante el proceso de degeneración. El tratamiento con dimetiloxalil glicina (DMOG) disminuye la degeneración y la inflamación en la retina de los ratones, demostrando así el efecto neuroprotector de la estabilización de HIF-1 α sobre los procesos de degeneración retiniana en etapas tempranas de la retinosis pigmentaria.

Por último, evaluamos el efecto sobre el estado antioxidante-oxidante y la función visual de pacientes con retinosis pigmentaria, de la administración oral de una mezcla de nutracéuticos antioxidantes. Basalmente observamos un desequilibrio del estado redox ocular y en menor grado sistémico. El tratamiento con la mezcla de nutracéuticos antioxidantes durante dos años, evita el empeoramiento de la función visual y produce una ligera mejoría del estado redox ocular, aunque no observamos efecto significativo sobre los marcadores del estado redox en sangre.

En conclusión, nuestros resultados confirman que existen alteraciones en el sistema antioxidante, los procesos inflamatorios y la biodisponibilidad de oxígeno a nivel ocular, implicadas en la patogénesis de la retinosis pigmentaria. Además, sugieren que reduciendo algunos de estos procesos como la inflamación o el estrés oxidativo es posible ralentizar la progresión de la degeneración de la retina, con la ventaja de ser estrategias farmacológicas independientes del defecto genético causante de la retinosis pigmentaria.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	xix
ABREVIATURAS.....	xxi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
I.1. ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR	3
I.2. LA RETINA.....	4
I.2.1. TIPOS CELULARES.....	6
I.2.1.1. CÉLULAS NEURALES.....	6
I.2.1.1.1. Fotorreceptores	6
I.2.1.1.2. Células horizontales.....	7
I.2.1.1.3. Células bipolares	7
I.2.1.1.4. Células amacrinas	7
I.2.1.1.5. Células ganglionares	8
I.2.1.2. CÉLULAS GLIALES.....	8
I.2.1.2.1. Células de Müller	8
I.2.1.2.2. Astrocitos	8
I.2.1.2.3. Microglía	9
I.3. FOTOTRANSDUCCIÓN	9
I.4. RETINOSIS PIGMENTARIA.....	11
I.4.1. MODELOS EXPERIMENTALES EN RETINOSIS PIGMENTARIA.....	13
I.4.2. TERAPIAS.....	14
I.4.2.1. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS	17
I.4.2.2. FACTORES NEUROTRÓFICOS	17
I.4.2.3. AGENTES ANTI-APOTÓTICOS.....	18
I.4.2.4. SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS	18
I.4.2.5. TERAPIA GÉNICA.....	19
I.4.2.6. TRASPLANTE CELULAR.....	21
I.4.2.7. OPTOGENÉTICA	22

I.4.2.8. PRÓTESIS DE RETINA	23
I.5. INFLAMACIÓN	24
I.5.1. INFLAMACIÓN EN RETINOSIS PIGMENTARIA.....	24
I.6. ESTRÉS OXIDATIVO.....	29
I.6.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RETINOSIS PIGMENTARIA.....	31
I.7. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLES POR HIPOXIA.....	34
I.8. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR	36
I.8.1. MECANISMOS DE MUERTE Y RETINOSIS PIGMENTARIA	42
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
II.1. HIPÓTESIS.....	47
II.2. OBJETIVOS.....	48
CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVÍTREA DE ADA SOBRE LA DEGENERACIÓN RETINIANA EN RATONES <i>rd10</i>.....	51
III.1. METODOLOGÍA	51
III.1.1. Muestras de humor acuoso de pacientes con RP.....	51
III.1.2. Cultivos celulares	51
III.1.3. Animales y tratamiento	52
III.1.4. Multiplex ELISA para la medida de citoquinas en humor acuoso.....	53
III.1.5. Actividad de la enzima PARP.....	54
III.1.6. Western Blot	54
III.1.7. Extracción de ARN total y síntesis de cADN.....	55
III.1.8. PCR cuantitativa en tiempo real	55
III.1.9. Ensayo actividad caspasa.....	56
III.1.10. Ensayos de viabilidad celular	56
III.1.11. ELISA para la medida de TNF α	58
III.1.12. Ensayo TUNEL e histología de la retina.....	58
III.1.13. Microscopía y cuantificación	59
III.1.14. Análisis estadístico	60
III.2. RESULTADOS	61
III.2.1. Perfil temporal de factores inflamatorios en los diferentes estadios de la degeneración retiniana en ratones <i>rd10</i>	61
III.2.2. Los pacientes con RP tienen marcadores inflamatorios aumentados en humor acuoso.....	63

III.2.3. La exposición a TNF α induce la muerte en las células 661W a través de la activación de las caspasas 8 y 3. <i>In vitro</i> , el tratamiento con ADA previene la muerte celular dependiente de caspasas.....	64
III.2.4. Activación de PARP, del inflammasoma NLRP3, y gliosis reactiva en la retina de ratones <i>rd10</i> a P23.	71
III.2.5. Una dosis única de ADA intravítreo reduce la degeneración de la retina en ratones <i>rd10</i> a P23.	74
III.2.6. Una dosis única de ADA intravítreo reduce la activación del inflammasoma NLRP3 y la activación microglial en ratones <i>rd10</i> a P23.	77
CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1α EN RATONES <i>rd10</i>.....	81
IV.1. METODOLOGÍA	81
IV.1.1. Animales y tratamiento	81
IV.1.2. Análisis de la respuesta antioxidante	82
IV.1.3. Determinación de la proteína HIF-1 α mediante ELISA	82
IV.1.4. Medida de la biodisponibilidad de oxígeno en la retina	83
IV.1.5. Ensayo TUNEL e histoquímica.....	83
IV.1.6. Microscopía y cuantificación	84
IV.1.7. Extracción de ARN y síntesis de cADN	84
IV.1.8. PCR cuantitativa en tiempo real	84
IV.1.9. Análisis estadísticos	84
IV.2. RESULTADOS	85
IV.2.1. Perfil temporal de la proteína HIF-1 α y sus genes diana en ratones <i>rd10</i>	85
IV.2.2. La estabilización de HIF-1 α previene de la pérdida de células fotorreceptoras a P18 y, en menor medida, a P23	88
IV.2.3. IV.2.3 La estabilización de HIF-1 α reduce la activación microglial y la gliosis reactiva a P18.....	92
IV.2.4. IV.2.4 La estabilización de HIF-1 α mejora la respuesta antioxidante a P18 en nuestras muestras.....	94
CAPÍTULO V: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NUTRACÉUTICOS ANTIOXIDANTES EN PACIENTES CON RP	99
V.1. METODOLOGÍA	99
V.1.1. Diseño del estudio	99
V.1.1.1. Criterios de inclusión.....	101
V.1.1.2. Criterios de exclusión:.....	102
V.1.2. Participantes	102

V.1.3. Elaboración de las cápsulas	103
V.1.4. Seguimiento	104
V.1.5. Variables del estudio	104
V.1.5.1. Variables oftalmológicas	104
V.1.5.2. Variables de la respuesta antioxidante y estrés oxidativo.....	105
V.1.5.3. Estado nutricional	106
V.1.6. Análisis estadístico.....	107
V.2. RESULTADOS.....	108
V.2.1. Los pacientes con RP presentan un desequilibrio basal en el estado antioxidante-oxidante en humor acuoso y sangre periférica.	108
V.2.2. Los pacientes con RP presentan una dieta más rica en antioxidantes que la población control	110
V.2.3. El tratamiento con la mezcla de nutracéuticos tiene efectos beneficiosos sobre el deterioro visual	111
V.2.4. El tratamiento con la mezcla de nutracéuticos no tiene un efecto significativo sobre el estado redox.....	113
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	117
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	135
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del globo ocular	6
Figura 2. Mecanismo de fototransducción en bastones.....	11
Figura 3. Visión característica y fondo de ojo de un individuo sano (A); visión característica y fondo de ojo de un paciente con RP (B).....	12
Figura 4. Estrategias actuales para el tratamiento de la RP, de acuerdo a las diferentes etapas de la enfermedad	15
Figura 5. Esquema del funcionamiento del sistema antioxidante celular	30
Figura 6. Teoría del mecanismo por el cual el daño oxidativo contribuye a la degeneración retiniana en RP	32
Figura 7. Mecanismo de regulación de HIF-1 α	36
Figura 8. Principales mecanismos de muerte celular	39
Figura 9. Perfil temporal de expresión de los marcadores inflamatorios IL6, iNOS, LIF y TNF α a diferentes días postnatales en retinas control y retinas <i>rd10</i>	61
Figura 10. Progresión de la gliosis reactiva en retinas de ratones <i>rd10</i>	62
Figura 11. Marcadores de inflamación en humor acuoso del grupo control (C) y del grupo de pacientes con RP (RP) basalmente	63
Figura 12. Estudio de toxicidad de TNF α y protección por Adalimumab en células 661W	65
Figura 13. Efecto del TNF α a 100 ng/ml en los marcadores de muerte mediada por apoptosis (caspasa 3 y 8), necroptosis (RIPK1 y RIPK3) y parthanatos (PARP y PAR) en células 661W	66
Figura 14. Efecto del inhibidor de la caspasa 8, IETD-FMK sobre la muerte inducida por TNF α en células 661W	67
Figura 15. Efecto del Adalimumab sobre la muerte celular inducida por TNF α en células 661W	69
Figura 16. Efecto de la tunicamicina y de la tunicamicina con Adalimumab en el contenido de TNF α y TNFR1 en células 661W.....	70
Figura 17. Efecto del ADA en la muerte inducida por tunicamicina en células 661W.....	71
Figura 18. Marcadores de muerte celular e inflamación en retinas de ratón <i>rd10</i> a P23	73
Figura 19. Efecto de distintas concentraciones de Adalimumab sobre la degeneración de los fotorreceptores en ratón <i>rd10</i> a P23	75
Figura 20. Efecto de la administración intravítrea de Adalimumab sobre la muerte celular en retinas de ratón <i>rd10</i> a P23.....	76
Figura 21. Efecto de la administración intravítrea de Adalimumab sobre la inflamación y el inflammasoma NLRP3 en retinas de ratón <i>rd10</i> a P23	78
Figura 22. Progresión de la proteína HIF-1 α y degeneración retiniana en retinas <i>rd10</i>	85

Figura 23. Detección de hipoxia en la retinas de ratones control y <i>rd10</i> tras la inyección intraperitoneal de HP	87
Figura 24. Perfil temporal de expresión de los genes diana de HIF-1 α : GLUT1, VEGF y ET-1 a diferentes días postnatales en retinas control y retinas <i>rd10</i>	88
Figura 25. Efecto de administración de DMOG sobre la degeneración retiniana en retinas de ratones <i>rd10</i> a P18 y P23	90
Figura 26. Efecto de la administración intraperitoneal de DMOG sobre la activación glial en retinas de ratón <i>rd10</i> a P18 y P23	93
Figura 27. Diagrama de flujo de los participantes a través de las fases del estudio: entrada al estudio, asignación de la intervención, seguimiento, análisis de datos	100
Figura 28. Esquema de la duración completa del estudio y tipos de muestras tomadas en los diferentes tiempos	101
Figura 29. Respuesta antioxidante y estrés oxidativo basal en humor acuoso de controles y pacientes con RP	108
Figura 30. Respuesta antioxidante basal en plasma de controles y pacientes con RP	109
Figura 31. Estrés oxidativo basal en plasma de controles y pacientes con RP	109
Figura 32. Capacidad antioxidante de la dieta (ORAC) en el grupo control y en el grupo de pacientes con RP	111
Figura 33. Efecto de la administración oral de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre la función visual de pacientes con RP	113
Figura 34. Efecto de la administración oral de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre la respuesta antioxidante y estrés oxidativo en humor acuoso de pacientes con RP	114
Figura 35. Esquema de los posibles mecanismos implicados en la muerte celular inducida por TNF α en retinas de ratones <i>rd10</i> a P23 (A) y efecto de la administración intravítrea de ADA sobre los mecanismos de muerte en retinas de ratones <i>rd10</i> a P23 (B)	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actuales ensayos clínicos en marcha con terapias antioxidantes o antiinflamatorias.	16
Tabla 2. Efecto del tratamiento con DMOG sobre la expresión génica de algunos genes diana de HIF-1 α a P18 en retinas de ratones <i>rd10</i>	91
Tabla 3. Respuesta antioxidante en ratones <i>rd10</i> a P18 y P23.....	95
Tabla 4. Características participantes del estudio.	102

ABREVIATURAS

·OH: radical hidroxilo

¹O₂: oxígeno singlete

ADA: Adalimumab

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AIF: factor inductor de la apoptosis

AL: ácido lipoico

ARN: ácido ribonucleico

ASC: proteína que contiene un dominio de reclutamiento y activación de las caspasas

AV: Anexina V

AVV: virus adeno-asociados

BCA: ácido bicinconínico

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

CARD: dominio activación y reclutamiento de las caspasas

CAT: catalasa

CC: cilio conector

CE: marca Conformidad Europea

CEIB: Comité de Ético de Investigación Biomédica

CFCA: cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

CNTF: factor neurotrófico ciliar (*ciliary neurotrophic factor*)

COX: ciclooxigenasa

CPR: proteína C reactiva

CSE: segmentos externos de los fotorreceptores

CV: campo visual

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DEH: dosis equivalente en humanos

DHA: ácido docosahexanoico

DHRs: distrofias hereditarias de retina

DMEM:F12: Medio de Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 de Ham

DMOG: dimetiloxalil glicina

DMSO: dimetilsulfóxido

DRI: *Dietary Reference Intakes*

EEM: error estándar de la media

ERG: electroretinograma

mERG: electroretinograma multifocal

ESCs: células madre embrionarias

FC: fluorescencia corregida

FIH: factor inhibidor de HIF (*factor inhibiting HIF*)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

FITC: fluoresceína 5-isotiocianato

Fv: fragmento variable de las Ig

GCL: cuerpos de las células ganglionares

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GFAP: proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*)

GFLs: familia de ligandos

GLS: modelos de mínimos cuadrados generalizados

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GNDF: factor neurotrófico de la glía

GPX: glutatión peroxidasa

GSDMD: gasdesmina D

GSH: glutatión reducido

GR: glutatión reductasa

GSSG: disulfuro de glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDR: recombinación homóloga dirigida (*homology directed repair*)

HIFs: factores de transcripción inducibles por hipoxia (*hypoxia inducible factors*)

HMGB1: proteína de alta movilidad del grupo 1 (*high mobility group box 1*)

HP: pimonidazole

HRP: peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)

iARN: ARN de interferencia

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IIS-La Fe: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

IL-10: interleuquina 10

IL-11: vinterleuquina 11

IL-12: interleuquina 12

IL-1 β : interleuquina 1 beta

IL-4: interleuquina 4

IL-6: interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

IM: índice de migración

INL: capa nuclear interna (*inner nuclear layer*)

IP: yoduro de propidio

IPL: capa plexiforme interna (*inner plexiform layer*)

iPSCs: células madre pluripotentes inducidas

ISCI: Instituto de Salud Carlos III

JECFA: *Joint Expert Committee on Food Additives of the FAO/WHO*

- LCD:** muerte celular dependiente de lisosomas (*lysosomal cell death*)
- LDH:** lactato deshidrogenasa
- LEDGF:** factor de crecimiento derivado del epitelio cristalino (*lens epithelium-derived growth factor*)
- LIF:** factor inhibidor de la leucemia (*leukemia inhibitory factor*)
- LPS:** lipopolisacárido
- MCP-1:** proteína quimioatrayente de monocitos 1
- MCP-2:** proteína quimioatrayente de monocitos 2
- MDA:** malonildialdehído
- MERTK:** receptor tirosina quinasa
- MIF:** factor inhibidor de la migración de macrófagos
- MLE:** membrana limitante externa (*membrane limitans extern*)
- MLI:** membrana limitante interna (*membrane limitans intern*)
- MLKL:** pseudoquinasa quinasa-como dominio de linaje mixto (*mixed-lineage kinase domain-like*)
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- MYO7A:** miosina VIIA
- NGF:** factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*)
- NHEJ:** recombinación no homologa (*non-homologous DNA end joining*)
- NLRs:** proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos
- NO:** óxido nítrico
- NO₂⁻:** nitrito
- NO₃⁻:** nitrato
- NOAEL:** dosis en la que no se observan efectos adversos (*Non-Observed Adverse Effect Level*)
- NOS:** óxido nítrico sintasa
- N-Tyr:** 3-nitro-tirosina (*3-nitro-tyrosine*)
- O₂⁻:** anión superóxido
- OCT:** tomografía de coherencia óptica (*optic coherence tomography*)

- ONL:** capa nuclear externa (*outer nuclear layer*)
- OPL:** capa plexiforme externa (*outer plexiform layer*)
- OSL:** *observed safe level*
- o-Tyr:** DL-o-tirosina (*DL-o-tyrosine*)
- P:** día postnatal
- PAR:** poli-ADP ribosa
- PARP:** poli-ADP ribosa polimerasa
- PBS:** tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
- PDE6:** fosfodiesterasa 6
- PDH:** prolil-hidroxilasa
- PEDF:** factor derivado del epitelio pigmentario (*pigment epithelium-derived factor*)
- PGF:** factor de crecimiento placentario (*placental growth factor*)
- Phe:** fenilalanina (*phenylalanine*)
- pNA:** p-nitroanilina
- PRR:** receptor de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor*)
- PS:** fosfatidilserina (*phosphatidylserine*)
- p-Tyr:** L-tirosina (*L-tyrosine*)
- rd1:** *retinal degeneration 1*
- rd10:** *retinal degeneration 10*
- RdCVF:** factor protector de conos derivado de bastones (*rod-derived cone viability factor*)
- RE:** retículo endoplasmático
- RIPK:** receptor de serina/treonina-proteína quinasa (*receptor-interacting protein*)
- RNS:** especies reactivas del nitrógeno
- RO:** radical aloxilo
- ROO:** radical peroxilo
- ROS:** especies reactivas del oxígeno
- RP:** retinosis pigmentaria

- RPE:** epitelio pigmentario (*retinal pigment epithelium*)
- RPE65:** proteína de 65 Kilodalton específica del epitelio pigmentario (*retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*)
- RPGR:** regulador de GTPasa implicado en retinosis pigmentaria (*retinitis pigmentosa GTPase regulator*)
- SAH:** S-adenosil-L-homocisteína
- SAM:** S-5-adenosil-L-metionina
- SI:** segmento interno
- SNC:** sistema nervioso central
- SOD:** superóxido dismutasa
- TAC:** capacidad antioxidante total (*total antioxidant capacity*)
- TBARS:** formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances*)
- TBS-T:** Tampón Tris salino-polisorbato con Tween 20
- TdT:** desoxinucleotidil-transferasa terminal
- TGF- β :** factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*)
- TNFR:** receptor transmembrana de TNF α (*tumor necrosis factor receptor*)
- TNF α :** factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
- TRADD:** proteína de muerte asociada al TNFr1
- TRAIL:** ligando inductor de la apoptosis
- TUDCA:** ácido tauroursodeoxicólico
- TUNEL:** *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*
- UCIM:** Unidad Central de Investigación
- UL:** *tolerable upper intake level*
- UPLC-MS/MS:** cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (*ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*)
- UPR:** respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response*)
- USH2A:** Usherina
- VEGF-B:** factor de crecimiento endotelial vascular-B (*vascular endothelial growth factor B*)

VHL: proteína supresora de tumor von Hippel Lindau

XIAP: proteína ligada al X inhibidora de apoptosis (*X-linked Inhibitor of apoptosis protein*)

XO: xantina oxidasa

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1. ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR

El ojo humano es un órgano altamente especializado, de cuyas estructuras depende la captación y el procesamiento de la información visual. El globo ocular tiene forma esférica y mide alrededor de 2,5 cm de diámetro. Desde el punto de vista anatómico la pared del globo ocular puede dividirse en tres capas:

- Capa externa o fibrosa, formada por la esclerótica y la córnea. La esclerótica constituye el “blanco del ojo”; es una parte dura y opaca que proporciona forma al ojo, soporte a los músculos extrínsecos e intrínsecos y protege las partes internas del globo ocular. La córnea es una estructura transparente que recubre el iris y ayuda a enfocar la luz en la retina.
- Capa intermedia o vascular, formada por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides es la porción posterior de la capa vascular y se encuentra altamente vascularizada. Sus numerosos vasos sanguíneos proveen de nutrientes a la parte posterior de la retina. También contiene melanocitos, productores de melanina, que le dan un color oscuro. La melanina absorbe los rayos lumínicos difusos, impidiendo la reflexión y la dispersión de la luz dentro del globo ocular y permitiendo que la imagen enviada a la retina permanezca nítida y clara. En la porción anterior de la capa vascular, la coroides se convierte en cuerpo ciliar, que se extiende desde la ora serrata (borde serrado de la retina) hasta la unión de la esclerótica con la córnea. También es una estructura de color marrón debido a la presencia de melanocitos y está formada por los procesos ciliares y el músculo ciliar. Los procesos ciliares son protrusiones o pliegues que contienen capilares sanguíneos que secretan humor acuoso. Desde los procesos ciliares se extienden las fibras de la zónula que se fijan al cristalino. El músculo ciliar es una banda circular de músculo liso, cuya contracción o relajación modifica la tensión de las fibras de la zónula, alterando la forma del cristalino para adaptarse a la luz. El iris es un delgado diafragma contráctil, formado por melanocitos y fibras de músculo liso dispuestas en forma radial. Está suspendido entre la córnea y el cristalino y se encuentra fijado por su borde externo a los procesos ciliares. La cantidad de melanina en el iris determina el color de los ojos. La pupila es la abertura central del iris, a través del cual se regula la cantidad de luz que entra en el globo ocular, mediante movimientos de contracción y relajación.
- Capa interna o nerviosa, formada por la retina. La retina es la capa nerviosa sensorial del globo ocular. Puede dividirse en dos capas: epitelio pigmentario (RPE) y retina neural. El RPE es una capa de células epiteliales que contienen melanina. Se encuentra entre la

coroides y la retina neural y ayuda a absorber los rayos luminosos difusos. La retina neural es una estructura nerviosa en la que tiene lugar el proceso de fototransducción de las señales luminosas en impulsos nerviosos para enviar la información visual al cerebro a través del nervio óptico.

El cristalino o lente se encuentra detrás de la pupila y el iris. Es una estructura transparente y biconvexa que permite enfocar las imágenes de los objetos situados a diferentes distancias sobre la retina de forma clara y nítida, cambiando su convexidad. El cristalino divide el interior del globo ocular en dos partes: cavidad anterior y cavidad posterior o cámara vítrea. La cavidad anterior corresponde al espacio delante del cristalino y se divide en dos cámaras: cámara anterior, situada entre la córnea y el iris, y cámara posterior, entre el iris y el cristalino. Ambas cámaras de la cavidad anterior contienen humor acuoso, una solución acuosa y transparente que proporciona nutrientes al cristalino y la córnea. El humor acuoso es segregado por los capilares sanguíneos, filtrado en los cuerpos ciliares y liberado en la cámara posterior. A continuación, fluye hacia el iris y el cristalino a través de la pupila e ingresa en la cámara anterior. Desde aquí drena el seno venoso escleral (conducto de Schlemm) y regresa a la sangre. El humor acuoso se reemplaza por completo cada 90 minutos. La cámara vítrea es la cavidad más grande del globo ocular, y se encuentra entre el cristalino y la retina. Esta cámara está llena de humor vítreo, una sustancia transparente y gelatinosa que mantiene la retina pegada a la coroides y le da una superficie uniforme permitiendo la recepción de imágenes claras. A diferencia del humor acuoso, el vítreo no tiene recambio constante, se forma durante el desarrollo embrionario y está formado principalmente por agua, fibras de colágeno y ácido hialurónico. Además, contiene células fagocíticas que eliminan desechos y mantienen limpia esta parte del ojo (Figura 1A) (Dias, Joo y col. 2018, Moore 2018, Tortora y Derrickson 2018).

I.2. LA RETINA

La retina es una estructura fotosensible que se encuentra en la parte interna del ojo y pertenece al sistema nervioso central (SNC). Incluye tanto las neuronas sensoriales como los circuitos neuronales que se encargan de transformar los impulsos luminosos en señales nerviosas que se envían a través del nervio óptico al cerebro, donde se forman las imágenes (Helga Kolb y Ralph 2007).

La retina es un disco circular de entre 30 y 40 mm de diámetro, en el que se diferencian dos zonas: la retina central, que comprende un área de unos 6 mm de diámetro aproximadamente y la retina periférica, que se extiende desde la retina central hasta la ora serrata, donde conecta con el cuerpo ciliar.

En la retina central se pueden diferenciar tres estructuras: el punto ciego o papila del nervio óptico, la mácula y la fóvea. El punto ciego es la zona por donde los axones de las células ganglionares salen de la retina formando el nervio óptico. Esta zona carece de células sensibles a la luz. La mácula se localiza en el centro de la retina y es un área pigmentada debido a la elevada concentración de pigmentos xantofílicos que contiene. La fóvea es un área de 0.3 mm de diámetro situada en el centro de la mácula. Es la zona de mayor agudeza visual de la retina, ya que está compuesta por conos casi en su integridad. La retina periférica es menos sensible a la luz que la zona central, ya que presenta una menor densidad de conos (Helga Kolb y Ralph 2007, Hall 2016).

En la retina pueden diferenciarse nueve capas muy bien delimitadas. La capa más externa de la retina es el RPE que se encuentra en contacto directo con la túnica vascular. EL RPE está formado por células pigmentadas que evitan la dispersión de la luz, participan en el transporte iónico y de nutrientes al espacio subretiniano, se encargan de la fagocitosis de productos tóxicos, del mantenimiento de la barrera hemato-retiniana, de la protección frente a la fotooxidación y del reciclaje de los discos externos de los fotorreceptores. En contacto directo con las células del RPE se encuentra la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (CSE), en la que se generan las señales eléctricas en respuesta a la luz. La tercera capa es la membrana limitante externa (MLE), formada por las interconexiones horizontales entre las células fotorreceptoras y las células de Müller. A continuación, encontramos la capa nuclear externa (ONL) formada por los somas de los fotorreceptores. La siguiente capa o capa plexiforme externa (OPL) es una capa de conexiones sinápticas en la que contactan los axones de los fotorreceptores con las dendritas de las células bipolares y horizontales. Inmediatamente después se encuentra la capa nuclear interna (INL) formada por los cuerpos de las células bipolares. En la siguiente capa se producen las conexiones sinápticas entre las células bipolares y las células ganglionares y amacrinas, y recibe el nombre de capa plexiforme interna (IPL), seguida por la capa de cuerpos de las células ganglionares (GCL). La capa más interna de la retina recibe el nombre de membrana limitante interna (MLI) formada por uniones laterales de las prolongaciones terminales de las células de Müller y una membrana basal, separa la retina del humor vítreo (Figura 1B) (Purnyn 2013, Dias, Joo y col. 2018, Galluzzi, Vitale y col. 2018).

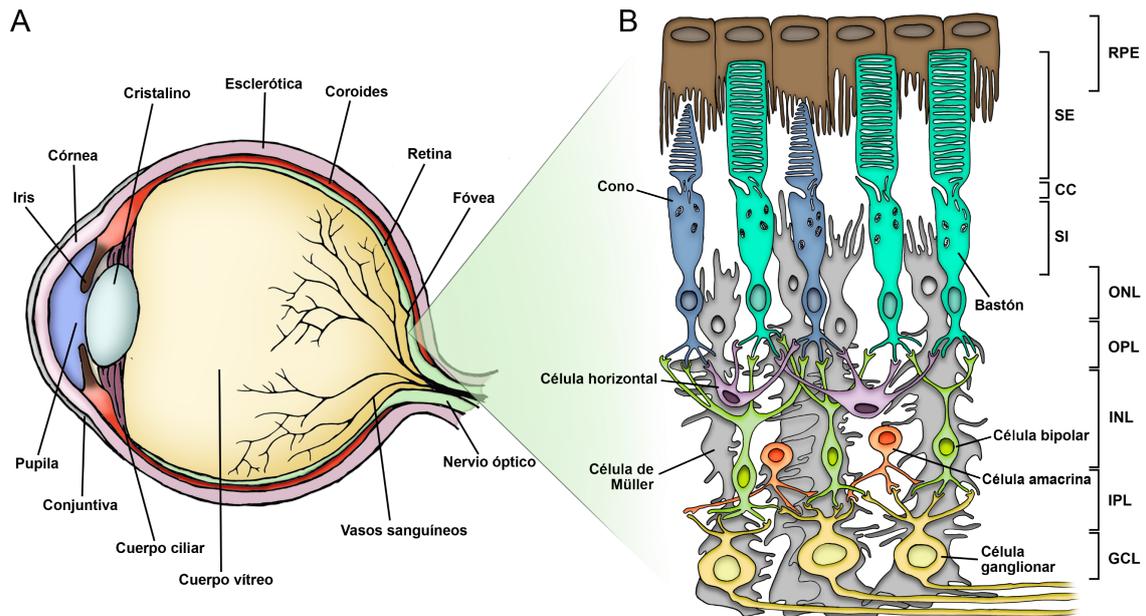


Figura 1. Anatomía del globo ocular. Estructura del globo ocular (A); estructura y tipos celulares de la retina humana (B); RPE: epitelio pigmentario, SE: segmento externo, CC: cilio conector, SI: segmento interno, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. Adaptada de Fuster García (Fuster García 2020).

I.2.1. TIPOS CELULARES

La estructura fundamental de la retina de los vertebrados se mantiene muy conservada. Contiene principalmente cinco tipos de neuronas y células gliales que proporcionan apoyo metabólico y homeostático.

I.2.1.1. CÉLULAS NEURALES

I.2.1.1.1. Fotorreceptores

Los fotorreceptores son las células de la retina sensibles a la luz, y pueden ser de dos tipos: conos y bastones. Los conos, más abundantes en la retina central, funcionan a altos niveles de iluminación, por lo que forman el sistema de visión fotópica y permiten la visión en color. Los bastones son más abundantes en la retina periférica y sensibles al nivel de iluminación que los conos, por lo que permiten la visión en condiciones escotópicas. En los fotorreceptores podemos diferenciar cuatro segmentos funcionales: el segmento externo, el segmento interno, el núcleo y el cuerpo sináptico. El segmento externo se encuentra en contacto directo con el RPE y está compuesto por múltiples discos formados por invaginaciones de la membrana plasmática que contienen los fotorreceptores. El segmento externo de los conos posee forma cónica, mientras que los bastones son más estrechos y largos. El segmento interno contiene el citoplasma de las

células. El cuerpo sináptico es la porción del fotorreceptor que conecta con las siguientes estructuras neuronales, las células horizontales y bipolares (Helga Kolb y Ralph 2007, Hall 2016, Dias, Joo y col. 2018, Simunovic, Shen y col. 2019).

I.2.1.1.2. Células horizontales

Las células horizontales se localizan inmediatamente después de los fotorreceptores, en zonas distales de la INL formando varias capas, cuyo número varía dependiendo de la especie. Establecen conexiones laterales con los cuerpos sinápticos de los conos y bastones y con las dendritas de las células bipolares. Estas uniones crean un fenómeno de inhibición lateral que limita la transmisión difusa de las señales a través de la retina. Este fenómeno es importante para lograr precisión en los márgenes de contraste de las imágenes visuales (Helga Kolb y Ralph 2007, Masland 2012, Hall 2016).

I.2.1.1.3. Células bipolares

Las células bipolares se localizan entre las células fotorreceptoras y las células ganglionares actuando de conexión entre ambos tipos celulares. Existen dos tipos de células bipolares, las que establecen conexiones sinápticas con los conos y las que las establecen con los bastones. Además, estas células pueden responder a los estímulos de dos formas diferentes, despolarizándose (tipo OFF) o hiperpolarizándose (tipo ON), dependiendo de la naturaleza de los canales de la membrana plasmática. Las células bipolares de conos (tipo ON y OFF) establecen conexiones con las células ganglionares tanto directas como indirectas, pasando por las células amacrinas que actúan como intermediarias. En cambio, las células bipolares de bastones solo establecen vías de transmisión hacia las células amacrinas. Son las células bipolares las que van a determinar el tipo de señal enviada al cerebro, ya que en las células ganglionares solo existen canales excitatorios (Helga Kolb y Ralph 2007, Masland 2012, Martínez-Fernández de la Cámara 2015).

I.2.1.1.4. Células amacrinas

Las células amacrinas se localizan en la INL e influyen en la transmisión de señales desde las células bipolares a las ganglionares. Se han identificado más de 30 tipos de células amacrinas con funciones diferentes, que en su mayoría son interneuronas que participan en el análisis de las señales visuales antes de que abandonen la retina. Las células amacrinas reciben señales de entrada de células bipolares y otras células amacrinas y envían señales a las células ganglionares y bipolares, de manera que proporcionan vías indirectas de transmisión de la señal entre ellas (Helga Kolb y Ralph 2007, Masland 2012, Hall 2016).

I.2.1.1.5. Células ganglionares

Las células ganglionares son células nerviosas capaces de generar impulsos nerviosos, que se encargan de enviar las señales visuales a zonas del cerebro como el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo o cerebro medio en forma de potenciales de acción. Sus axones forman el nervio óptico, la única vía de salida de información desde la retina. Se han descrito más de 30 tipos de células ganglionares diferentes.

Estas células pueden recibir la información desde las células amacrinas o desde las células bipolares. En general, las células bipolares aumentan la actividad de las células ganglionares, mientras que las células amacrinas tienden a disminuirla (Germain, Pérez-Rico y col. 2010).

I.2.1.2. CÉLULAS GLIALES

I.2.1.2.1. Células de Müller

Las células de Müller son las células gliales predominantes de la retina. Estas células se extienden verticalmente, desde la MLE hasta la MLI, y sus cuerpos celulares se localizan normalmente en la INL.

Las células de Müller se encargan del mantenimiento de la homeostasis y la regulación del medio extracelular retiniano (iones, agua, neurotransmisores y pH). Tienen una función importante en el metabolismo de las células neurales y el procesamiento de la información visual. Además, también parecen estar involucradas en el control de la angiogénesis y la regulación del flujo sanguíneo retiniano. Muchas enfermedades retinianas se asocian con una gliosis reactiva de las células de Müller, que liberan factores neurotróficos y glutamato al medio para favorecer la supervivencia de las células. Sin embargo, una gliosis reactiva exagerada, también puede contribuir a acelerar el proceso de degeneración neuronal (Mendez-Vilas y Díaz 2010).

I.2.1.2.2. Astrocitos

Los astrocitos no son células gliales propias de la retina, sino que penetran en ella desde el cerebro durante el desarrollo del nervio óptico. Se localizan en la parte más interna de la retina y presentan un cuerpo celular aplanado con ramificaciones fibrosas. Los astrocitos envuelven los axones de las células ganglionares formando una vaina axonal-glial-vascular, lo que contribuye a la formación de la barrera hemato-retiniana. Participan en la regulación de la homeostasis iónica y el metabolismo de los neurotransmisores. Además, son células con un abundante contenido de glucógeno que puede utilizarse como suministro de glucosa para las neuronas (Helga Kolb y Ralph 2007).

I.2.1.2.3. Microglía

Las células microgliales son los macrófagos del SNC cuya función está asociada a la respuesta a daño en las neuronas. En condiciones normales la microglía presenta un aspecto pequeño y ramificado, y se ubica principalmente en las capas plexiformes de la retina. Cuando se produce alguna alteración en el tejido, las células microgliales se activan, adquiriendo forma amebode y se desplazan hacia las zonas afectadas, donde se encargan principalmente de fagocitar las neuronas que se encuentran en proceso de degeneración (Gupta, Brown y col. 2003, Helga Kolb y Ralph 2007, Garces, Carmy y col. 2020).

I.3. FOTOTRANSDUCCIÓN

La fototransducción es el proceso por el que la energía luminosa se transforma en impulsos eléctricos que son enviados al cerebro para formar una imagen. La luz es absorbida por los fotorpigmentos o pigmentos visuales, que son proteínas coloreadas que sufren cambios estructurales al absorberla. Los fotorpigmentos se encuentran en los segmentos externos de los fotorreceptores. En los bastones encontramos un único tipo de pigmento, la rodopsina, mientras que los conos pueden presentar tres tipos de fotorpigmentos diferentes (S, M L), que permiten la visión en diferentes colores, dependiendo de la longitud de onda a la que absorben. Todos los fotorpigmentos están formados por una parte proteica denominada opsina, y un derivado de la vitamina A, denominado retinal. El retinal es la parte del fotorpigmento que absorbe la luz. Cuando la luz incide en la retina, el retinal experimenta una isomerización y pasa a su forma trans. La isomerización del retinal provoca la activación de una proteína G denominada transducina, que a su vez activa a la fosfodiesterasa de guanósín monofosfato cíclico (GMPC) 6 (PDE6). Esta enzima se encarga de la degradación del GMPC, disminuyendo su concentración en el segmento externo de los fotorreceptores. Esto provoca el cierre de canales de membrana regulados por GMPC, reduciendo la entrada de Na⁺ en las células y produciéndose la hiperpolarización de la membrana. La hiperpolarización provoca una disminución de la entrada de Ca²⁺ en los fotorreceptores, que conduce a una disminución de la liberación del neurotransmisor glutamato desde la terminación sináptica. Después de la isomerización el trans-retinal se separa de la parte proteica, se convierte de nuevo a cis-retinal y vuelve a conjugarse con la opsina para regenerar el fotorpigmento (Figura 2A).

En condiciones de oscuridad el cis-retinal no se isomeriza, de manera que la PDE6 permanece inactiva y la producción continuada de GMPC por la guanilato ciclasa, supone un aumento de su concentración en el segmento externo del fotorreceptor. El GMPC se une a canales de cationes no selectivos de la membrana, denominados canales de compuerta de GMPC, provocando su

apertura. Estos canales permiten la entrada de Na^+ en la célula, que despolariza la membrana. Esta despolarización se propaga hacia el terminal sináptico, provocando la apertura de canales de Ca^{2+} con compuertas de voltaje que permiten la entrada de Ca^{2+} en el fotorreceptor, desencadenando la exocitosis de las vesículas sinápticas y la liberación de gran cantidad de glutamato (Tortora y Derrickson 2018) (Figura 2B).

La liberación de glutamato en las células bipolares desencadena un procesamiento de las señales muy complejo. Existen dos tipos de células bipolares: las activadas por la luz o células bipolares ON, y las desactivadas por la luz o células bipolares OFF. Las células bipolares ON se activan en presencia de luz y son inhibidas por la liberación de glutamato en oscuridad. Las células bipolares OFF son excitadas por la liberación de glutamato en oscuridad e inhibidas por la luz. La capacidad excitatoria o inhibitoria del glutamato depende del tipo de receptor para glutamato que presenten las células bipolares. De esta forma la luz puede producir dos tipos de respuestas con un único neurotransmisor. Las células bipolares ON tienen un receptor de glutamato metabotrópico denominado mGluR6, que hiperpolariza la membrana de la célula tras la unión del glutamato en la oscuridad. Cuando mGluR6 no está activado, la célula bipolar ON se despolariza. Las células bipolares OFF tienen un receptor de glutamato inotrópico cuya unión a glutamato provoca la apertura de canales iónicos y despolariza la membrana de la célula en oscuridad.

Otro punto de procesamiento de la señal se produce en la sinapsis entre las neuronas bipolares y las células ganglionares. Estas conexiones también pueden ser excitatorias o inhibitorias. Cada célula ganglionar recibe información de áreas particulares de la retina, denominadas campos receptivos de la visión. Existen dos tipos de campos receptivos, los campos con centro activado y periferia desactivada y los campos con centro desactivado y periferia activada. En los campos con centro activado y periferia desactivada, la célula ganglionar asociada responde con mayor intensidad cuando la luz es más brillante en el centro del campo; si la luz es más brillante en la periferia del campo, la célula se inhibe y deja de producir potenciales de acción. En los campos de centro desactivado y periferia activada, la célula ganglionar asociada responde con mayor intensidad cuando la luz es más brillante en la periferia del campo y se inhibe cuando la luz es más brillante en el centro. Cuando la luz es uniforme a través de un campo receptivo, la célula ganglionar responde de forma débil y la retina utiliza el contraste para reconocer los objetos.

Posteriormente los potenciales de acción abandonan los cuerpos de las células y viajan por el nervio óptico hacia el SNC para su procesamiento (Silverthorn 2019).

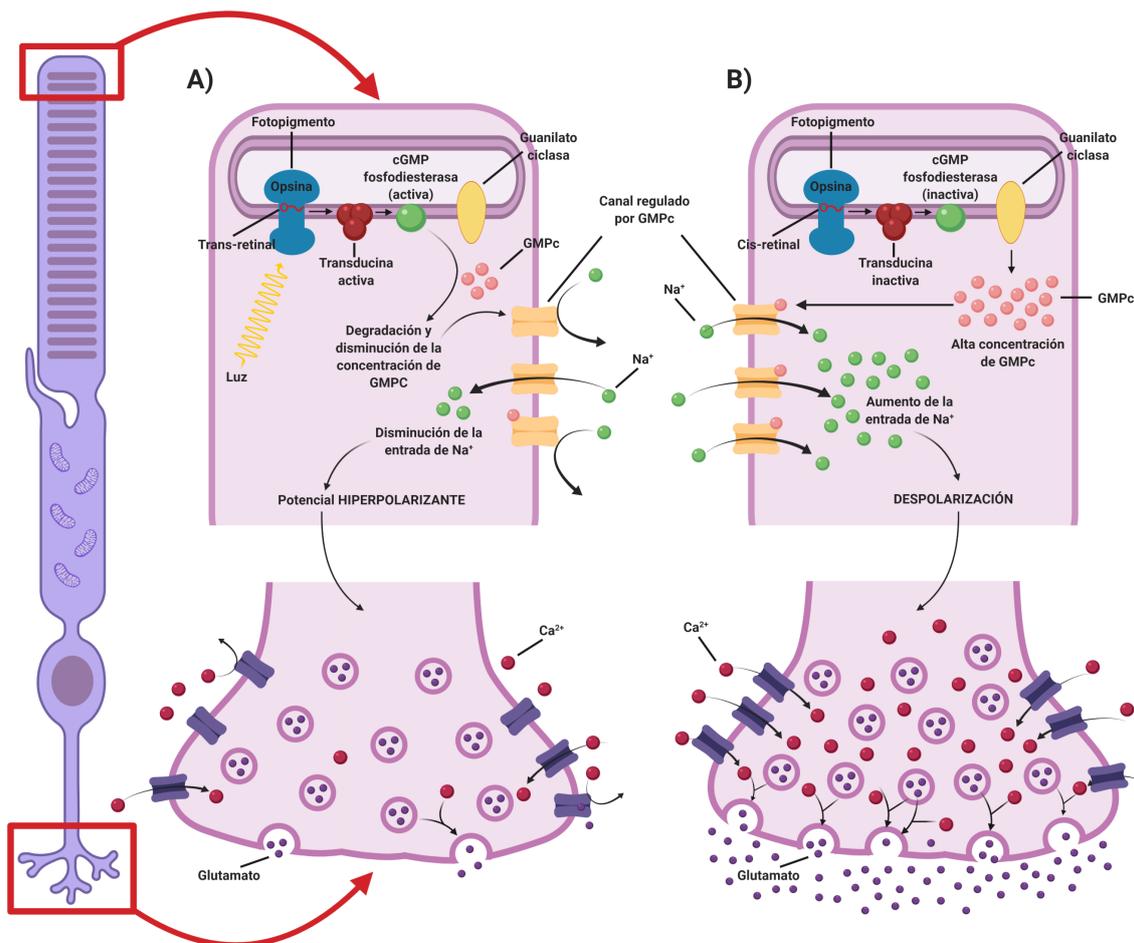


Figura 2. Mecanismo de fototransducción en bastones. Funcionamiento de un bastón bajo condiciones de iluminación (A); funcionamiento de un bastón bajo condiciones de oscuridad (B). Hecho con Biorender.

I.4. RETINOSIS PIGMENTARIA

La retinosis pigmentaria (RP) es, actualmente, la principal causa genética de discapacidad visual y ceguera en el mundo, con una prevalencia de 1:4000 individuos, que varía entre 1:9000 y 1:750, dependiendo de la localización geográfica. La RP comprende un grupo de distrofias hereditarias de la retina (DHRs), caracterizadas por la degeneración progresiva de las células fotorreceptoras (Chang 2016). En las primeras etapas de la enfermedad se produce la pérdida de los bastones, debida a defectos genéticos, seguida, en etapas más avanzadas, de la muerte de los conos (Donato, Scimone y col. 2019). Es muy probable que la muerte de este segundo tipo celular esté influenciada por la liberación de diferentes moléculas inflamatorias, radicales libres, etc. liberadas por los bastones y otros tipos celulares y, por tanto, sea independiente del defecto génico (Campochiaro y Mir 2018).

Uno de los primeros síntomas de la RP es la ceguera nocturna (nictalopía), a causa de la muerte de los bastones, y suele aparecer durante la infancia o la adolescencia. A medida que avanza la enfermedad se produce una reducción del campo visual (CV), lo que se conoce como visión en túnel. Aunque la función macular se conserva bastante bien hasta etapas avanzadas de la enfermedad, en algunos casos se puede llegar a perder la visión central, dando lugar a una ceguera total. En estos casos, la tasa de pérdida de agudeza visual depende del gen mutado, el tipo de mutación y otros factores modificantes (interacciones génicas, ambiente...). En el fondo de ojo de los pacientes con RP pueden observarse lesiones características: espículas óseas debidas a la acumulación de pigmento, principalmente en la periferia de la retina, atenuación de los vasos sanguíneos y palidez del nervio óptico (Figura 3) (Chang 2016, Mrejen, Audo y col. 2017, Dias, Joo y col. 2018, Naessens, Ruyschaert y col. 2019).

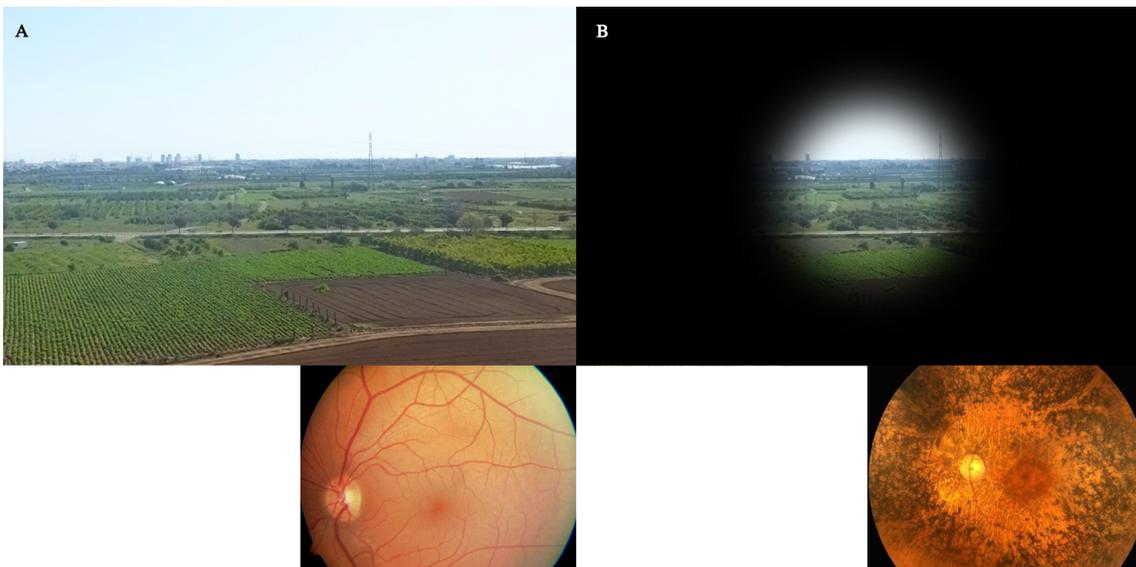


Figura 3. Visión característica y fondo de ojo de un individuo sano (A); visión característica y fondo de ojo de un paciente con RP (B). En la figura B podemos observar pérdida de la visión periférica, debida a la muerte de los bastones (visión en túnel), situados en la periferia de la retina; en el fondo de ojo, se observa acumulación de pigmento en la periferia de la retina, atenuación de los vasos sanguíneos y palidez del nervio óptico.

Se trata de una enfermedad con una elevada heterogeneidad fenotípica y genética. Hasta el momento, se han identificado mutaciones que causan tanto formas sindrómicas como no sindrómicas de RP en alrededor de 100 genes (RetNet). Las formas sindrómicas constituyen entre el 20% y el 30% de los casos de RP y cursan con trastornos extraoculares, como pérdida de la audición, obesidad, polidactilia y enfermedades neurológicas (Gao, Li y col. 2019). Existen alrededor de 30 síndromes diferentes que cursan con RP. Los más conocidos son el síndrome de

Usher, que afecta también a la capacidad auditiva y al equilibrio, y el síndrome de Bardet-Biedl, que afecta a la movilidad ciliar y provoca obesidad, polidactilia, hipogonadismo y disfunción renal (Dias, Joo y col. 2018).

Los genes o loci identificados pueden presentar herencia autosómica dominante (30-40% de los casos) (Naessens, Ruyschaert y col. 2019), autosómica recesiva (50-60% de los casos) o autosómica recesiva ligada al X (5-15% de los casos) (Simunovic, Shen y col. 2019).

También se han descrito casos de herencia digénica o mitocondrial (Zhang 2016). El tipo de herencia de la enfermedad se correlaciona con la edad en la que empieza a perderse la visión central. En las formas ligadas al X esta pérdida ocurre entre los 20 y 30 años; entre los 20 y 40 años en las formas autosómicas recesivas y, más tarde, en torno a los 60 años, en las formas autosómicas dominantes (Mrejen, Audo y col. 2017).

I.4.1. MODELOS EXPERIMENTALES EN RETINOSIS PIGMENTARIA

Existen diferentes modelos animales de RP, descubiertos o generados en ratón, rata, conejo, cerdo, pez cebra, perros e incluso primates no humanos (Bunel, Chaudieu y col. 2019). Sin embargo, los modelos de ratón son los más utilizados, puesto que ofrecen mayores ventajas en cuanto a coste, tiempo de progresión de la enfermedad y facilidad de manipulación (Dias, Joo y col. 2018). En algunos casos el descubrimiento de mutaciones causantes de degeneraciones retinianas en ratones ha permitido identificar, posteriormente, mutaciones homólogas en humanos. Por ejemplo, el descubrimiento del modelo de ratón *rd1* (*retinal degeneration 1*), llevó a la posterior identificación de mutaciones en genes humanos que provocan trastornos similares a los observados en los ratones (McLaughlin, Sandberg y col. 1993, Dias, Joo y col. 2018).

El ratón *rd1* o *Pde6brd1* fue el primer y mejor caracterizado modelo de RP. Presenta una mutación espontánea sin sentido (*nonsense*) en el gen de la subunidad β de la PDE6, que causa la muerte de los bastones en las primeras semanas de vida. Con el tiempo, terminan muriendo también gran parte de los conos (Bowes, Li y col. 1990, Pittler y Baehr 1991, LaVail, Matthes y col. 1997).

El modelo de ratón *rd10* (*retinal degeneration 10*) o *Pde6brd10* se descubrió años más tarde. Este ratón presenta una mutación con cambio de sentido (*missense*) también en el gen de la subunidad β de la PDE6, pero el comienzo de la degeneración retiniana es más tardío, e incluso puede retrasarse manteniendo a los animales en oscuridad. Además, la progresión de la enfermedad es más lenta que en el ratón *rd1*, lo que hace que sea un modelo más apropiado para el estudio de la patología humana y el ensayo de terapias, ya que se asemeja más a lo que

ocurre en los pacientes con RP (Otani, Dorrell y col. 2004, Gargini, Terzibasi y col. 2007, Pang, Dai y col. 2011, Dias, Joo y col. 2018).

I.4.2. TERAPIAS

Actualmente no existen terapias efectivas y duraderas para prevenir el desarrollo y la progresión de la RP o para recuperar la visión una vez la enfermedad está avanzada. Sin embargo, el ojo presenta numerosas ventajas como diana terapéutica con respecto al resto de órganos del cuerpo humano. Se trata de una estructura apareada y relativamente aislada del resto del cuerpo, lo que permite tratar un único ojo y utilizar el otro como control interno, además de reducir el impacto de cualquier efecto adverso al tratamiento. Presenta gran accesibilidad quirúrgica y los exámenes oftalmológicos y sistemas de imagen *in vivo* permiten detectar la función visual y el espesor de las capas de la retina, la monitorización de la laminación retiniana, la oxigenación de los vasos sanguíneos, los cambios celulares, la progresión de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos a tiempo real y de una forma relativamente rápida (Jayakody, Gonzalez-Cordero y col. 2015, Jones, Lu y col. 2017). Por todo ello, actualmente se están ensayando diferentes tipos de aproximaciones terapéuticas que actúan en las diferentes etapas de la enfermedad (Figura 4). El tratamiento farmacológico para la RP sería efectivo al inicio de la enfermedad, cuando todavía quedan células fotorreceptoras funcionales y se basa principalmente en la utilización de factores neurotróficos, anti-apotóticos, anti-inflamatorios o antioxidantes que frenen el proceso de degeneración o mantengan la integridad de las células. La terapia génica está indicada para etapas intermedias de la enfermedad, cuando los pacientes empiezan a desarrollar visión en túnel a causa de la pérdida de los bastones y consiste principalmente en la introducción de genes sanos en los fotorreceptores para evitar la muerte de este tipo celular. La terapia celular podría utilizarse en etapas más avanzadas de la enfermedad, para tratar de introducir células funcionales en la retina, cuando las propias células casi han desaparecido. Las prótesis de retina se utilizarían en etapas finales de la enfermedad, cuando la degeneración es muy avanzada y los pacientes prácticamente han perdido la visión, y consistiría en la introducción de implantes electrónicos o la estimulación mediante diferentes estrategias de otros tipos celulares como las células ganglionares.

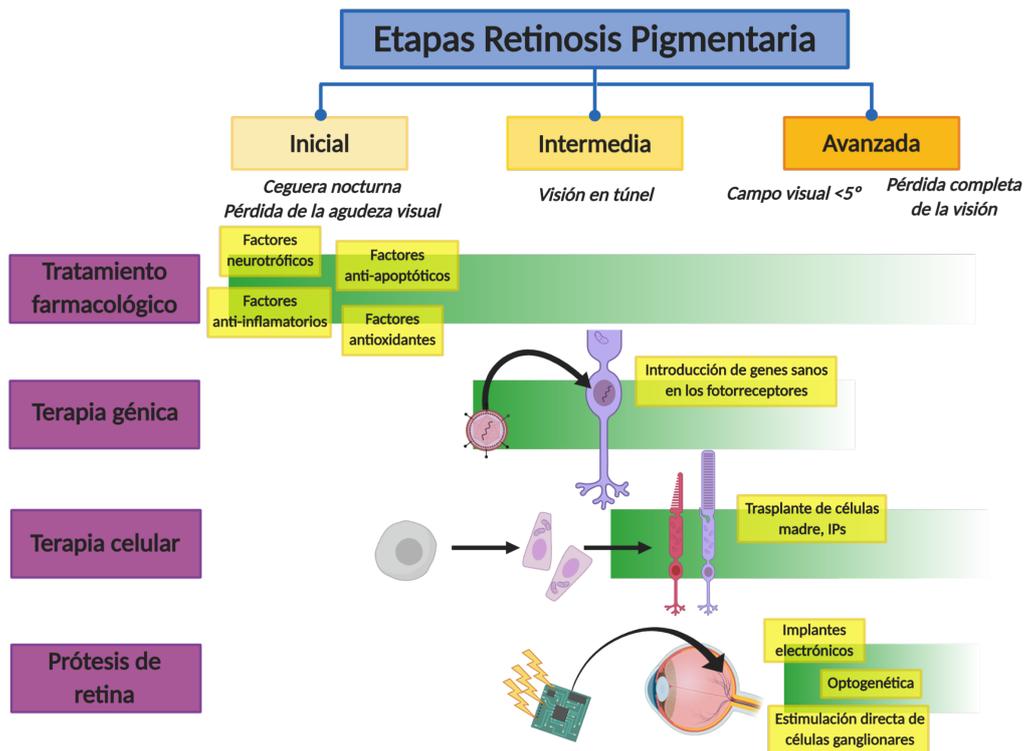


Figura 4. Estrategias actuales para el tratamiento de la RP, de acuerdo a las diferentes etapas de la enfermedad. En etapas iniciales de la enfermedad, cuando aparecen los primeros síntomas como la ceguera nocturna o la pérdida de la agudeza visual, las terapias farmacológicas podrían frenar la pérdida de células fotorreceptoras o mantener su función durante más tiempo. En etapas intermedias de la enfermedad cuando los pacientes empiezan a desarrollar visión en túnel a causa de la pérdida de los bastones, la terapia génica intenta introducir genes sanos en los fotorreceptores para evitar la muerte de los bastones y la terapia celular intenta introducir células capaces de desarrollar la función de los fotorreceptores que se han perdido. En etapas avanzadas de la enfermedad cuando prácticamente han desaparecido todas las células fotorreceptoras y los pacientes pierden casi por completo la visión, el único tipo de terapias ensayadas hasta el momento son las prótesis de retina, para introducir implantes electrónicos o estimular otros tipos celulares de la retina como las células ganglionares, que suplan la función de las células fotorreceptoras perdidas. Adaptada de Dias y col. (Dias, Joo y col. 2018). Hecho con Biorender.

Existen 185 ensayos clínicos descritos para RP (no sindrómica y sindrómica), de los cuales 79 se encuentran activos actualmente. Entre ellos encontramos 26 estudios observacionales y 53 intervencionales. Debido a su relación con este trabajo, en la Tabla 1 se representan los ensayos clínicos en marcha basados en terapias farmacológicas antiinflamatorias y antioxidantes. De los restantes, 10 utilizan terapia génica, 11 diferentes tipos de terapia celular, nueve se basan en implantes oculares y el resto utilizan otro tipo de compuestos o estrategias terapéuticas.

Tabla 1. Actuales ensayos clínicos en marcha con terapias antioxidantes o antiinflamatorias.

Ensayo clínico	Estado/Resultados/ Fecha de inicio	Agente/Tipo terapia
<i>Clinical Trials of Continuous Oxygen Therapy Combined With Blue Light Deprivation in the Treatment of Retinitis Pigmentosa</i>	Fecha inicio: mayo 2015 Estado: esperando reclutamiento de pacientes Resultados: sin resultados	Agente: Oxígeno continuado, Ginkgo biloba, Vitaminas B, A y D Tipo de terapia: Terapia con oxígeno/antioxidante
<i>Oral Hydroxychloroquine (HCQ) for Retinitis Pigmentosa Caused by P23H- Rhodopsin (RHO)</i>	Fecha inicio: febrero 2020 Estado: reclutamiento en marcha Resultados: sin resultados	Agente: Hidroxicloroquina Tipo de terapia: Antiinflamatoria
<i>The Effect of Oral Administration of 9-cis Rich Powder of the Alga Dunaliella Bardawil on Visual Functions in Adolescent Patients With Retinitis Pigmentosa</i>	Fecha inicio: febrero 2020 Estado: pendiente de reclutamiento Resultados: sin resultados	Agente: Alga Dunaliella Bardawil Tipo de terapia: Antioxidante
<i>The Effect of Oral Administration of 9-cis β Carotene Rich Powder of the Alga Dunaliella Bardawil</i>	Fecha inicio: septiembre 2012 Estado: reclutamiento en marcha Resultados: sin resultados	Agente: Alga Dunaliella Bardawil Tipo de terapia: Antioxidante
<i>The Effects of Cannabis on Visual Functions in Healthy and Retinitis Pigmentosa Patients</i>	Fecha inicio: septiembre 2018 Estado: reclutamiento en marcha Resultados: sin resultados	Agente: Cannabis Tipo de terapia: Antiinflamatoria
<i>Safety and Efficacy of NPI-001 Tablets for RP Associated With Usher Syndrome</i>	Fecha inicio: junio 2020 Estado: pendiente de reclutamiento Resultados: sin resultados	Agente: NPI-001 (N-acetilcisteína) Tipo de terapia: Antiinflamatoria/antioxidante
<i>Open-Label Rollover Study of PBI 4050 in Subjects With Alström Syndrome</i>	Fecha inicio: octubre 2017 Estado: activo, pendiente de reclutamiento Resultados: sin resultados	Agente: PBI-4050 Tipo de terapia: Antiinflamatoria

I.4.2.1. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS

Las terapias farmacológicas intentan frenar la progresión de la enfermedad y mantener la visión útil de los afectados durante más tiempo, principalmente a través de mecanismos neuroprotectores, anti-apoptóticos y anti-inflamatorios (Jayakody, Gonzalez-Cordero y col. 2015). Este tipo de terapias podrían aplicarse independientemente del defecto genético, sin embargo, no se trata de tratamientos curativos, puesto que no están actuando sobre el defecto genético que produce la enfermedad.

I.4.2.2. FACTORES NEUROTRÓFICOS

Los factores neurotróficos son péptidos o pequeñas moléculas que promueven la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las neuronas. Estos factores se agrupan principalmente en tres familias: neurotrofinas, familia de ligandos (GFLs) asociados al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y citoquinas neuropoyéticas (Deister y Schmidt 2006, Jayakody, Gonzalez-Cordero y col. 2015). En el ojo, estos factores de crecimiento son secretados principalmente por RPE y las células de Müller (Kolomeyer y Zarbin 2014, Jones, Lu y col. 2017).

Los tratamientos con factores neurotróficos de bajo peso molecular como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) son los más estudiados, aunque también existen aproximaciones terapéuticas utilizando el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), la cardiotrofina 1, el factor protector de conos derivado de bastones (RdCVF) o el factor de crecimiento derivado del epitelio cristalino (LEDGF) (Dias, Joo y col. 2018, Chemi, Brindisi y col. 2019).

La principal limitación del uso de estos factores para el tratamiento de las degeneraciones retinianas es que su vida media es corta, lo que hace que su administración tenga que ser continuada. Por esto, se están estudiando diferentes estrategias que permitan la liberación continuada de estos agentes neurotróficos como, por ejemplo, la utilización de virus adeno-asociados (AAV), de forma que se consiga la expresión de los factores de crecimiento directamente en el tejido dañado (Jones, Lu y col. 2017, Dias, Joo y col. 2018).

Tanto la administración puntual como la liberación prolongada de factores neurotróficos han sido eficaces en diferentes modelos animales; sin embargo, la eficacia no ha sido tan satisfactoria en los ensayos clínicos realizados hasta el momento (Chemi, Brindisi y col. 2019). Solo se ha probado el CNTF en ensayos clínicos a largo plazo y no se han observado beneficios

terapéuticos tras 60-90 días de la colocación intraocular de un implante que permite su liberación prolongada (Birch, Bennett y col. 2016).

I.4.2.3. AGENTES ANTI-APOTÓTICOS

Otra estrategia para frenar la degeneración retiniana es tratar de inhibir los mecanismos de muerte celular utilizando agentes anti-apoptóticos. La inhibición de la apoptosis mediante terapia génica introduciendo la proteína XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) en los modelos de rata de RP P23H y S334ter presenta efectos neuroprotectores sobre los fotorreceptores tanto a nivel estructural como funcional (Leonard, Petrin y col. 2007). Los inhibidores de calpaína (proteína mediadora de la ruta de la apoptosis) también favorecen la supervivencia de los fotorreceptores. Aunque algunos de ellos sólo muestren efectos neuroprotectores a corto plazo, pudiendo producir toxicidad si la administración es prolongada, existen otros como calpastatina, cuya administración intravítrea reduce la muerte de los fotorreceptores incluso tras exposiciones prolongadas en el modelo de ratón *rd1* (Paquet-Durand, Sanges y col. 2010). Como se describe más adelante, en los últimos años se han puesto de manifiesto otros tipos de muerte no apoptótica (parthanatos, necrosis programada) que podrían emplearse como dianas terapéuticas.

I.4.2.4. SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

Algunos tratamientos potenciales para la RP incluyen suplementos orales con sustancias antioxidantes como la vitamina A, la vitamina E, los minerales, el ácido docosahexaenoico (DHA), la luteína, la zeaxantina, la miricetina, el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), la progesterona y el ácido lipoico (AL) (Berson, Rosner y col. 2004, Berson, Rosner y col. 2010, Berson, Rosner y col. 2012, Rayapudi, Schwartz y col. 2013, Cuenca, Fernández-Sánchez y col. 2014, Yu, Yan y col. 2018, Chemi, Brindisi y col. 2019, Hernández-Rabaza, López-Pedrajas y col. 2019, Zhao y Feng 2019). Debido a la relevancia de las sustancias antioxidantes para este trabajo, las describiremos detalladamente más adelante.

Varias formas de RP se caracterizan por presentar niveles reducidos de 9-cis-retinal y sus derivados. Estas, son moléculas fotosensibles y derivadas del 11-cis-retinal. La suplementación con estas sustancias en modelos murinos de RP restaura los niveles de fotopigmento y reduce la progresión de la degeneración retiniana. Sin embargo, también existen evidencias de que dosis elevadas de retinoides pueden ser tóxicas y tener efectos teratogénicos (Travis, Golczak y col. 2007, Chemi, Brindisi y col. 2019).

I.4.2.5. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en la introducción, eliminación o cambio de material genético, especialmente ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN), en las células de un paciente para tratar una enfermedad específica. Para la introducción de un gen sano en la retina se utilizan vectores como los virus AAVs, que permiten su expresión durante un tiempo prolongado. Este enfoque no repara el gen mutado, pero introduce una copia normal del gen en la célula como ADN flotante libre.

La primera terapia de introducción génica aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) fue para el compuesto Voretigene neparvovec (Luxturna), en diciembre de 2017. Se trata de una terapia dirigida a pacientes con DHRs que presentan mutaciones monoalélicas y bialélicas en el gen RPE65 (proteína de 65 kilodalton específica del EPR), y que provoca amaurosis congénita de Leber y otras DHRs incluyendo RP. La administración subretiniana de una copia normal del gen RPE65 (Luxturna) mejora la función visual de los pacientes (Bennett, Wellman y col. 2016, Russell, Bennett y col. 2017).

Recientemente, se han iniciado diversos ensayos clínicos de introducción génica para DHRs. Entre ellos, existen ensayos en pacientes con síndrome de Usher tipo 1b, con mutaciones en el gen *MYO7A* (miosina VIIa); pacientes con RP ligada al cromosoma X con mutaciones en el gen *RPGR* (gen regulador de GTPasa implicado en retinosis pigmentaria) y pacientes con RP que presentan mutaciones en el receptor de la tirosina quinasa (*MERTK*) o en el gen *PDE6B* (subunidad β de la PDE6) (Chemi, Brindisi y col. 2019).

La principal limitación de los AAV es su espacio de carga relativamente pequeño, lo que dificulta la entrega de genes más grandes como por ejemplo *USH2A* (usherina) cuyas mutaciones causan síndrome de Usher o RP no sindrómica. Además, los resultados obtenidos hasta el momento no muestran una disminución en la tasa de degeneración de los fotorreceptores, posiblemente por el bajo título de vectores virales aprobado para el tratamiento humano. Por ello, la identificación de nuevos vectores para la introducción de genes al espacio intravítreo o subretiniano, como serían los vectores lentivirales, los liposomas, los polímeros o las nanopartículas no virales, es crucial para mejorar la focalización en las células retinianas afectadas y maximizar la eficacia y la seguridad del tratamiento (Chemi, Brindisi y col. 2019).

En algunos casos se han utilizado las nanopartículas CK30PEG10K, un péptido de poli-lisina catiónica conjugado con polietilenglicol (PEG), para introducir la secuencia genómica de la

rodopsina (Han, Banworth y col. 2015) o incluso el propio gen (Cai, Conley y col. 2010) en modelos murinos de RP. En ambos casos se consiguieron mejoras funcionales tanto para bastones como para conos, que conllevaban la prevención de la degeneración retiniana.

Los liposomas son otra alternativa segura a los vectores virales. La administración subretiniana de una copia del gen RPE65, en un modelo de ratón *knockout* para este gen utilizando nanopartículas tipo liposoma-protamina-ADN, produce la expresión del gen a largo plazo en las células del RPE, restaurando el fenotipo funcional y estructural en los ratones (Rajala, Wang y col. 2014).

Las nanopartículas del tipo Span-poli-L-arginina también muestran resultados prometedores. Su inyección en un modelo de ratón de RP autosómica dominante, para introducir una copia funcional del gen *PRPF31* que codifica para la proteína de “corte-empalme” Prpf31, muestra una transfección eficiente y una mejora de la función y la estructura de la retina (Pensado, Diaz-Corrales y col. 2016).

Este tipo de vectores son menos inmunogénicos que los AVV y presentan una mayor capacidad de carga, sin embargo, su penetración a través de la membrana plasmática puede ser ineficiente y pueden sufrir degradación tanto extra como intracelular. Esto hace que, actualmente, el número de estudios que utilizan vectores no virales sea considerablemente inferior a los que utilizan AVV (Dias, Joo y col. 2018).

En los casos de RP causados por mutaciones dominantes, un posible tratamiento sería la terapia génica de supresión de la expresión del alelo dominante (Peters-Silva y Linden 2014, Dias, Joo y col. 2018). Aunque hasta el momento no existen ensayos clínicos en marcha, se han ensayado estrategias de supresión y reemplazo del gen mutado en diferentes modelos animales, utilizando AAV portadores de ARN de interferencia (ARNi) para el gen de la rodopsina con resultados prometedores (Gorbatyuk, Justilien y col. 2007, O'Reilly, Palfi y col. 2007, Chadderton, Millington-Ward y col. 2009, Millington-Ward, Chadderton y col. 2011).

Una nueva técnica muy estudiada en los últimos años para la de reparación o cambio del material genético es la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9. Este sistema permite generar cortes dirigidos en la secuencia de ADN de doble cadena que activan la maquinaria de reparación celular del ADN. Las roturas de doble cadena pueden ser reparadas por recombinación no homóloga (NHEJ), lo que resulta en inserciones y/o deleciones en el locus objetivo, o por recombinación homóloga dirigida (HDR), lo que permite una sustitución precisa de nucleótidos en un lugar concreto si se suministra al sistema la secuencia de ADN deseada.

Con esta técnica se podría conseguir una cura completa para muchas enfermedades genéticas, si el tratamiento se realiza a tiempo. Este sistema se ha probado en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina y podría desempeñar un papel importante en la corrección de la mutación *RHO* P23H, una de las variantes de RP autosómicas dominantes más comunes en Estados Unidos y Europa. Hasta el momento se han observado resultados prometedores en modelos animales de RP, en los que la utilización del sistema para reparar diferentes genes consigue prevenir la degeneración retiniana y recuperar la función visual (Bakondi, Lv y col. 2016, Dias, Joo y col. 2018, Maeda, Mandai y col. 2019).

Todas estas terapias son muy prometedoras para el tratamiento de DHRs, ya que reemplazan los genes dañados, evitando la pérdida celular y la degeneración. Sin embargo, este enfoque presenta las mismas limitaciones que las terapias de suplementación o introducción génica, pues es específico para genes y secuencias mutadas, y su mayor desventaja reside en la elevada heterogeneidad de las DHRs y sus mutaciones, que requiere el desarrollo de enfoques independientes para cada gen afectado o para cada mutación (Chemi, Brindisi y col. 2019, Maeda, Mandai y col. 2019).

I.4.2.6. TRASPLANTE CELULAR

El trasplante celular consiste en la introducción de células sanas en un individuo enfermo con el fin de reemplazar las células no funcionales y restablecer las conexiones sinápticas con las células restantes de la retina. Existen dos tipos principales de células que pueden ser utilizadas, los precursores de fotorreceptores y las células madre embrionarias diferenciadas. Las que presentan un mayor potencial para este tipo de terapia son las células madre. Estas pueden ser de origen exógeno como las células madre embrionarias (ESCs), células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) o células madre de origen endógeno. La principal ventaja de este tipo de aproximación terapéutica es que las células madre pueden diferenciarse a cualquier tipo celular, incluyendo las células de la retina.

El número de ensayos clínicos de trasplante celular para el tratamiento de la RP realizados hasta el momento no es muy elevado, y la eficacia de esta estrategia todavía no ha sido completamente probada. Existen varios ensayos en pacientes con distrofias de retina en los que la inyección intravítrea o subretiniana de diferentes tipos de células precursoras no produce efectos adversos. Además, un elevado porcentaje de los pacientes mostró una mejora en la función visual, aunque durante un tiempo limitado (Siqueira, Messias y col. 2011, Park, Bauer y col. 2014, Schwartz, Regillo y col. 2015, Siqueira, Messias y col. 2015).

El trasplante de ESCs ha mostrado resultados prometedores en modelos de animales de RP, sin embargo, la utilización de este tipo de células en humanos es polémica, además de que presenta un elevado riesgo de rechazo. Una alternativa para evitar los problemas éticos e inmunológicos es el uso iPSCs, cuyo trasplante subretiniano muestra diferenciación morfológica y funcional de las células trasplantadas, integración sináptica con las células del huésped y mejora de la función visual en modelos animales (Lamba, McUsic y col. 2010, Tucker, Park y col. 2011, Zhou, Wang y col. 2011, Li, Tsai y col. 2012). Sin embargo, el trasplante de iPSCs requiere del uso de factores de transcripción que podrían producir efectos no deseados y los defectos genéticos permanecerían, ya que las células trasplantadas son autógenas, por lo que las mutaciones deben corregirse, *ex vivo*, antes de la diferenciación y el trasplante.

Otra estrategia que también se ha ensayado en modelos animales es el trasplante de retinas tridimensionales generadas a partir de cultivos de iPSCs derivadas de la retina. En el modelo de ratón *rd1*, el trasplante de este tipo de retinas generó una lámina con estructura de capa nuclear externa, capaz de realizar sinapsis e integrarse con las células bipolares del huésped sin activar procesos de gliosis en la retina (Assawachananont, Mandai y col. 2014, Mandai, Fujii y col. 2017). Esta estrategia se ha probado también en un ensayo clínico en un paciente con degeneración macular, al que se le trasplantó una lámina de células iPSCs derivadas del RPE. Estas células permanecieron bajo la retina 25 meses sin tratamiento inmunosupresor y sin presentar efectos adversos importantes (Souied, Pulido y col. 2017). Esto indica que el uso de iPSCs derivadas del RPE o de células fotorreceptoras puede ser una estrategia prometedora para el tratamiento de otras enfermedades retinianas, incluidas las distrofias hereditarias de la retina (Dias, Joo y col. 2018).

I.4.2.7. OPTOGENÉTICA

La optogenética consiste en la introducción de información genética que codifique para proteínas sensibles a la luz (opsinas) en las neuronas, con el propósito de que puedan ser estimuladas. En el contexto de la restauración de la visión en las DHRs, se refiere a técnicas que permiten la introducción de vectores que codifican para opsinas en las células de la retina, con el fin de convertir las neuronas secundarias y/o terciarias en neuronas primarias o fotorreceptores, o más raramente, hacer que los fotorreceptores degenerados vuelvan a ser sensibles a la luz. Para ello, pueden utilizarse tanto opsinas microbianas, de animales o de algas unicelulares, como las canalrodopsinas. Los enfoques optogénéticos ofrecerían la posibilidad de restaurar la visión en los pacientes de una forma no invasiva e independientemente del defecto

genético, permitiendo la excitación de un área más amplia de la retina que los implantes retinianos.

Los ensayos preclínicos realizados en los últimos años muestran que la inserción de opsinas exógenas en las neuronas retinianas representa un enfoque terapéutico prometedor para la restauración de la visión en diferentes distrofias de retina. Sin embargo, todavía existen muchas cuestiones por determinar, cómo cuál sería el vector óptimo y la estrategia quirúrgica adecuada para introducir las opsinas en las células, o incluso cuál sería la célula diana ideal para el procedimiento, que quizá puedan resolverse tras la publicación de los resultados del primer ensayo clínico en fase I/II en humanos, actualmente en marcha (Chemi, Brindisi y col. 2019, Simunovic, Shen y col. 2019).

1.4.2.8. PRÓTESIS DE RETINA

Una estrategia alternativa para los pacientes con RP en etapas avanzadas de la enfermedad son las prótesis electrónicas de retina. Estos dispositivos funcionan estimulando directamente la actividad neural de las células retinianas aun conservadas, en respuesta a la luz incidente. Los implantes transforman la información lumínica en señales eléctricas que pueden ser interpretadas por el cerebro. Estas prótesis pueden clasificarse en epirretinianas, subretinianas y supracoroidales según su localización intraocular.

Sólo cuatro de estos dispositivos han obtenido la marca conformidad europea (CE) para su uso comercial en el Espacio Económico Europeo: Retina Implant Alpha IMS (dispositivo de primera generación, Retina Implant AG, Reutlingen, Alemania), Retina Implant Alpha AMS (dispositivo de segunda generación, Retina Implant AG), Argus II Retinal Prosthesis System (Second Sight Medical Products Inc, Sylmar, CA, EEUU) e IRIS II (Pixium Vision, París, Francia). Y solo tres de ellos (Argus II and Alpha-IMS y Alpha AMS) han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos a largo plazo.

A pesar de los avances electrónicos y los resultados prometedores de los ensayos clínicos, todavía existen muchas limitaciones fisiológicas y tecnológicas en las prótesis retinianas. Los pacientes ganan una visión rudimentaria y, actualmente, solo están indicados para pacientes ciegos en etapas avanzadas de la enfermedad (Paquet-Durand, Sanges y col. 2010, Edwards, Cottrill y col. 2018).

I.5. INFLAMACIÓN

La inflamación es la respuesta del sistema inmune a un estímulo nocivo que puede ser provocado por diferentes factores, principalmente patógenos, daño celular o compuestos tóxicos. Estos estímulos pueden inducir una inflamación puntual o mantenerse en el tiempo de forma crónica, activando diferentes vías de señalización. Entre las vías más frecuentes encontramos las vías NF-kB, MAPK y JAK-STAT que van a activar la producción de diferentes mediadores como citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina (IL) 1 beta (IL1-β), IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interferón gamma (IFN-γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)), citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva (CPR), la haptoglobulina, la proteína amiloide sérica, el fibrinógeno y la glicoproteína ácida alfa-1. La inflamación es un mecanismo de defensa necesario para eliminar el daño y recuperar la homeostasis de los tejidos (Chen, Deng y col. 2018).

Las células inmunes presentes en el SNC, incluida la retina, son las células microgliales. En condiciones normales o ausencia de daño, estas células presentan una morfología ramificada con un soma pequeño y redondo y participan en los procesos de crecimiento axonal, remodelación sináptica y supervivencia neuronal. En respuesta a estímulos negativos, lesiones tisulares o radicales libres, las células de la microglía pasan a un estado reactivo, que se caracteriza por la adquisición de una morfología ameboide, adquiriendo funciones características de los macrófagos como la fagocitosis, la inducción del proceso inflamatorio y la presentación de antígenos a los linfocitos (Vilhardt 2005, Noailles, Fernandez-Sanchez y col. 2014).

Durante las respuestas inflamatorias agudas se minimiza o elimina el daño, la lesión o la infección; sin embargo, la inflamación aguda, incontrolada y excesiva puede volverse crónica y resultar perjudicial para las células (Jiao, Natoli y col. 2015, Chen, Deng y col. 2018).

I.5.1. INFLAMACIÓN EN RETINOSIS PIGMENTARIA

A pesar de todos los avances que se están produciendo en la comprensión de la patogénesis y genética de la RP, los mecanismos biológicos por los que las mutaciones genéticas inducen la muerte de los fotorreceptores, todavía no están completamente claros. Numerosos estudios indican que existe una relación importante entre la progresión de la enfermedad y la inflamación. La neuroinflamación, la activación de la microglía y el aumento de mediadores inflamatorios como TNFα, IL-6, IL1α, IL1β, proteínas quimioatrayentes de monocitos 1 y 2 (MCP-

1, MCP-2) o factor de crecimiento plaquetario (PGF) están presentes tanto en pacientes como en modelos murinos de RP durante las primeras etapas de la enfermedad, y se postula que contribuyen a la muerte de los fotorreceptores (Gupta, Brown y col. 2003, Zeng, Zhu y col. 2005, He, Bui y col. 2008, Sasahara, Otani y col. 2008, Ebert, Weigelt y col. 2009, Sheets, Jun y col. 2013, Appelbaum, Santana y col. 2017, Ten Berge, Fazil y col. 2019). Además, se ha observado un proceso inflamatorio crónico durante la progresión de la enfermedad en pacientes con RP y en ratones *rd10* (Yoshida, Ikeda y col. 2013b, Yoshida, Ikeda y col. 2013a, Murakami, Ikeda y col. 2018).

Los estudios sugieren que el proceso inflamatorio es consecuencia de la muerte de los bastones, cuya degeneración se desencadena por defectos genéticos. En este proceso degenerativo, las células inflamatorias se activarían liberando sustancias inflamatorias que contribuirían a la degeneración de esos bastones y, posteriormente a la de los conos por su efecto citotóxico. La pérdida de los conos supone un gran problema para los pacientes de RP, puesto que es la que conduce en última instancia a la ceguera total. Por ello, en los últimos años, el bloqueo farmacológico de estas moléculas inflamatorias ha sido objeto de estudio como diana terapéutica para enlentecer la progresión de la enfermedad en diferentes tipos de degeneraciones retinianas (Peng, Xiao y col. 2014, Zhao, Zabel y col. 2015, Massengill, Ahmed y col. 2018). De hecho, en modelos murinos de RP se ha visto que la inhibición de la microglía reduce la muerte de los fotorreceptores (Zhang, Cui y col. 2018) y mejora la estructura de la retina y la función visual (Peng, Xiao y col. 2014).

A pesar de que el ojo es un órgano inmunoprivilegiado, para limitar las respuestas inmunes e inflamatorias y preservar la visión (Zhou y Caspi 2010), algunos marcadores inflamatorios como la CRP se ven aumentados en pacientes con RP y se correlacionan con el rápido deterioro de la función visual. Esto sugiere que además de la inflamación local, la inflamación sistémica también contribuiría a la progresión de la RP (Murakami, Ikeda y col. 2018). Los estudios en modelos animales corroboran estos datos y sugieren que los daños periféricos, como una infección sistémica o un proceso inflamatorio crónico, podrían también contribuir a la degeneración retiniana en los pacientes con DHRs, y se deberían tener en cuenta para el desarrollo de posibles tratamientos (Noailles, Maneu y col. 2018).

En nuestro grupo hemos comprobado que existe un aumento de TNF α en humor acuoso de pacientes con RP, además de un aumento de la expresión génica de esta citoquina en la retina del ratón *rd10* y en un modelo *ex vivo* de explantes de retina porcina (Martinez-Fernandez de la

Camara, Olivares-Gonzalez y col. 2014, Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015, Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

El TNF α es una citoquina pleiotrópica producida por diferentes tipos celulares en el organismo, aunque las principales productoras son las células monocíticas como los macrófagos, las células de la astrogliá y la microglía, las células de Lagerhans y las células de Kupffer. El TNF α actúa a través de dos receptores transmembrana, el receptor 1 (TNFR1) y el receptor 2 (TNFR2), controlando la expresión de otras citoquinas, receptores inmunes, factores de crecimiento y genes del ciclo celular que, a su vez, regulan los procesos inflamatorios, la supervivencia, la apoptosis, la migración, la proliferación y la diferenciación celular. El TNFR1 se expresa constitutivamente en los tejidos, mientras que la expresión de TNFR2 está altamente regulada y se expresa típicamente en las células del sistema inmune. La unión del TNF α al TNFR1 es considerada como permanente, mientras que la unión con el TNFR2 es rápida y transitoria (Haider y Knofler 2009, Parameswaran y Patial 2010).

En la retina, el TNF α es liberado por macrófagos activados y células gliales y puede estar implicado tanto en vías de muerte celular como de supervivencia, dependiendo de la vía de señalización predominante en el tipo celular sobre el que actúa. Es un factor inductor de la transcripción del factor NF-kB que conduce a la expresión de genes inflamatorios y de supervivencia, que inhiben la activación de las caspasas. Sin embargo, también puede tener un efecto pro-apoptótico cuando la vía NF-KB está bloqueada (Van Herreweghe, Festjens y col. 2010, Vandenabeele, Declercq y col. 2010, Vanlangenakker, Vanden Berghe y col. 2012, Cullen, Henry y col. 2013, Pasparakis y Vandenabeele 2015, Ting y Bertrand 2016).

El TNF α está implicado en la patogénesis de diversas enfermedades oculares inflamatorias, ya que participa en la inducción y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria que se encuentra aumentada en enfermedades como la uveítis, el glaucoma, los tumores vasculares de retina, la enfermedad de Adamantiades-Behcet y distintas degeneraciones retinianas como la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía isquémica o la RP (Murray, Hoekzema y col. 1990, Seddon, George y col. 2005, Durrani, Ahmed y col. 2007, Japiassu, Brasil y col. 2008, Cvenkel, Kopitar y col. 2010, Saxena, Khanna y col. 2011, Fernandez-Vega, Fernandez-Vega y col. 2016). Por ejemplo, la generación de un ratón *knockdown* para TNF α en el modelo de RP, ratón T17M con mutación en *RHO*, retrasa la muerte de las células fotorreceptoras de la retina (Rana, Kotla y col. 2017), lo que sugiere que podría ser una atractiva diana terapéutica.

Partiendo del aumento de TNF α observado en pacientes y ratones *rd10*, optamos por la inmunoneutralización con anticuerpos comerciales anti-TNF α , para evaluar su posible efecto neuroprotector frente a la degeneración retiniana. Actualmente, existen en el mercado diferentes moléculas capaces de bloquear el TNF α , tanto originales como biosimilares. El Infliximab (Remicade®) es una inmunoglobulina quimérica humana (IgG1) con un fragmento variable de ratón (Fv) que presenta una gran afinidad por el TNF α y una elevada capacidad de neutralización. El Adalimumab (ADA, Humira®) es un anticuerpo contra TNF α totalmente humanizado. El Etanercept es una proteína dimérica recombinante, formada por una porción del TNFR2 humano unido a un fragmento cristalizable de IgG1 humana. El Certolizumab pegol es fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal murino humanizado específico para TNF α , unido a dos moléculas de polietilenglicol. El Golimumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG1k (Mirshahi, Hoehn y col. 2012).

Algunos de estos compuestos ya se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante (Schulz y Dotzlaw 2014) o la psoriasis (Aboobacker y Al Aboud 2020), y en oftalmología como tratamiento alternativo en pacientes con uveítis (Diaz-Llopis, Salom y col. 2012, LaMattina y Goldstein 2017).

El tratamiento con inhibidores de TNF α ya se ha ensayado en pacientes con diferentes patologías retinianas como la degeneración macular asociada a la edad, la uveítis o la retinopatía diabética, mostrando resultados positivos en el caso de la uveítis (Wu, Hernandez-Bogantes y col. 2011, Mirshahi, Hoehn y col. 2012, Wu, Arevalo y col. 2013, Hamam, Barikian y col. 2016). Sin embargo, ninguno de ellos se había probado en RP hasta el momento.

En nuestro caso, estudiamos el efecto de estos anticuerpos utilizando Infliximab en un modelo *ex vivo* de degeneración de retina porcina y ADA *in vivo*, en el modelo de ratón *rd10*. El tratamiento con Infliximab redujo la degeneración retiniana y la inflamación en el modelo de retina porcina. El bloqueo de TNF α mediante inyecciones intraperitoneales de ADA en el ratón *rd10* redujo la muerte de los fotorreceptores en un momento concreto de la degeneración retiniana, a día postnatal (P) 18. Además, se observó una reducción de la gliosis reactiva y un aumento de la respuesta antioxidante. Sin embargo, la eficacia del tratamiento no se prolongó en el tiempo, pues a P20 ya no se observó efecto neuroprotector.

En modelos caninos de RP y en el modelo de rata P23H (mutación en *RHO*) se ha observado un aumento de la expresión génica de los componentes del inflammasoma NLRP3 (proteína NLRP3, PYCARD y caspasa 1) y de citoquinas pro-inflamatorias dependientes de caspasa 1 como la IL1 β y la IL18, que podrían estar implicados en la muerte de los fotorreceptores por piroptosis

(Viringipurampeer, Metcalfe y col. 2016, Appelbaum, Santana y col. 2017). Los inflammasomas son complejos citosólicos de multiproteínas formados por un receptor de reconocimiento de patrones (PRR), una proteína adaptadora ASC (proteína que contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasas: CARD) y una forma activa de la caspasa 1. Su mecanismo de acción está mediado por la unión del PRR a la proteína ASC mediante oligomerización con su ligando. A continuación ASC convierte la pro-caspasa 1 a la forma activa de la caspasa-1 a través del adaptador CARD. La actividad proteolítica de la caspasa 1 ejerce funciones importantes en la inmunidad innata, mediando la maduración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33, así como el inicio de una forma lítica de muerte celular, llamada piroptosis, a través de la escisión de la gasdesmina D (GSDMD) cuya sección N-terminal se inserta en la membrana plasmática formando poros que dan lugar a la permeabilización de la misma (Dubois y Sorgeloos 2019, Aral y Milward 2020). Se han identificado diferentes tipos de receptores capaces de activar el ensamblaje del inflammasoma, incluyendo los receptores tipo NOD (proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos, NLRs) entre los que se encuentran NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6 y NLRP12 (Turner, Arulkumaran y col. 2014, Jimenez 2015, Aral y Milward 2020).

El inflammasoma NLRP3 puede ser activado por una gran variedad de estímulos diferentes, que van desde componentes patógenos microbianos, tales como el lipopolisacárido (LPS), los péptidoglucanos, hasta un amplio rango de bacterias y virus, pero también por moléculas de origen endógeno que se liberan cuando existe daño celular o tisular, como la presencia de ATP extracelular, el ácido hialurónico, las fibrillas del péptido β -amiloide, los cristales de ácido úrico, el eflujo de potasio, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales o la desestabilización fagosomal que ocurre tras la digestión de partículas grandes como el urato monosódico (Aral y Milward 2020).

Además del bloqueo de TNF α o la inhibición de la microglía, existen otras aproximaciones terapéuticas centradas en reducir la inflamación durante la enfermedad. El tratamiento con hormonas esteroideas es un campo muy estudiado en los últimos años. La administración de progesterona o Norgestel (análogo de la progesterona) disminuye la muerte de los fotorreceptores, la gliosis reactiva, la activación de la microglía y reduce la liberación de factores inflamatorios en ratones *rd10* (Roche, Ruiz-Lopez y col. 2018, Benlloch-Navarro, Trachsel-Moncho y col. 2019). El tratamiento con dexametasona también disminuye la inflamación, contribuye a la supervivencia de los conos y mejora la agudeza visual en el mismo modelo murino de RP (Guadagni, Biagioni y col. 2019). También se ha visto que la inserción de un implante intraocular de dexametasona en un paciente con RP y edema macular, mejoró la

agudeza visual, aunque sólo durante seis meses, lo que requeriría numerosas intervenciones para mantener su efecto en el tiempo (Ahn, Kim y col. 2014).

TUDCA también ha mostrado tener un efecto antiinflamatorio beneficioso en la RP, reduciendo la inflamación y la activación de la microglía y disminuyendo la degeneración de los fotorreceptores en un modelo murino de degeneración retiniana (Zhang, Shahani y col. 2019).

Por último, algunos antioxidantes como el AL (Hernández-Rabaza, López-Pedrajas y col. 2019), la N-acetilcisteína (Lee, Usui y col. 2011), la cúrcuma (Vasireddy, Chavali y col. 2011), o el *Lycium barbarum* (bayas de Goji) (Wang, Xiao y col. 2014b), también tienen propiedades antiinflamatorias. Existe un ensayo clínico con pacientes de RP, en el que el consumo de bayas de Goji provoca un menor adelgazamiento de la mácula que en aquellos que tomaron placebo. Aun así, no se observan diferencias significativas sobre el CV y las pruebas electrofisiológicas entre ambos grupos (Chan, Lam y col. 2019).

I.6. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como la alteración del equilibrio entre la producción de ROS y la respuesta antioxidante. Las ROS se forman y degradan de manera normal por el metabolismo aeróbico, y son necesarias en concentraciones fisiológicas para el correcto funcionamiento de las células. Cuando la producción de estas moléculas excede a la respuesta antioxidante, se acumulan en cantidades excesivas, llevando a un estado de estrés oxidativo y afectando negativamente a la función de las células (Sies 1997, Betteridge 2000).

Las ROS incluyen una serie de moléculas pequeñas derivadas del oxígeno muy reactivas, ya que contienen electrones desapareados, entre las que se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical aloxilo (RO), el radical peroxilo (ROO) y el oxígeno molecular singlete (1O_2) (Thuy le, Thuy y col. 2017).

El cuerpo humano dispone de una gran variedad de antioxidantes que le permiten contrarrestar los efectos de los agentes oxidantes, entendiéndose como antioxidante cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones más bajas que el sustrato oxidable, retrasa o inhibe su oxidación. Los antioxidantes endógenos pueden dividirse en dos categorías: enzimáticos y no enzimáticos.

Las principales enzimas antioxidantes son las superóxido dismutasas (SOD) en sus diferentes formas (citoplasmática (SOD1), mitocondrial (SOD2) y extracelular (SOD3)), la catalasa (CAT), y la glutatión peroxidasa (GPX). Las SODs catalizan la dismutación del O_2^- en H_2O_2 y oxígeno. El

H_2O_2 , es un oxidante débil y relativamente estable. Sin embargo, a diferencia del O_2^- , el H_2O_2 puede propagarse rápidamente a través de las membranas celulares y convertirse en $\cdot OH$ en presencia de metales de transición. La GPX, presente en el citosol y las mitocondrias, y la CAT presente en los peroxisomas, son las enzimas encargadas de reducir la concentración de H_2O_2 . La GPX reduce el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes y la CAT reduce el H_2O_2 a agua (Figura 5).

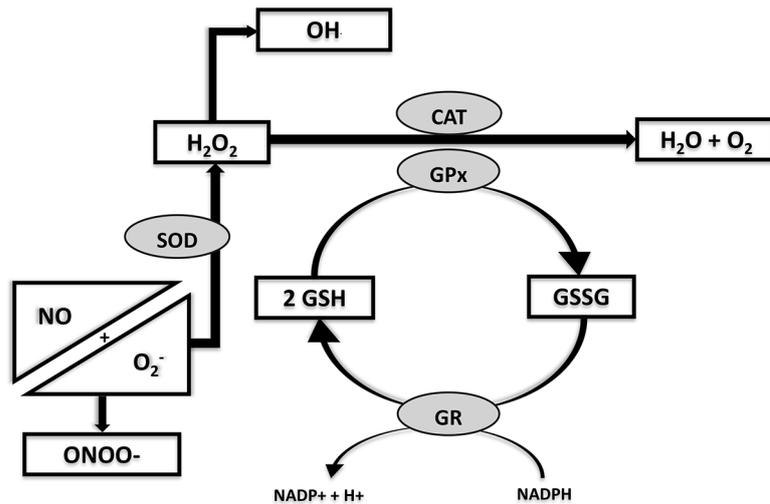


Figura 5. Esquema del funcionamiento del sistema antioxidante celular. Las enzimas antioxidantes del cuerpo humano son las encargadas de contrarrestar los efectos de los agentes oxidantes. La SOD cataliza la dismutación del O_2^- , dando lugar a H_2O_2 . La CAT y la GPX se encargan de reducir la concentración de H_2O_2 . La CAT reduce el H_2O_2 a O_2 y H_2O y la GPX reduce el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes. La GR (glutatión reductasa) se encarga de regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir de NADPH. Adaptada de Martínez-Fernández de la Cámara (Martínez-Fernández de la Cámara 2015).

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen moléculas de bajo peso molecular como las vitaminas C y E, glutatión (GSH) y el β -caroteno. La vitamina C o ácido ascórbico actúa tanto a nivel intracelular como extracelular, capturando radicales libres del oxígeno. La vitamina E es liposoluble, y se concentra en el interior hidrofóbico de la membrana celular, siendo la principal defensa frente al daño en la membrana inducido por la oxidación, ya que actúa donando electrones al radical ROO que se produce durante la peroxidación lipídica. El GSH es muy abundante en todos los compartimentos celulares y es el principal antioxidante soluble. Puede actuar de diferentes formas. Elimina el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos a través de la acción de la enzima GPX. El GSH dona su electrón a H_2O_2 para reducirlo a H_2O y O_2 , oxidándose a disulfuro de glutatión (GSSG), que se reducirá de nuevo a GSH por la glutatión reductasa (GR). También participa en la conversión de las vitaminas C y E de nuevo a sus formas activas. El β -caroteno reacciona con los radicales ROO, $\cdot OH$ y O_2^- . Actúa normalmente a concentraciones bajas de

oxígeno, aunque también puede tener efectos antioxidantes a concentraciones más altas. Es capaz de regular factores de transcripción, inhibiendo el NF- κ B inducido por estrés oxidativo y la activación de IL-6 y TNF α (Birben, Sahiner y col. 2012, Campochiaro y Mir 2018).

El estrés nitrosativo también es una condición a tener en cuenta, ya que puede actuar junto con el estrés oxidativo, produciendo daño en los tejidos. Se trata de un estado en el que la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) excede a la habilidad del sistema para neutralizarlas y eliminarlas. Las RNS son una familia de moléculas derivadas del óxido nítrico (NO) y el O₂⁻, producidas principalmente por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), aunque también pueden intervenir la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa (XO), la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa (COX) (Thuy le, Thuy y col. 2017).

I.6.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RETINOSIS PIGMENTARIA

Los estudios preclínicos muestran que el estrés oxidativo también contribuye de manera significativa a la progresión de la degeneración en modelos de RP (Komeima, Rogers y col. 2006, Xiong, MacColl Garfinkel y col. 2015, Nakatake, Murakami y col. 2016). En pacientes con RP también se ha observado un aumento de marcadores de estrés oxidativo y una disminución de las proteínas o actividades enzimáticas antioxidantes en humor acuoso y sangre, lo que indica una alteración del estado antioxidante-oxidante en la retina (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013, Murakami, Ikeda y col. 2018). Sin embargo, actualmente el mecanismo patogénico del estrés oxidativo no está totalmente claro (Donato, Scimone y col. 2019).

Los fotorreceptores son células metabólicamente muy activas y presentan un débil sistema antioxidante, por lo que son extremadamente susceptibles al daño oxidativo (Arjunan, Lin y col. 2018). Los bastones constituyen el 95% de las células fotorreceptoras, mientras que los conos solo el 5%. Las células fotorreceptoras consumen 3-4 veces más O₂ que otras células del SNC y su principal fuente de energía es el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos (Donato, Scimone y col. 2019). Las mutaciones genéticas causan la muerte de los bastones, mientras que la degeneración de los conos se produce más tardíamente y, como hemos comentado anteriormente, se cree que es debida al ambiente tóxico generado por la muerte de los bastones. En relación con el estrés oxidativo, existe una hipótesis oxidativa que propone que tras la muerte de los bastones, principales consumidores de oxígeno de la retina, este se acumularía dando lugar a una situación de hiperoxia, produciendo daño oxidativo, que provocaría la muerte de los conos (Yu, Cringle y col. 2004, Padnick-Silver, Kang Derwent y col. 2006, Campochiaro y Mir 2018, Donato, Scimone y col. 2019) (Figura 6). En respuesta a estos cambios en la concentración de oxígeno, se produce una hipoperfusión en la retina que genera

posteriormente una situación de hipoxia y que agravaría todavía más el daño sobre las células retinianas (Bramall, Wright y col. 2010). En este sentido, se han detectado cambios en la concentración y distribución del oxígeno en la retina entre las diferentes etapas de la enfermedad en modelos animales de RP (Yu, Cringle y col. 2000, Yu, Cringle y col. 2004) y en pacientes con RP (Turkseven, Valmaggia y col. 2014, Lang y Harris 2019).

Esta implicación del estrés oxidativo en la progresión de la enfermedad, ha hecho que los suplementos orales con sustancias antioxidantes para el tratamiento de la RP sean considerados una alternativa muy prometedora. Tal como se ha explicado anteriormente, compuestos como la vitamina A, la vitamina E, el DHA, la luteína, la zeaxantina, la progesterona y el AL son algunos de los candidatos con mayor potencial para su uso. En los últimos años se han documentado diferentes estudios que muestran efectos beneficiosos de estos compuestos en modelos animales de degeneración retiniana, ya que pueden retrasar la progresión de la enfermedad, reducir la muerte celular y mejorar la función de las células de la retina (Dias, Joo y col. 2018, Hernandez-Rabaza, Lopez-Pedrajas y col. 2019).

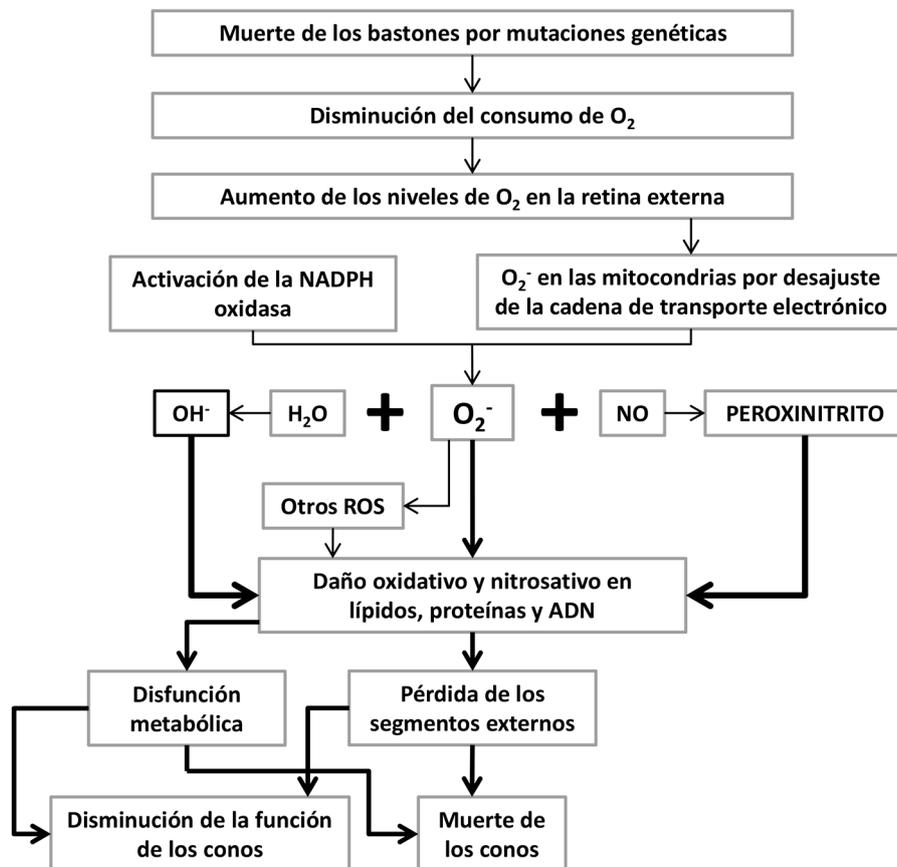


Figura 6. Teoría del mecanismo por el cual el daño oxidativo contribuye a la degeneración retiniana en RP. Adaptada de Campochiaro y Mir (Campochiaro y Mir 2018).

Aunque existen algunos estudios en modelos animales y en pacientes de RP utilizando vitaminas A y E (Berson, Rosner y col. 1993, Li, Sandberg y col. 1998), únicamente la combinación de vitamina A y DHA ha mostrado efectos beneficiosos sobre la degeneración retiniana en pacientes, aunque limitados, ya que el tratamiento solo es efectivo durante los dos primeros años de administración (Berson, Rosner y col. 2004).

La luteína y la zeaxantina son pigmentos maculares que no pueden sintetizarse por el organismo y deben adquirirse a través de la dieta. Existen evidencias de que estos pigmentos protegen a las células del daño oxidativo, de la muerte y mejoran la función de los fotorreceptores en diferentes modelos animales de degeneración retiniana, posiblemente a través de la reducción del estrés oxidativo del retículo endoplasmático (RE) (Thomson, Toyoda y col. 2002, Dias, Joo y col. 2018, Yu, Yan y col. 2018).

Aunque la progesterona tiene propiedades antiinflamatorias y no presenta la estructura química típica de un antioxidante, también es capaz de reducir la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, intensificando la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD (Pajovic, Saicic y col. 1996, Stein, Wright y col. 2008). El tratamiento con progesterona preserva significativamente el número de células fotorreceptoras, reduce la gliosis reactiva y aumenta la concentración de la GSH reducida en la retina de modelos murinos de RP, como el ratón *rd1* y el ratón *rd10* (Sanchez-Vallejo, Benlloch-Navarro y col. 2015, Ramirez-Lamelas, Benlloch-Navarro y col. 2018, Benlloch-Navarro, Trachsel-Moncho y col. 2019).

El AL es un compuesto sintetizado enzimáticamente por las mitocondrias y, a pesar de las propiedades antiinflamatorias mencionadas anteriormente, también puede actuar como antioxidante. La administración de AL, generalmente combinado con otros antioxidantes, reduce los marcadores de estrés oxidativo, la pérdida de células fotorreceptoras (conos) y mejora la función visual en varios modelos murinos de degeneración retiniana (Komeima, Rogers y col. 2006, Sanz, Johnson y col. 2007, Ramirez-Lamelas, Benlloch-Navarro y col. 2018).

La curcumina, un pigmento amarillo aislado de rizomas de plantas de cúrcuma, es otro suplemento nutricional a tener en cuenta, ya que presenta un efecto neuroprotector en las células retinianas y mejora la función visual en modelos animales de RP, probablemente a través de la reducción del estrés oxidativo en el RE como ocurre con la luteína y la zeaxantina (Vasireddy, Chavali y col. 2011, Scott, Kaplan y col. 2015).

Previamente hemos comentado que las Bayas de Goji presentan actividad neuroprotectora gracias a sus efectos antiinflamatorios, pero en los últimos años se ha visto que también

presentan gran capacidad antioxidante. El tratamiento con este compuesto conserva la estructura de la retina y la función visual en un modelo murino de RP, a través de la disminución del estrés oxidativo, aunque probablemente sus propiedades antiinflamatorias también estén contribuyendo a este efecto (Wang, Xiao y col. 2014a).

Estudios más recientes utilizan otros nutraceuticos con propiedades antioxidantes como la naringenina o la quercetina, presentes en las frutas cítricas, la uva y las manzanas. El tratamiento crónico con estos flavonoides preserva la morfología retiniana y mejora la funcionalidad de las células fotorreceptoras en ratones *rd10*, a través de la reducción del estrés oxidativo (Piano, D'Antongiovanni y col. 2019).

El factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B) se expresa en la mayoría de tipos celulares y tejidos. En los últimos años se ha observado que VEGF-B es capaz de promover la expresión de las enzimas antioxidantes como la GPX o la SOD, lo que le confiere un papel importante en la protección de los tejidos frente al daño oxidativo. Los niveles de expresión de VEGF-B son elevados en las células del RPE y, aunque son necesarios más estudios en este campo, la administración de VEGF-B en ratones *rd1* reduce la degeneración, aumentando la expresión de genes antioxidantes, principalmente del gen de la GPX. Estos resultados, y el hecho de que los efectos secundarios que presenta son mínimos, lo convierten en una posible diana terapéutica muy prometedora para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Arjunan, Lin y col. 2018, Chen, Lee y col. 2019).

I.7. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLES POR HIPOXIA

Los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs) son proteínas de señalización compuestas por una subunidad alfa sensible al oxígeno (HIF-1 α , HIF-2 α o HIF-3 α) y una subunidad beta constitutiva e insensible al oxígeno. HIF-1 α y HIF-2 α son subunidades homólogas, pero tienen diferentes funciones en el desarrollo, en las respuestas adaptativas al oxígeno y regulan genes diana diferentes. La expresión de HIF-1 α es ubicua (Ozaki, Yu y col. 1999, Forooghian, Razavi y col. 2007, Hughes, Groot y col. 2010, Mowat, Luhmann y col. 2010) y participa en las respuestas celulares a bajos niveles de oxígeno (Semenza 2004), estimulando la expresión de genes implicados en varios procesos celulares como la vasodilatación (óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS, óxido nítrico sintasa inducible, iNOS y endotelina 1, ET-1), la neurovascularización (VEGF y eritropoyetina, EPO), el metabolismo de la glucosa (transportador de glucosa 1, GLUT-1) y genes relacionados con la respuesta antioxidante (Mn-SOD o hemoxigenasa-1) (Ke y Costa 2006). HIF-2 α tiene una distribución más localizada (Mowat, Luhmann y col. 2010) y parece que se estabiliza a presiones parciales de oxígeno mayores,

siendo importante en los procesos de adaptación a hipoxia crónica (Holmquist-Mengelbier, Fredlund y col. 2006). HIF-2 α regula la expresión de algunos factores de transcripción, de genes relacionados con la homeostasis mitocondrial y de algunas enzimas antioxidantes (Scortegagna, Ding y col. 2003). Actualmente, el papel de HIF-3 α no se conoce en profundidad.

Los niveles de HIF-1 α se regulan manteniendo un equilibrio entre su síntesis, regulada por mecanismos independientes del oxígeno y su degradación, que es regulada por los niveles de oxígeno intracelular. En normoxia, HIF-1 α es hidroxilado continuamente en residuos de prolina por tres prolil-hidroxilasas (PHD1-3) diferentes (Bruick y McKnight 2001). La hidroxilación permite la unión de la proteína supresora de tumor von Hippel Lindau (VHL), junto a otros factores, y la ubiquitinación que, finalmente, produce la degradación de las subunidades HIF-1 α en el proteasoma (Maxwell, Wiesener y col. 1999, Ivan, Kondo y col. 2001). Las subunidades HIF-1 α también son hidroxiladas en residuos de asparagina por el factor FIH (factor inhibidor de HIF, *factor inhibiting HIF*) evitando la transcripción de sus genes diana (Mahon, Hirota y col. 2001). En condiciones de hipoxia, la prolil-hidroxilación está suprimida y las subunidades HIF-1 α no se degradan, se translocan al núcleo, dimerizan con HIF-1 β y se unen a p300/CBP activando la transcripción de sus genes diana (Figura 7).

Sin embargo, se ha descrito que HIF-1 α también está activo en retina humana y de rata en normoxia, lo que sugiere un papel fisiológico en este tejido (Merin y Auerbach 1976). La regulación de los niveles de HIF-1 α parece ser importante para controlar los efectos nocivos de los cambios de oxígeno en diversas retinopatías isquémicas e inflamatorias como la retinopatía diabética, el glaucoma o la retinopatía del prematuro (Arjamaa y Nikinmaa 2006). A pesar de que se han observado cambios en los niveles de HIF-1 α en modelos murinos de RP durante la progresión de la enfermedad (Maxwell, Wiesener y col. 1999, Punzo, Kornacker y col. 2009, Choudhury, Bhootada y col. 2013, Wang, Xiao y col. 2014b) su función no está clara (Arjamaa y Nikinmaa 2006).

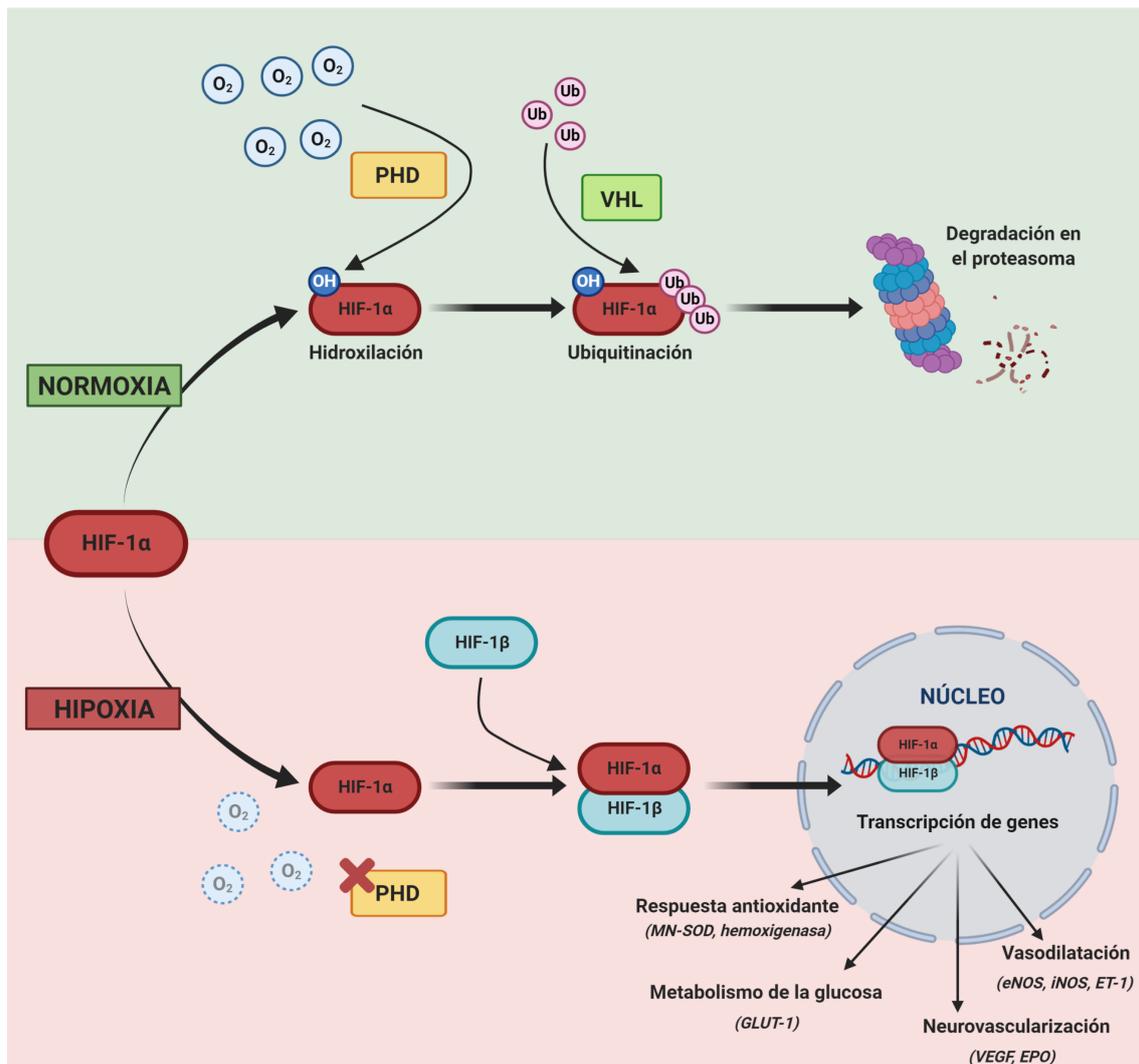


Figura 7. Mecanismo de regulación de HIF-1α. En condiciones normales de oxígeno, HIF-1α es continuamente hidroxilado en sus residuos de prolina por las PHDs, lo que permite que sea reconocido por la proteína VHL y ubiquitinado para su degradación en el proteasoma. Cuando los niveles de oxígeno disminuyen, la prolil-hidroxilación se suprime, permitiendo la dimerización de HIF-1α con la subunidad HIF-1β y su translocación al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados con la vasodilatación, la neurovascularización, el metabolismo de la glucosa y genes relacionados con la respuesta antioxidante, entre otros. Hecho con Biorender.

I.8. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Hasta hace relativamente poco tiempo, solo se conocían un par de tipos de muerte implicadas en los procesos de degeneración retiniana, la apoptosis y la necrosis. Sin embargo, actualmente se proponen varios mecanismos de muerte neuronal que también podrían estar presentes en las degeneraciones retinianas (Fricker, Tolkovsky y col. 2018) (Figura 8).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, que va acompañada de una reducción del volumen de la célula, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear en

la que no se produce liberación del contenido celular y cuyo inicio depende de la activación de una serie de cisteínas proteasas denominadas caspasas (Degterev, Boyce y col. 2003, Baumgartner, Meder y col. 2009, Kroemer, Galluzzi y col. 2009, D'Arcy 2019). Existen dos tipos de caspasas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. El daño celular produce la activación de las caspasas iniciadoras (8 y 9), que activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7). Estas últimas inician una cascada de eventos que resultan en la fragmentación de ADN, la activación de las endonucleasas, la destrucción de las proteínas nucleares y del citoesqueleto y la expresión de ligandos para atraer a células fagocíticas. Se trata de un proceso altamente conservado y genéticamente controlado que puede ser activado por la propia célula cuando detecta daños, lo que se conoce como vía intrínseca de la apoptosis, o por la interacción con células del sistema inmune. En este caso se denomina vía extrínseca de la apoptosis. La vía intrínseca depende de factores liberados por las mitocondrias y puede iniciarse por inducción negativa o positiva. Las señales negativas surgen de la ausencia de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento en el entorno inmediato a la célula. Sin estas señales de supervivencia, las moléculas pro-apoptóticas del interior de la célula, que normalmente se encuentran inhibidas, se activan e inician la apoptosis. También existen factores de naturaleza positiva como la hipoxia, las toxinas, la radiación, los ROS, los virus y otros agentes tóxicos que pueden activar los procesos apoptóticos. La vía intrínseca de la apoptosis se caracteriza por la permeabilización de la membrana mitocondrial, que conduce a la liberación al citoplasma de factores pro-apoptóticos que provocan la activación de la caspasa 9 iniciadora, y la consecuente activación de la caspasa 3 efectora (Brenner y Mak 2009, D'Arcy 2019). La vía extrínseca de la apoptosis se activa a través de los miembros de la familia de receptores del TNF, también llamados receptores de muerte. El receptor de muerte más característico es el FAS (CD95/APO-1), que activa a la caspasa 8. La caspasa 8 inicia una cascada de activación que incluye las caspasas 3, 6 y 7, que ejecutan la señal de muerte (Brenner y Mak 2009).

La necrosis es un proceso de muerte no controlado, inducido por una lesión externa como la hipoxia o la inflamación, en la que se produce un hinchamiento de los orgánulos celulares y la ruptura de la membrana plasmática, resultando en la liberación del contenido celular al ambiente extracelular, lo que desencadena una cascada de inflamación y daño tisular. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un proceso de muerte independiente de energía, donde la célula sufre un daño tan severo que deja de funcionar y normalmente muere por hinchamiento (proceso conocido como oncosis) y lisis, ya que no logra mantener la homeostasis con su entorno (Fink y Cookson 2005, D'Arcy 2019).

Sin embargo, esta división no refleja la diversidad de formas de muerte conocidas actualmente (Figura 8). Existen otros procesos de muerte programada que no son apoptóticos e incluyen necroptosis, piroptosis, parthanatos, dependiente de lisosomas (LCD), dependiente de autofagia y oncosis, un mecanismo intermedio entre apoptosis, autofagia y necrosis.

En estos procesos la muerte está genéticamente controlada e implica procesos celulares activos que en principio pueden bloquearse, mientras que la necrosis no regulada implica procesos pasivos difíciles o imposibles de bloquear (Fink y Cookson 2005, Fricker, Tolkovsky y col. 2018, Tang, Kang y col. 2019). Existen autores que clasifican necroptosis, ferroptosis, piroptosis y parthanatos como tipos de necrosis regulada (Peng, Song y col. 2020).

La necroptosis es un tipo de necrosis regulada, cuya activación está medida por receptores de muerte como Fas o TNFR1 y el ligando inductor de apoptosis (TRAIL). Se caracteriza por una disminución de ATP, ruptura de la membrana plasmática y liberación de HMGB1 (High mobility group box 1), entre otras. HMGB1 es una proteína estructural de la cromatina que en la necroptosis puede actuar como una citoquina. La activación del TNFR1 puede desencadenar tres estados funcionales que dependen del conjunto de proteínas reguladoras que se impliquen en el proceso. Por una parte, el TNFR1 puede unirse a la proteína de muerte asociada al receptor TNFR1 (TRADD), la proteína quinasa RIP1 (receptor-interacting protein, RIPK1) y varias ubiquitín ligasas E3, para formar el complejo de supervivencia I, donde RIPK1 es poliubiquitinada, desencadenando rutas de supervivencia celular. Cuando se produce la desubiquitinización de RIPK1, se forman los complejos proteicos IIa o IIb. El complejo IIa activa la caspasa 8 y desencadena la apoptosis, mientras que el complejo IIb desencadena procesos de necroptosis, mediados principalmente por RIPK1 y RIPK3, formando el complejo preneocrótico que promueve el reclutamiento, la fosforilación y la traslocación a la membrana plasmática de la proteína MLKL (pseudoquinasa quinasa-como dominio de linaje mixto, *mixed-lineage kinase domain-like*), induciendo la permeabilización de la membrana con la consecuente entrada de calcio, lo que resulta en necrosis y muerte celular (Stanger, Leder y col. 1995, Micheau y Tschopp 2003, Degterev, Huang y col. 2005, Fink y Cookson 2005, Vandenabeele, Declercq y col. 2010, Galluzzi, Vitale y col. 2012, D'Arcy 2019). Además, RIPK3 activa una serie de vías de transducción de señales que inducen la producción de ROS en la mitocondria (Cho, Challa y col. 2009, He, Wang y col. 2009, Zhang, Shao y col. 2009) o la activación del inflammasoma NLRP3 (Lawlor, Khan y col. 2015).

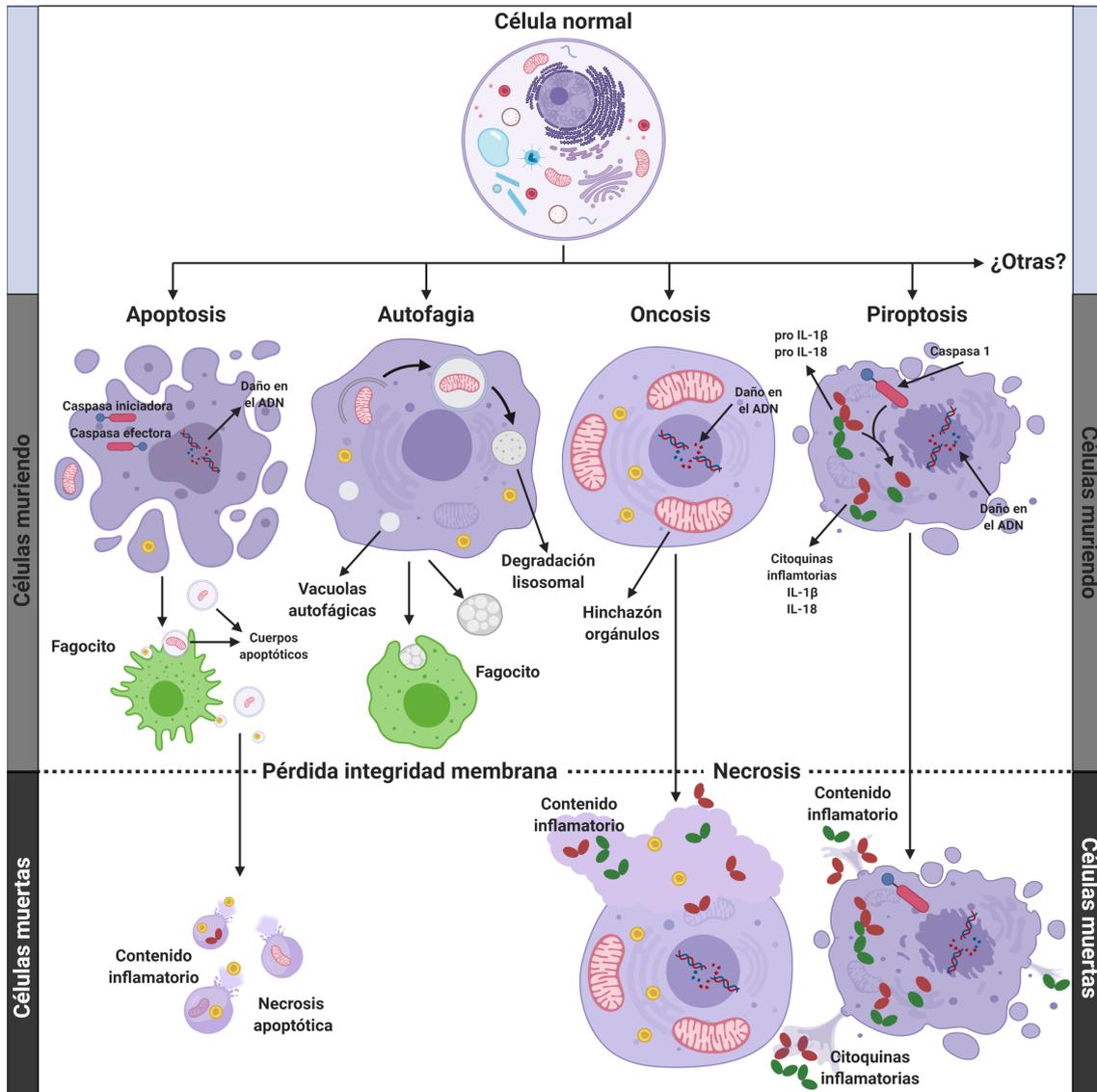


Figura 8. Principales mecanismos de muerte celular. Las células pueden responder a los estímulos desencadenando diferentes vías de muerte celular. La apoptosis es un tipo de muerte mediada por caspasas iniciadoras y caspasas eectoras que, se caracteriza por una condensación nuclear y citoplasmática, daño en el ADN y formación de cuerpos apoptóticos. La integridad de la membrana plásmática se mantiene y se expresan marcadores de superficie que facilitan la fagocitocitosis de los restos celulares. Durante la autofagia los componentes celulares se degradan en vacuolas autofágicas en el interior de la célula y se produce una ligera condensación de la cromatina. La oncosis se caracteriza por hinchamiento celular y descomposición de los orgánulos celulares y la membrana plásmática, produciéndose la liberación del contenido inflamatorio al medio extracelular. La piroptosis es un tipo de muerte proinflamatoria mediada por la activación de la caspasa 1, que produce la maduración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. También se produce la lisis celular y liberación de los componentes inflamatorios al medio extracelular. Adaptada de Fink y Cookson (Fink y Cookson 2005). Hecho con Biorender.

La piroptosis es considerada una forma de muerte proinflamatoria que depende de los PRRs. Tras la estimulación por patrones moleculares asociados a patógenos o patrones moleculares asociados a daños, se produce la activación de la caspasa 1 que cataliza el paso de la pro-IL1 β y la pro-IL-18 a sus formas activas y la activación de la proteína citosólica GSDMD que, al escindirse, forma poros en la membrana plasmática. Esto provoca un desequilibrio iónico que facilita la entrada de agua en la célula y termina produciendo la lisis de la misma y la liberación de citoquinas inflamatorias al ambiente extracelular (Fink y Cookson 2005, D'Arcy 2019, Hachim, Khalil y col. 2020). Durante la piroptosis la integridad nuclear se mantiene y puede observarse condensación y fragmentación del ADN oligonucleosomal, pero con un patrón diferente al característico de la apoptosis (Bergsbaken, Fink y col. 2009).

La ferroptosis es otra forma de necrosis regulada, dependiente del hierro y que puede ser desencadenada por estrés citotóxico (ROS) en las neuronas. Las principales características de este tipo de muerte incluyen disminución o desaparición de las crestas mitocondriales, condensación y ruptura de la membrana mitocondrial externa. Estas anomalías celulares son consecuencia de la pérdida de permeabilidad selectiva de la membrana plasmática debido a la peroxidación lipídica intensa del hierro presente en los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana y la aparición de estrés oxidativo (Fricker, Tolkovsky y col. 2018, Mou, Wang y col. 2019, Li, Cao y col. 2020)

La autólisis o LCD se define como la muerte celular mediada por la permeabilización de la membrana lisosomal. Este tipo de muerte se desencadena por perturbaciones en la homeostasis intracelular, y da lugar a la liberación al citosol del contenido lisosomal, incluyendo enzimas proteolíticas de la familia de las catepsinas, enzimas hidrolasas e incluso ADNasa II. Las catepsinas citosólicas desencadenan la muerte celular, catalizando la activación o inactivación proteolítica de varios sustratos, como son BID, BAX, miembros de la familia del factor anti-apoptótico BCL2, y XIAP que provocan permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de las caspasas. Además, la autólisis puede ser desencadenada por otros factores como las calpaínas, los agentes lisosomotrópicos (esfingosina) o los ROS (Fricker, Tolkovsky y col. 2018, Galluzzi, Vitale y col. 2018).

La necrosis impulsada por transición de la permeabilidad mitocondrial es una forma de muerte iniciada por perturbaciones del microambiente intracelular tales como el estrés oxidativo severo y la sobrecarga citosólica de Ca²⁺, dando lugar a la desconexión de la fosforilación oxidativa, el agotamiento de la energía celular, y la muerte celular necrótica. El término se refiere a una pérdida de la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria a pequeños solutos, causada por la apertura de pequeños poros, lo que resulta en una rápida

disipación del potencial de membrana mitocondrial, la ruptura osmótica de ambas membranas mitocondriales y desencadena en muerte celular. También existen evidencias de que la pérdida de la permeabilidad de la membrana puede causar degradación de NAD(H) debido a la activación de los miembros de la familia de enzimas poli-ADP polimerasas (PARP) que resulta en el agotamiento de la energía y la muerte celular (Fricker, Tolkovsky y col. 2018, Galluzzi, Vitale y col. 2018).

Parthanatos es una forma de muerte celular recientemente descrita, dependiente de la formación de polímeros de poli-ADP ribosa (PAR), sintetizados por las enzimas PARP (PARP1 la enzima mayoritaria, PARP2 y tanquirasas). Esta vía de muerte se desencadena por la activación de PARP1 inducida por la rotura del ADN, que puede ser provocada por ROS, NOS o incluso citoquinas proinflamatorias como el TNF α . La poli (ADP-ribosil)ación (o parilación) de proteínas, incluyendo la de PARP1 a sí misma (auto-parilación), cerca del sitio de daño del ADN facilita el reclutamiento de proteínas efectoras que contribuyen a su reparación. Sin embargo, aunque es principalmente un mecanismo de supervivencia, en las células que experimentan un daño excesivo del ADN, una alta actividad de parilación puede causar este tipo de muerte necrótica regulada. La activación de PARP1 produce la formación de PAR para marcar el sitio dañado utilizando NAD⁺ y ATP, lo que conlleva una depleción de NAD⁺. Los PAR inducen la translocación del factor inductor de la apoptosis (AIF) desde la mitocondria al citoplasma, y aunque el mecanismo todavía no está muy claro, es posible que el agotamiento de NAD⁺ desencadene una despolarización de la membrana mitocondrial facilitando la liberación de AIF. AIF interactúa con el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en el citoplasma, que se transloca al núcleo y produce más fragmentación del ADN, dando lugar a necrosis de las células (Fricker, Tolkovsky y col. 2018, Robinson, Ganesan y col. 2019).

La autofagia es un proceso en el que componentes celulares como las macroproteínas o incluso orgánulos enteros, son secuestrados en lisosomas para su degradación. Los lisosomas son capaces de digerir estos sustratos, cuyos componentes pueden ser reciclados para crear nuevas estructuras celulares y/o orgánulos, o bien pueden ser procesados y utilizados como una fuente de energía. Normalmente es un proceso que funciona para prevenir la muerte celular, pero cuando es excesiva, puede suponer el efecto contrario. La autofagia puede ser iniciada por una variedad de factores estresantes, sobre todo por la privación de nutrientes (restricción calórica) o puede resultar de señales presentes durante la diferenciación celular y la embriogénesis o en la superficie de los orgánulos dañados. Se ha observado que la autofagia también está implicada en la respuesta inmunitaria, tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Puede degradar patógenos intracelulares, ayudar a la presentación de antígenos por

las proteínas MHC de clase II e iniciar el transporte de ácidos nucleicos virales reconocidos a través de los receptores tipo *Toll*. Aunque la autofagia se utiliza a menudo para reciclar componentes celulares, puede resultar en la destrucción de la célula y de esta manera se ha vinculado a la eliminación de células senescentes de tejidos envejecidos y la destrucción de lesiones neoplásicas (Fricker, Tolkovsky y col. 2018, D'Arcy 2019).

La oncosis es otro tipo de muerte celular que se caracteriza por el hinchamiento de la célula y sus orgánulos, junto con un aumento de la permeabilidad de la membrana. A medida que avanza el proceso, se produce un agotamiento de la energía celular, que resulta en un fallo de las bombas iónicas de la membrana plasmática. El resultado es una liberación de los restos celulares a los tejidos circundantes con el consecuente daño celular y desencadenando un proceso inflamatorio. La oncosis puede ser inducida por un shock puntual en las células o, en algunos casos, por infecciones por patógenos. Este tipo de muerte presenta una estrecha vinculación energética con la apoptosis; una célula sometida a apoptosis puede agotar su suministro de ATP y ser incapaz de completarla, dando lugar a una necrosis caracterizada por hinchamiento y lisis u oncosis; por el contrario si se inhibe la oncosis el estrés celular puede inducir apoptosis (D'Arcy 2019).

I.8.1. MECANISMOS DE MUERTE Y RETINOSIS PIGMENTARIA

A lo largo de los años se ha creído que el principal mecanismo de muerte de los bastones era la apoptosis, mientras que el mecanismo de muerte secundaria de los conos, permanecía sin estar claro (Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019). Con el tiempo se ha ido comprobando que las terapias dirigidas a frenar la apoptosis a través de la inhibición de las caspasas no conseguían una disminución efectiva de la muerte de los fotorreceptores. Esto ha hecho que se trabaje en encontrar otros mecanismos de muerte implicados en el proceso. Mientras que las evidencias siguen sugiriendo que la muerte de los bastones es dependiente de caspasas (Jomary, Neal y col. 2001, Hughes, Schlichtenbrede y col. 2004, Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019), actualmente ya existen diversos estudios que muestran una implicación de procesos necróticos, necroptóticos, activación de la enzima PARP, calpaínas o del inflammasoma NLRP3 en la muerte secundaria de los conos (Sanges, Comitato y col. 2006, Paquet-Durand, Silva y col. 2007, Murakami, Matsumoto y col. 2012, Sato, Li y col. 2013, Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019). Además, se ha descrito que la propia microglía de la retina, también sufre muerte por necroptosis, liberando citoquinas proinflamatorias que contribuyen al proceso de neuroinflamación, exacerbando el daño neural y la degeneración (Huang, Zhou y col. 2018).

El bloqueo farmacológico de diferentes moléculas implicadas en estos mecanismos de muerte como son, por ejemplo, las calpaínas (Sanges, Comitato y col. 2006, Paquet-Durand, Sanges y col. 2010), RIPK3 (Murakami, Matsumoto y col. 2012, Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019), RIPK1 (Sato, Li y col. 2013, Kim, Kim y col. 2017) o PARP (Jiao, Sahaboglu y col. 2016, Sahaboglu, Barth y col. 2016), reduce la degeneración de las células de la retina, lo que corrobora que, efectivamente, se están produciendo otros mecanismos de muerte independientes de caspasas.

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la muerte de las células de la retina, la diversidad de los resultados muestra una gran complejidad en los procesos degenerativos. El estudio de las vías de muerte secundarias podría ser una estrategia terapéutica muy prometedora, ya que se trataría de una terapia independiente de las mutaciones genéticas que causan la degeneración de los bastones. Además, también sería independiente de si la muerte celular es la causa o la consecuencia de la enfermedad (Athnasiou, Aguila y col. 2018, Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019).

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS

La RP es una enfermedad genética que se caracteriza por la pérdida progresiva de las células fotorreceptoras de la retina, pudiendo llevar a los pacientes a un estado de ceguera total. A pesar de su componente genético, diversos estudios muestran que la inflamación y el estrés oxidativo pueden exacerbar su progresión. Actualmente, no existen terapias efectivas que frenen o prevengan la enfermedad. Profundizar en el conocimiento de los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo subyacentes a la progresión de la enfermedad puede ayudar a encontrar posibles dianas terapéuticas, y diseñar terapias farmacológicas independientes del defecto genético.

En este trabajo partimos de las siguientes hipótesis:

1. El bloqueo de TNF α , utilizando ADA intraperitoneal, disminuye la degeneración retiniana en el modelo de ratón *rd10* solo hasta P18. Sin embargo, su administración localizada en el ojo a través de inyecciones intravítreas, tendría un efecto neuroprotector más duradero, con reducción de la dosis necesaria y evitaría los posibles efectos adversos de una administración sistémica.
2. El aumento de oxígeno o hiperoxia en la retina disminuiría el contenido proteico del factor de transcripción HIF-1 α y, por tanto, reduciría la expresión de determinados genes de supervivencia que podrían favorecer el retraso de la degeneración retiniana. La estabilización de este factor de transcripción, mediante la administración intraperitoneal de dimetiloxalil glicina (DMOG), un inhibidor de las prolil-hidroxilasas, podría retrasar el proceso de degeneración retiniana en el modelo de ratón *rd10*.
3. La disminución del estado antioxidante y el aumento de marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con RP se correlaciona con un peor campo visual. La administración oral de una mezcla de sustancias nutracéuticas antioxidantes, aumentaría la defensa antioxidante, reduciendo así el estrés oxidativo en el ojo, y retrasaría el avance de la enfermedad en pacientes con RP.

II.2. OBJETIVOS

En esta tesis se han llevado a cabo los siguientes objetivos:

1. Evaluación del efecto de la administración intravítrea de ADA sobre la degeneración retiniana en ratones *rd10*.
 - 1.1. Marcadores inflamatorios en retinas de ratón *rd10* de P13 a P60 y en humor acuoso de pacientes con RP.
 - 1.2. Mecanismos de muerte inducidos por TNF α en células de conos murinos, células 661W y efecto protector de ADA *in vitro*.
 - 1.3. Mecanismos de muerte implicados en la degeneración retiniana en ratones *rd10* a P23.
 - 1.4. Efecto de la administración intravítrea de ADA sobre la degeneración retiniana, inflamación y estrés oxidativo en ratones *rd10* a P23.

2. Evaluación del efecto de la administración intraperitoneal de DMOG sobre la estabilización de HIF-1 α y la degeneración retiniana en ratones *rd10*.
 - 2.1 Perfil temporal proteico de HIF-1 α y sus genes diana de P13 a P60.
 - 2.2 Efecto de la administración de DMOG sobre el contenido de HIF-1 α y sus genes diana en ratones *rd10* a P18 y P23.

3. Evaluación del efecto de la administración oral de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre el estado redox y función visual en pacientes con RP.
 - 3.1. Perfil de marcadores antioxidantes y oxidantes en sangre y humor acuoso de pacientes con RP y controles.
 - 3.2. Estado redox y función visual de pacientes con RP tras dos años de tratamiento oral con nutraceuticos.

**CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN INTRAVÍTREA DE ADA SOBRE LA
DEGENERACIÓN RETINIANA EN RATONES *rd10***

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVÍTREA DE ADA SOBRE LA DEGENERACIÓN RETINIANA EN RATONES *rd10*

En este estudio primero se evaluó la presencia de marcadores inflamatorios en humor acuoso de pacientes con RP y en retinas de ratón *rd10* a lo largo de la degeneración (perfil temporal de P13 a P60). A continuación, se evaluaron los mecanismos moleculares implicados en la muerte celular mediada por TNF α y el posible efecto neuroprotector del ADA en cultivos de células retinianas de ratón expuestas a TNF α exógeno o tunicamicina, un potente inductor de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). También se estudió el efecto de una única dosis intravítrea de ADA sobre la degeneración retiniana, los mecanismos de muerte implicados y la neuroinflamación en ratones *rd10* a P23.

III.1. METODOLOGÍA

III.1.1. Muestras de humor acuoso de pacientes con RP

Se obtuvieron muestras de humor acuoso de pacientes con RP y sujetos sin enfermedad retiniana operados de cataratas como se describe más detalladamente en el Capítulo V. Parte de estas muestras se empleó para la determinación de citoquinas empleando la tecnología LUMINEX.

III.1.2. Cultivos celulares

Utilizamos la línea celular 661W para la realización de los experimentos *in vitro*. Se trata de fotorreceptores de ratón inmortalizados, que nos fueron cedidos por el Dr. Muayyad Al-Ubaidi (Health Sciences Center, Universidad de Oklahoma). Las células se cultivaron en medio DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), suplementado con suero bovino fetal (SBF; Biowest, Labclincs, Barcelona, España), 1U/ml de penicilina/estreptomicina (Biowest, Labclincs, Barcelona, España) y 0,004% β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. Las células se tripsinizaron cada dos o tres días. Para los ensayos de citotoxicidad, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 100000 células/ml. Para los ensayos de expresión génica, análisis de proteínas y actividades enzimáticas, las células se sembraron en placas de seis pocillos a una concentración de 150000 células/ml.

Las células 661W se expusieron a diferentes concentraciones de agentes citotóxicos: TNF α (desde 0,05 a 200 ng/ml) o tunicamicina (desde 0,01 hasta 10 μ g/ml) durante 24 horas. La

tunicamicina genera estrés en RE y aumenta la producción de TNF α (Rana, Kotla y col. 2017). Se probaron diferentes concentraciones de ADA (desde 0,1 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$) o de un inhibidor de la caspasa 8, el Z-IETD-FMK (10, 20 y 50 μM) para evaluar su posible efecto protector frente a los agentes citotóxicos. Una vez seleccionadas las concentraciones, las células se pretrataron con ADA (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$), IETD-FMK (20 μM) o su vehículo dimetilsulfóxido (DMSO), dos horas antes de la estimulación con TNF α o tunicamicina. Veinticuatro horas después, las células se recogieron para realizar ensayos de expresión génica, contenido de proteínas (ELISA o Western Blot) y actividades enzimáticas de la caspasa 1 y 3. Se realizaron seis experimentos para cada determinación.

III.1.3. Animales y tratamiento

Como modelo de RP autosómica recesiva utilizamos el ratón *rd10* (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME, EEUU). Como cepa control utilizamos el ratón *C57Bl6*, ya que tiene el mismo fondo genético que el ratón *rd10*. Los ratones se estabularon siguiendo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura y humedad controlada y comida y agua *ad libitum*; se mantuvieron en racks ventilados con una iluminación constante de 115 ± 7 lux (95% CI: 98–131), ya que variaciones en este aspecto pueden provocar cambios en el proceso de degeneración de la retina, en el animalario del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS-La Fe) de Valencia. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a la legislación de la UE para la protección de animales de experimentación (*European Union Directive 2010/63/EU*). Todos los procedimientos animales y protocolos fueron aprobados (A1432043623509) y monitorizados por el comité de ética en Investigación del IIS-La Fe y posteriormente por la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación (2015/VSC/PEA/00166 y 2019/VSC/PEA/0022 tipo 2). Se utilizaron seis u ocho animales por grupo de tratamiento para cada determinación (histología, Western Blot, expresión génica, y actividad enzimática de las caspasas).

Diferentes estudios muestran que la inyección intravítrea de ADA (0,2; 0,375 y 0,5 mg/ml) en 4 ml de humor vítreo, es segura en humanos (Wu, Arevalo y col. 2013, Leal, Rodrigues y col. 2018) (28,29). Para seleccionar la máxima concentración de ADA que podíamos pinchar a los ratones, aplicamos una fórmula de conversión para calcular la dosis equivalente entre humanos (DEH) y ratones ($\text{DEH} = \text{NOAEL} \cdot \text{Km ratio}$ (factor de conversión para ratón); NOAEL: *Non-Observed Adverse Effect Level*, o dosis en la que no se observan efectos adversos en los animales) siendo en nuestro caso: $4,61 \text{ mg/ml} = 0,375 \text{ mg/ml} \cdot 12,3$ (Nair y Jacob 2016). Así, para seleccionar la mejor dosis efectiva de ADA que previniese la pérdida de células fotorreceptoras, pinchamos diferentes concentraciones de ADA de manera intravítrea a los ratones

(concentraciones finales en el humor vítreo: 0,125; 0,25; 0,375; 4,61 mg/ml) al día P12. Las dosis de ADA se eligieron basándonos en estudios previos con explantes de retina porcina y los datos farmacocinéticos existentes en humanos para otras enfermedades oculares (Sears, Hoppe y col. 2008, Trichonas, Lee y col. 2013). Los ratones no presentaron aparentemente efectos secundarios tras las inyecciones intravítreas.

Las inyecciones de ADA se realizaron solo en el ojo izquierdo, utilizando el ojo derecho de cada ratón como control, e inyectando en él el mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M (Biowest, Labclincs, Barcelona, España) (vehículo en el que se diluye el ADA), anestesiando a los ratones con isofluorano (AbbVie, Madrid, España). Además, utilizamos ratones *rd10* sin ningún tipo de tratamiento para estar seguros de que los hallazgos obtenidos en los ojos tratados con PBS son similares a los obtenidos en los ojos no tratados. Las pupilas se dilataron con una gota de tropicamida tópica (Alcon, Geneva, Suiza) y se inyectó PBS o ADA a las diferentes concentraciones en el humor vítreo utilizando una jeringa Hamilton (33G; Hamilton, Bonaduz, Suiza). El volumen final inyectado en el ojo de los ratones fue de 0,5 μ l. Después de la inyección se les administró tópicamente una gota de solución oftálmica de tobramicina (Alcon, Geneva, Suiza), para reducir las posibles infecciones. Para evaluar los resultados, los ratones fueron sacrificados a P23 por dislocación cervical. Los ojos fueron rápidamente enucleados y procesados de acuerdo a la técnica a realizar, según se describe más adelante.

Para las determinaciones bioquímicas, enzimáticas y los ensayos de expresión génica, las retinas se extrajeron de los globos oculares, se introdujeron rápidamente en el tampón adecuado para cada ensayo y se conservaron a -80°C.

III.1.4. Multiplex ELISA para la medida de citoquinas en humor acuoso

Se emplearon entre 25 y 50 μ l de humor acuoso de 10 controles y de 33 pacientes con RP para la determinación de las citoquinas IFN- γ ; IL-1 β ; IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; IL-12p70; IL-17A y TNF α con el kit de alta sensibilidad ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (*High Sensitivity 9-Plex Human ProcartaPlex™ Panel*, Invitogen, Life Technologies, Madrid, España) ensayos multiplex con tecnología Luminex, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de inmunoanálisis basados en la tecnología LumineX xMAP (obtención de perfiles multianálisis) que permiten la cuantificación y detección simultánea de diferentes proteínas, en este caso citoquinas inflamatorias. La plataforma utilizada para la detección fue MAGPIX (IIS La Fe, Valencia, España). Produce resultados comparables a los ensayos ELISA pero utiliza una combinación de bolas magnéticas y electroquimioluminiscencia, consiguiéndose una técnica más rápida y eficiente

(Leng, McElhane y col. 2008). Los resultados se expresaron en picogramos por ml de muestra (pg/ml).

III.1.5. Actividad de la enzima PARP

Tras 24 horas de tratamiento, las células se recogieron en 100 μ l de tampón de lisis (0.5 M de NaCl, 100 mM de Tris-Cl [pH 8.0], 2% Triton-X-100, y 200 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. La cantidad total de proteína en los lisados se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). El ensayo consiste en una primera reacción de reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} en un ambiente alcalino, denominada reacción de Biuret. A continuación, el BCA reacciona con los iones Cu^{+} formando un complejo de color púrpura que se puede detectar leyendo la absorbancia a 562 nm. La absorbancia aumenta linealmente al aumentar la concentración de proteínas en un amplio rango de trabajo (20-2000 μ g/ml).

La actividad de la enzima PARP se determinó utilizando un kit comercial (Trevigen Inc., Gaithersburg, Maryland, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un ensayo tipo ELISA, que detecta las poli-ADP-ribosas biotiniladas depositadas por la enzima PARP-1 sobre histonas inmovilizadas en un formato de placa 96 pocillos. La adición de estreptavidina (proteína de unión a la biotina) conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y un sustrato de HRP colorimétrico, produce un producto coloreado cuya absorbancia a 450 nm se leyó con un lector de placas Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Livingston, Reino Unido). La absorbancia se correlaciona con la actividad de PARP-1. La actividad celular de PARP se expresa en unidades por mg de proteína (U/mg proteína). Cada experimento se repitió al menos cuatro veces, contando con tres réplicas para cada tratamiento.

III.1.6. Western Blot

Las células se recogieron en 100 μ l de tampón de lisis (50 mM de NaCl; 50 mM de Tris-Cl [pH 7.5]; 0,5 de mM EGTA; 1 mM EDTA; 1% Triton-X-100; 0,1% SDS y una mezcla de inhibidores de proteasas (COMPLETE, Roche, Basel, Suiza). Se incubaron en hielo durante 5 minutos. La cantidad de proteína de los lisados celulares se determinó mediante el método BCA. Se añadió β -mercaptoetanol (5%) y azul de bromofenol (1% m/v) a las muestras, y se hirvieron durante 5 minutos. A continuación se llevó a cabo una electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 8% a 100 mV y 40 mA durante dos horas, seguido de una transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 1,3 V durante 30 minutos utilizando el sistema Trans-Blot Turbo (Biorad, California, EEUU). Las membranas se bloquearon con albúmina sérica

bonina (BSA) al 3% en tampón TBS-T (10 mM de Tris-HCl [pH 8.0]; 150 mM de NaCl y 0,05% Tween) y se incubaron con los anticuerpos primarios para caspasa 8 (1:1000, #9429, Cell Signaling Technology, Leiden, Holanda), RIPK1 (1:2000, #610458, Becton Dickinson, Madrid, España), RIPK3 (1:1000, #2283, Fort Collins, USA), NLRP3 (1:500, #ab91413, Abcam, Cambridge, Reino Unido), o β -actina (1:2000, #A2228, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante toda la noche. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron en 3% BSA-TBS-T con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (conejo o ratón, 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) una hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, y se incubaron con el tampón de la fosfatasa alcalina (100 mM de Tris pH 9,5; 100 mM de NaCl y 5 mM $MgCl_2$) que contenía el sustrato de la enzima (BioRad sustratos remezclados: 6,6 μ l NBT/ml y 3,3 μ l BCIP/ml). Las reacciones colorimétricas que tuvieron lugar se detuvieron con agua destilada. Los inmunoblots fueron cuantificados por densitometría y normalizados con la β -actina utilizando el software Alphamager 2200 (Alpha Innotec, Alemania). Se utilizaron al menos seis cultivos diferentes para cada tratamiento en los experimentos *in vitro*, y entre seis y ocho retinas para cada grupo de tratamiento.

III.1.7. Extracción de ARN total y síntesis de cADN

El ARN total de los lisados de células 661W y de las retinas congeladas se extrajo utilizando el kit comercial RNeasyMiniKit (Qiagen, Hilden, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ARN total y utilizando el kit comercial GeneAmp Gold ARN PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), obtuvimos cADN mediante RT-PCR, partiendo de una cantidad inicial de 1 μ g de ARN. Se utilizaron seis cultivos diferentes para cada tratamiento en los experimentos *in vitro*, y entre seis y ocho retinas para cada grupo de tratamiento y para cada edad en el perfil temporal de inflamación.

III.1.8. PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión relativa de los genes de RIPK1, RIPK3, $TNF\alpha$, TNFR1, COX2, IL-1 β , IL-18, IL-6, LIF e iNOS se midió en células 661W, y/o en retinas de ratón de P15 a P60 (incluido P23) mediante PCR en tiempo real, utilizando la plataforma ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), y las sondas TaqMan específicas para esos genes: Mm00436354_m1 (RIPK1), Mm00444947_m1 (RIPK3), Mm00443260_g1 ($TNF\alpha$), Mm00441883_g1 (TNFR1), Mm03294838_g1 (COX2), Mm00434228_m1 (IL-1 β), Mm00434226_m1 (IL-18), Mm00446190_m1 (IL6) ; Mm00434762_g1 (LIF), y Mm00440502_m1 (iNOS) [(TaqMan Gene

Expression Assay, Applied Biosystems)]. El gen de la β 2-microglobulina (β 2m) [(Mm00437762_m1; Applied Biosystems)] se utilizó como control endógeno en las muestras.

La PCR en tiempo real se realizó siguiendo el siguiente programa: un ciclo de dos minutos a 50°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C de desnaturalización, 40 ciclos de desnaturalización de 15 segundos a 95°C y de 60 segundos de anillamiento a 60°C. La expresión relativa de cada gen se normalizó con el gen endógeno y los valores de las retinas control o las células 661W control se normalizaron a uno para determinar cambios en la expresión génica de las retinas de los ratones *rd10* o en las células 661W tratadas con tunicamicina con y sin ADA.

III.1.9. Ensayo actividad caspasa

Para la determinación de las actividades de las caspasas 1 y 3, los homogeneizados se centrifugaron a 10000 g y 4°C durante un minuto. El sobrenadante se recogió para medir la cantidad de proteína total mediante el método BCA. La actividad de las enzimas se determinó utilizando un kit comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante (Biovision, Inc., Milpitas, CA, EEUU). Se trata de ensayos colorimétricos que se basan en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato marcado YVAD-pNA o DEVD-pNA, reconocidos por la caspasa 1 y 3 respectivamente. La emisión de luz de pNA se cuantifica midiendo la absorbancia a 405 nm. La comparación de la absorbancia de pNA a partir de una muestra con un control permite determinar el aumento de veces en la actividad de las caspasas.

Las células 661W o las retinas previamente congeladas se lisaron en el tampón de lisis suministrado con los kits. Los lisados tanto de células como de retina, se incubaron con los sustratos de la caspasa 1 y 3, durante dos horas a 37°C. Seguidamente se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm en el lector de placas Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Livingston, Reino Unido). Los incrementos en las actividades de la caspasa 1 y 3 se determinaron comparando los resultados obtenidos en las células y ojos tratados con células y ojos no tratados. Se utilizaron al menos seis cultivos diferentes para cada tratamiento en los experimentos *in vitro* y entre seis y ocho retinas para cada grupo de tratamiento.

III.1.10. Ensayos de viabilidad celular

Ensayo MTT: las células 661W se dejaron crecer hasta alcanzar un 80% de confluencia y se trataron con diferentes concentraciones de tunicamicina, TNF α , z-ETD-FMK y/o ADA como se ha descrito anteriormente. Para evaluar la viabilidad celular, se añadieron al medio de cultivo 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich, San Luis,

Estados Unidos) a 5 mg/ml y se incubó a 37°C durante dos horas. La succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, reduce el MMT a un cristal de formazán de color azul oscuro. El medio de cultivo se eliminó y el precipitado de formazán se resuspendió en 100 µL de DMSO. La absorbancia de las muestras se midió a 550 nm en el lector de placas Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Livingston, Reino Unido). La viabilidad celular se expresa en porcentaje con respecto a las células control (100% de viabilidad). Cada experimento se repitió cuatro veces, con 24 réplicas para cada tratamiento.

Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH): la LDH es una enzima citosólica estable que se libera al medio de cultivo tras producirse un daño celular. La liberación de LDH al medio de cultivo de las células 661W se evaluó utilizando el kit de citotoxicidad deCyQUANT™ LDH (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó tampón de lisis para determinar la cantidad máxima de LDH presente en las células. Posteriormente, se midió la absorbancia de todas las muestras a dos longitudes de onda de 490 nm y 690 nm (absorbancia de fondo) utilizando el lector de microplacas Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Livingston, Reino Unido). El porcentaje de citotoxicidad se calculó utilizando la siguiente fórmula: Citotoxicidad (%) = 100 [(actividad LDH células tratadas - actividad espontánea LDH (células no tratadas))/(actividad máxima de LDH - actividad espontánea LDH (células no tratadas))]. Cada experimento se realizó cuatro veces, con 24 réplicas para cada tratamiento.

Citometría de flujo: se utilizó Anexina V (AV)-Fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (AV-FITC) (Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Alemania) combinada con yoduro de propidio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) para detectar la muerte en las células 661W. La AV tiene gran afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana celular. Durante las primeras etapas de la apoptosis, la fosfatidilserina (PS) queda expuesta en la superficie de las células. Al conjugar la AV con un fluorocromo se pueden identificar las células apoptóticas una vez que esta se ha unido a los residuos de PS. Además, combinada con otros fluorocromos como el IP, un potente indicador de muerte celular, permite la diferenciación entre poblaciones vivas, apoptóticas tempranas y tardías y necróticas.

Las células se recogieron y se centrifugaron a 300 g durante cinco minutos. Después de lavar el pellet tres veces con PBS en frío, se resuspendió en 100 µl de tampón de unión (10 mM HEPES, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂). Se añadieron 0,5 µl de AV-FITC y 0,5 µL de IP (5 µg/ml) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se añadieron 200 µL más de tampón de unión. Se incluyeron tres controles para cada experimento:

1) doble negativo (sin AV-FITC ni PI); 2) positivo para AV-FITC (sin PI); 3) positivo para PI (sin AV-FITC). Se realizó un análisis de las muestras mediante citometría de flujo utilizando el equipo Cytotflex S (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, IN, Estados Unidos). La fluorescencia de la AV-FITC (FL1) se recogió a través de un filtro paso de banda 525/40, y la fluorescencia del IP (FL11) se recogió a través de un filtro paso de banda 610/20. La adquisición de datos se realizó utilizando el programa Cytexpert 2.1 (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, IN, EEUU). Se detectaron cuatro tipos de poblaciones celulares (%) en un gráfico de puntos de AV-FITC/IP: células vivas (AV-/PI-), células apoptóticas tempranas (AV+/PI-), células apoptóticas tardías o necróticas (AV+/PI+), y células necróticas (AV-/PI+). Cada experimento se realizó cuatro veces con 24 réplicas para cada tratamiento.

III.1.11. ELISA para la medida de TNF α

La concentración extracelular de TNF α se cuantificó en el medio de cultivo de las células 661W expuestas a tunicamicina durante 24 horas, utilizando un kit ELISA de Diaclone (Diaclone, Besançon, France), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de TNF α se expresa en picogramos por ml de proteína (pg/ml). Se utilizaron seis cultivos celulares diferentes por tratamiento.

III.1.12. Ensayo TUNEL e histología de la retina

Para obtener secciones de retina, los ojos se enuclearon y se sumergieron inmediatamente en paraformaldehído filtrado al 4%, durante dos horas. A continuación, los ojos se crioprotegieron mediante un gradiente ascendente de sacarosa (15-20-30%), se embebieron y congelaron en medio de congelación y se obtuvieron secciones 10 μ m utilizando un criostato (CM1900 Cryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Se analizaron ocho retinas para cada grupo de tratamiento.

Para evaluar la muerte celular, utilizamos la técnica de TUNEL (*TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*) que se basa en la detección y marcaje con nucleótidos modificados de los extremos 3'-OH libres del ADN, generados por la fragmentación del mismo, y que se encuentran típicamente en los núcleos apoptóticos de las células. La enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) cataliza la adición de nucleótidos trifosfato a los extremos de 3'-OH del ADN de simple o doble cadena. Los nucleótidos incorporados forman un oligómero compuesto de digoxigenina que es reconocido por un anticuerpo anti-digoxigenina, marcado con fluorescencia (rodamina).

Para medir el grosor y el número de núcleos celulares de la ONL, las criosecciones se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI), un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol y tiñe el ADN de las células, es decir, marca los núcleos celulares.

En la criosecciones de retina también se realizaron diferentes inmunofluorescencias. Para ello, el tejido se post-fijó en paraformaldehído filtrado al 4% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron pretratadas con tampón citrato a pH 6,0 para la recuperación de epítomos e incubadas en tampón de bloqueo (5% de suero de cabra, 1% de BSA y 0,25% de Tritón X-100) durante una hora. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos primarios anti-Iba1 (1:300, #019-19741, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón) como marcador de microglía, anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (1:400, #G3893, Sigma-Aldrich, Madrid, España) como marcador de glía de Müller, o anti-PAR (1:200, #ALX-804-220, Enzo Life Science, Madrid, España) como marcador indirecto de la actividad PARP, durante toda la noche a 4°C. A continuación, las criosecciones se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (ratón o conejo), conjugado con un fluoróforo (Alexa Fluor 488 o 647 (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España)) durante una hora a temperatura ambiente. Las criosecciones se contratiñeron con DAPI y se montaron con Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EEUU). Se analizaron al menos ocho retinas izquierdas y derechas para cada grupo.

Para analizar la estructura de la retina, los ojos fijados se embebieron en parafina y se obtuvieron secciones de 5 µm. Estas secciones se incubaron durante una hora a 60°C, se desparafinaron con xileno y se rehidrataron mediante un gradiente descendente de etanol. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina utilizando el autostainer Leica ST5010 (Leica, Nussloch, Alemania).

III.1.13. Microscopía y cuantificación

Las secciones de retina se examinaron utilizando un microscopio confocal (40X magnificación, Leica TCS SP5 Confocal microscope; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se analizaron utilizando los software de imagen Leica Microsystems LAS AF lite e Image J. El grosor y el número de filas de la ONL, el número de células TUNEL, PAR e Iba-1 positivas y la intensidad de fluorescencia de GFAP, se cuantificaron utilizando el software ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EEUU).

La medida del grosor de la ONL se normalizó con el grosor de la INL, para evitar el sesgo derivado del ángulo de corte. Debido a que el grosor de la ONL y el proceso degenerativo en el

modelo de ratón *rd10* varían entre las diferentes zonas de la retina, realizamos varias mediciones desde el extremo nasal hasta el temporal de la retina para cada ratón. La relación del grosor de la ONL normalizada se define como espesor ONL/espesor INL. Se analizaron ocho retinas para cada grupo experimental. El número de células TUNEL positivas se calculó como la relación entre el número de células TUNEL positivas en la ONL y la relación de grosor de la ONL normalizada de cada sección.

Para evaluar la activación de la microglía, medimos el índice de migración (IM), definido como el número de células Iba-1 positivas corregido de acuerdo a la capa de la retina en la que se encuentren ($I.M = [\sum (n^{\circ} \text{ células Iba1}^{+} \cdot \text{factor capa})] / n^{\circ} \text{ células Iba1}^{+} \text{ totales}$). El factor de corrección utilizado fue 1 para la ONL; 0,5 para la OPL y 0,25 para la INL.

La intensidad de fluorescencia corregida (FC) de GFAP se determinó restando la intensidad de fluorescencia del fondo a la intensidad de fluorescencia presente en el área total de la retina ($FC = (\text{área} \cdot \text{intensidad fluorescencia}) \text{ GFAP} - (\text{área} \cdot \text{intensidad fluorescencia}) \text{ fondo}$). El número de células TUNEL positivas, las células PAR positivas, el IM de la microglía y la intensidad de fluorescencia de GFAP se cuantificaron en cuatro zonas no adyacentes de cada sección de retina, en ocho retinas para cada grupo de tratamiento.

III.1.14. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad 8.0 (Prism; GraphPad Software, Inc., San Diego, EEUU). La normalidad o distribución normal de los datos se analizó utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. La viabilidad celular se determinó utilizando ANOVA y contraste de Dunnett para comparaciones múltiples. Las comparaciones entre los ratones control y los *rd10* se realizaron con la prueba de la t de Student para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney, dependiendo de la distribución de los datos (paramétrico o no paramétrico). Las comparaciones entre los ojos tratados con ADA y los tratados con PBS se hicieron con la prueba de la t de Student para muestras emparejadas o con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Se utilizaron entre seis y ocho animales por grupo para cada análisis. Un valor p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los datos se representan utilizando el software GraphPad 8.0.

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Perfil temporal de factores inflamatorios en los diferentes estadios de la degeneración retiniana en ratones *rd10*

A pesar de que la RP comprende un grupo de desórdenes genéticos de la retina, la inflamación contribuye, en gran medida, a la progresión de la patogénesis. Por ello, evaluamos la expresión génica de algunos marcadores inflamatorios (IL-6, iNOS, LIF, y TNF α) tanto en retinas de ratones control como de ratones *rd10* desde P13 hasta P60 (Figura 9). El análisis reveló una sobreexpresión de IL-6, LIF, y TNF α antes y durante el pico máximo de muerte de células fotorreceptoras (P13-P18).

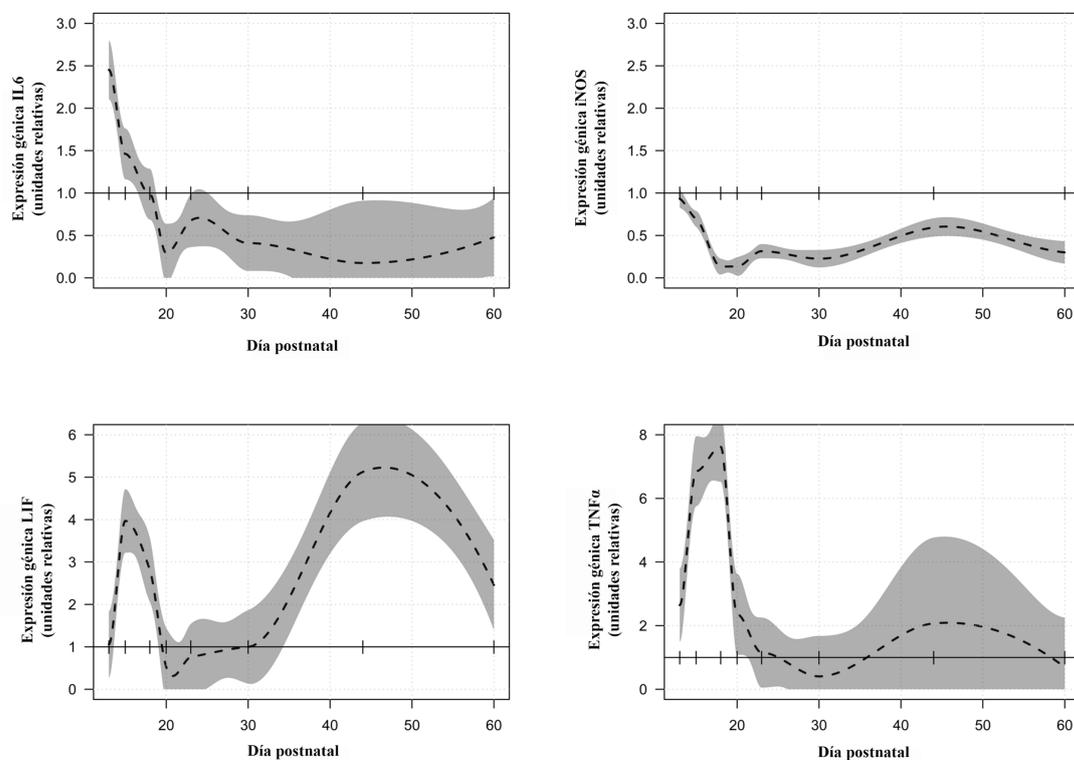


Figura 9. Perfil temporal de expresión de los marcadores inflamatorios IL6, iNOS, LIF y TNF α a diferentes días postnatales en retinas control y retinas *rd10*. La relación entre días y valores de expresión se ha suavizado mediante regresión local (LOESS). La región sombreada corresponde a un intervalo de confianza de 95% para la línea de regresión. La línea horizontal representa los valores de expresión de las retinas control normalizados a uno. Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo de edad. GLS. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

Después de este periodo, estos marcadores inflamatorios disminuyen por debajo de los niveles observados en las retinas de los ratones control (P20-P30). A P44, se produce un ligero incremento de LIF y $TNF\alpha$. La expresión génica de iNOS permanece por debajo de los niveles control durante todo el proceso de degeneración retiniana, a excepción de P13 (Figura 9).

Como ya se ha comentado anteriormente, las situaciones patológicas en la retina inducen la activación de las células Müller (gliosis reactiva). Los resultados muestran que el contenido de GFAP está aumentado en la retina de los ratones *rd10* desde P18 hasta P60 con respecto a las retinas de los ratones control, encontrándose el valor máximo a P30 (Figura 10).

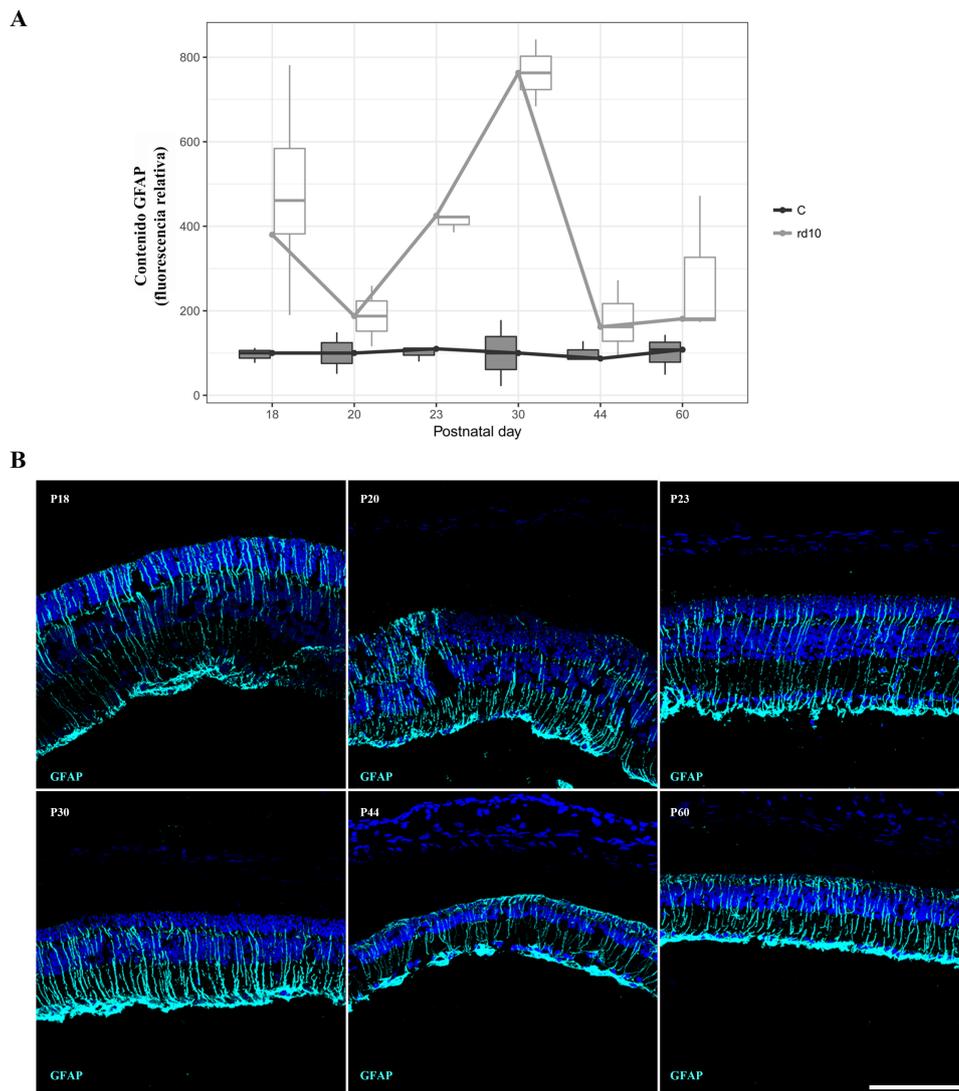


Figura 10. Progresión de la gliosis reactiva en retinas de ratones *rd10*. Cuantificación de la activación de la glía de Müller (intensidad de fluorescencia de GFAP) (A); tinciones de secciones de retina de ratones *rd10* representativas del marcaje de GFAP contrateñidas con DAPI a diferentes días postnatales (B). Para cada edad y grupo las cajas de los gráficos representan la mediana y el primer y tercer cuartil; las líneas representan la media de los grupos. Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo y edad. Prueba U de Mann-Whitney; $p < 0.001$. Barra de escala: 50 μ m. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

III.2.2. Los pacientes con RP tienen marcadores inflamatorios aumentados en humor acuoso.

En estudios anteriores mostramos un aumento de los niveles de TNF α e IL-6 en humor acuoso de 30 pacientes con RP (Martinez-Fernandez de la Camara, Olivares-Gonzalez y col. 2014). Basándonos en estos datos y los de otros autores realizamos la determinación de varias citoquinas inflamatorias en muestras de humor acuoso para observar si existían diferencias en el estado inflamatorio basal entre los pacientes y los sujetos control. En este caso empleamos la tecnología de LUMINEX. Utilizamos un ELISA Multiplex para determinar la concentración de diferentes citoquinas: IFN- γ ; IL-1 β ; IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; IL-12p70; IL-17A y TNF α . La mayoría de ellas no llegaron al límite de detección del kit, y solo pudimos determinar la IL-6, IL10 y TNF α . El análisis de los datos revela un ligero aumento de estas tres citoquinas en los pacientes de RP con respecto a los controles, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (Figura 11). Es posible que el método empleado en esta ocasión no haya sido tan sensible como el empleado anteriormente (Martinez-Fernandez de la Camara, Olivares-Gonzalez y col. 2014) pero apoyarían que la degeneración retiniana también va acompañada de un proceso inflamatorio.

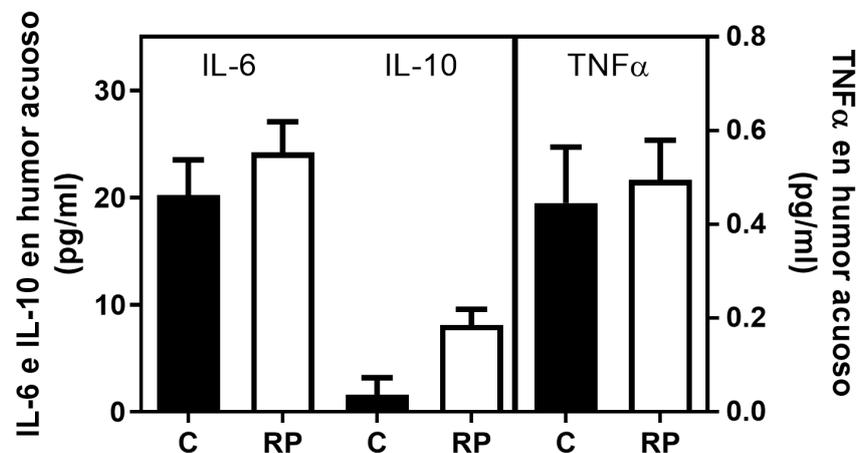


Figura 11. Marcadores de inflamación en humor acuoso del grupo control (C) y del grupo de pacientes con RP (RP) basalmente. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Las determinaciones se hicieron en al menos tres sujetos para el grupo control y diez para el grupo RP. Regresión lineal, * $p < 0,05$.

III.2.3. La exposición a TNF α induce la muerte en las células 661W a través de la activación de las caspasas 8 y 3. *In vitro*, el tratamiento con ADA previene la muerte celular dependiente de caspasas.

El aumento de TNF α parece contribuir a la muerte de las células fotorreceptoras en los ratones *rd10* (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018). Previamente hemos descrito que la inyección intraperitoneal de ADA reduce la degeneración retiniana en los ratones *rd10* a P18 (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). Decidimos evaluar el efecto de TNF α exógeno (directamente o inducido por tunicamicina) sobre células 661W y tras tratar con ADA para profundizar en los mecanismos que contribuyen a la muerte en células de retina. Para ello, incubamos las células 661W con una serie de concentraciones crecientes de ADA (de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$), tunicamicina (de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$), o TNF α (de 0 a 200 ng/ml) durante 24 horas. Ninguna de las concentraciones de ADA estudiadas presentó ningún efecto negativo sobre la actividad metabólica celular (ensayo MTT) (Figura 12A), por eso elegimos las dos concentraciones más altas ensayadas (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). Como se observa en la Figura 12B y 12C, la actividad metabólica celular se ve significativamente reducida tras la exposición a tunicamicina y TNF α de manera dosis-dependiente. La IC50 aproximada es 100 ng/ml para el TNF α y 10 $\mu\text{g/ml}$ para la tunicamicina. Por ello, seleccionamos estas concentraciones para evaluar el efecto del ADA en los mecanismos de muerte mediados por TNF α o tunicamicina. Asumimos que una disminución de la actividad metabólica celular se corresponde con una disminución de la viabilidad celular, tal y como se observa en otros estudios (Hwang, Kwon y col. 2016, Rana, Kotla y col. 2017) pero, además, corroboramos que el TNF α induce muerte celular mediante el análisis de la liberación de LDH (Figura 12C). Para cuantificar con mayor precisión el tipo de muerte en las células 661W y, corroborar los resultados del ensayo de liberación de LDH utilizamos citometría de flujo con tinción de AV y IP para identificar las células apoptóticas y necróticas, respectivamente. En las Figuras 12D y 12E podemos comprobar que el TNF α exógeno disminuye el número de células vivas (AV-/PI-) e incrementa el porcentaje de células apoptóticas tempranas (AV+/PI-) y células apoptóticas tardías o necróticas (AV+/PI+).

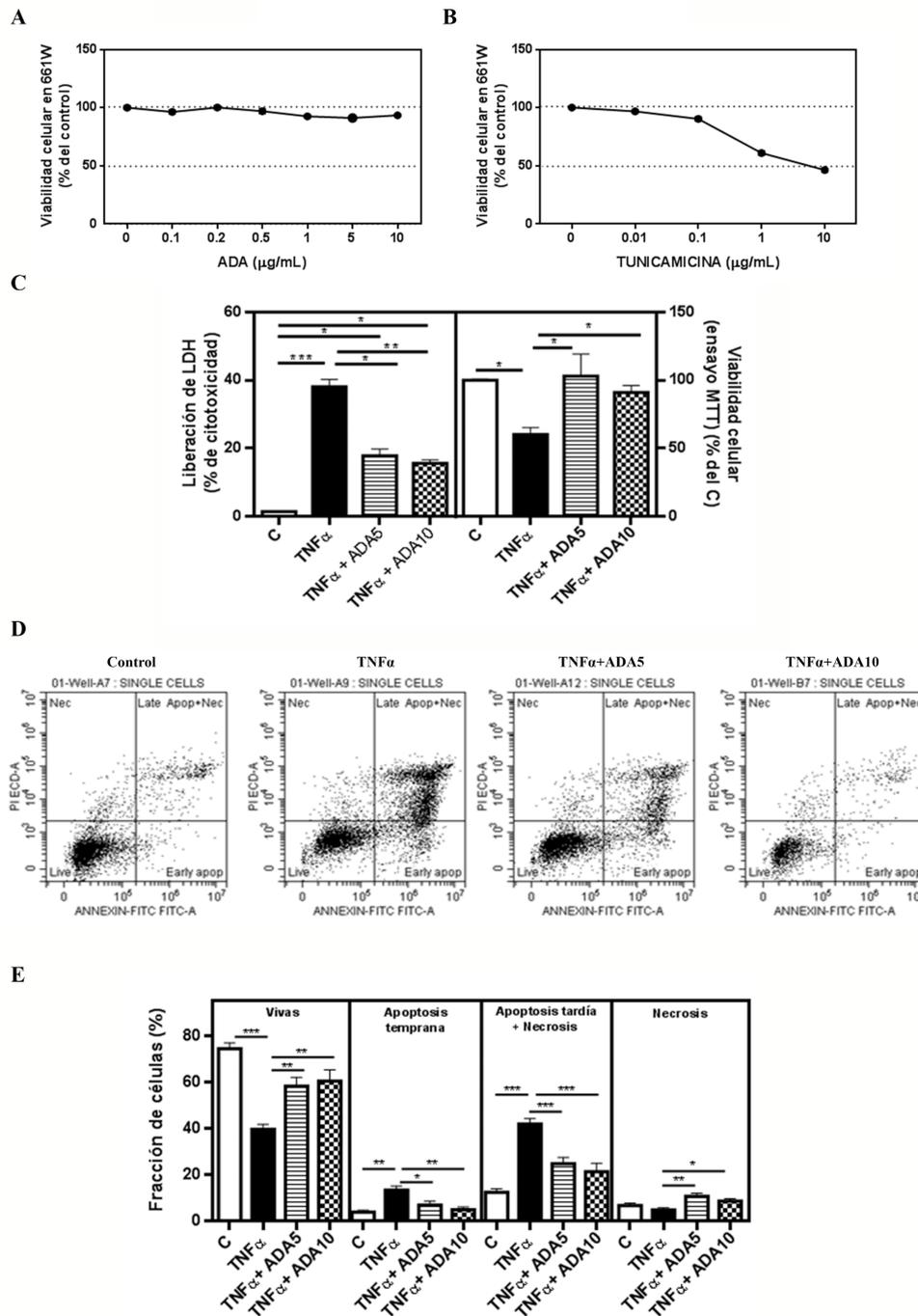


Figura 12. Estudio de toxicidad de TNFα y protección por Adalimumab en células 661W. Viabilidad celular tras el tratamiento con Adalimumab (A) y tunicamicina (B); efecto del Adalimumab sobre muerte celular y liberación de LDH inducidas por TNFα en células 661W (C); imagen representativa (D) y análisis de citometría de flujo (E) en células 661 W tratadas con TNFα exógeno y Adalimumab. Las células fueron tratadas con 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5 y 10 µg/ml de Adalimumab; con 0,01; 0,1; 1 y 10 µg/ml de tunicamicina o con 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 1; 10; 50; 100 y 200 ng/ml de TNFα durante 24h. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT, el ensayo de liberación de LDH y citometría de flujo. Se realizaron cuatro experimentos por concentración para los ensayos MTT en células tratadas con Adalimumab, ocho experimentos para los ensayos MTT en células tratadas con tunicamicina y cuatro experimentos para los ensayos MTT en células tratadas con Adalimumab y TNFα, los ensayos de liberación de LDH y los ensayos de citometría de flujo. Los datos representan la media ± el error estándar de la media (EEM). ANOVA y contraste de Dunnett para comparaciones múltiples, *p<0,05; **p<0,01; ***p = 0,0003; ****p<0,0001. 5 µg/ml de ADA: ADA5; 10 µg/ml de ADA: ADA10; 100 ng/ml de TNFα: TNFα.

Tras la exposición a TNF α , observamos un aumento en la actividad de la caspasa 3 y de los fragmentos intermedios p43/p41 de la caspasa 8 activada en los lisados de células 661W (Figura 13A, 13D y 13E). Por lo tanto, sugerimos que la muerte en las células 661W está asociada a la activación de las caspasas, suponiendo así mecanismos apoptóticos mediados por el TNF α exógeno.

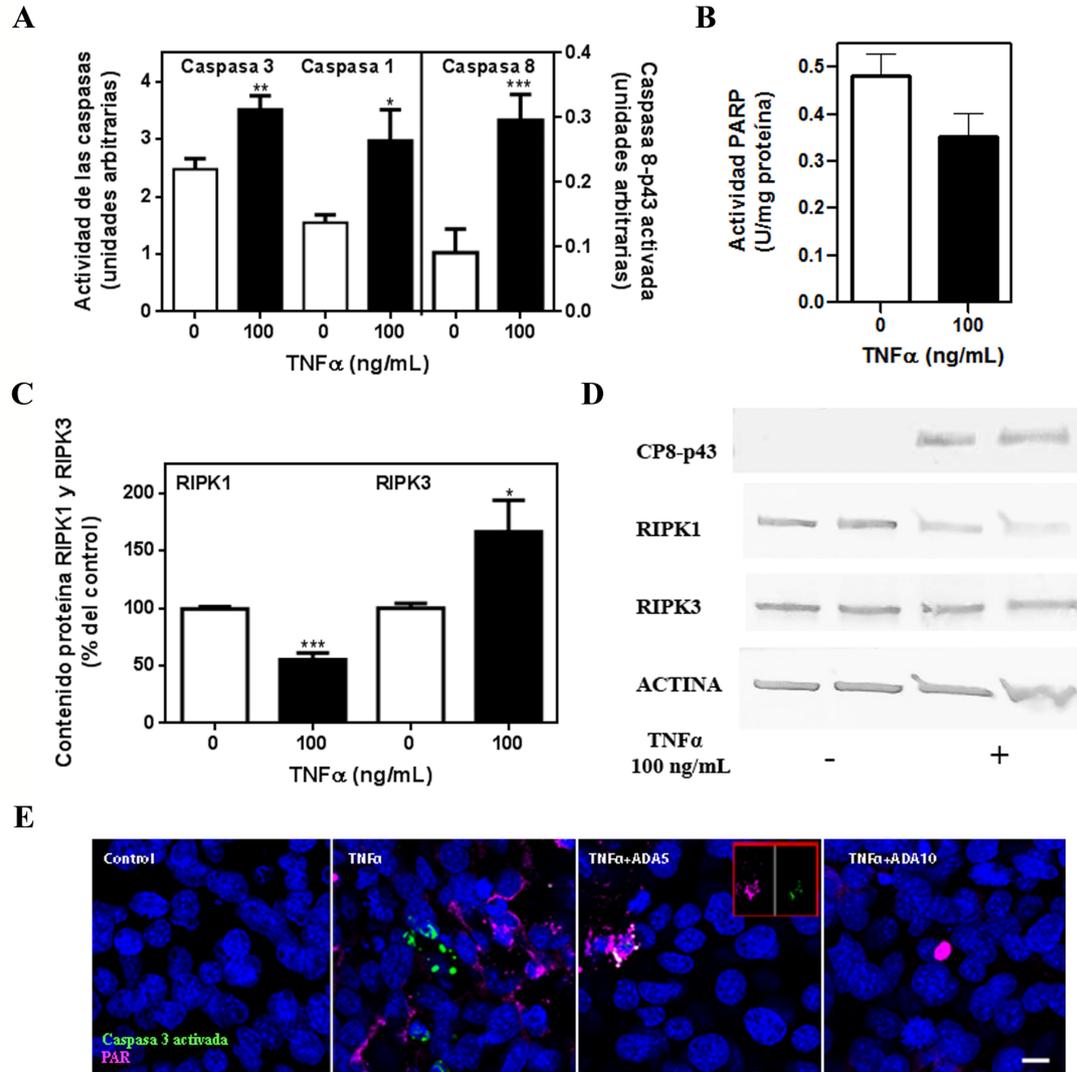


Figura 13. Efecto del TNF α a 100 ng/ml en los marcadores de muerte mediada por apoptosis (caspasa 3 y 8), necroptosis (RIPK1 y RIPK3) y parthanatos (PARP y PAR) en células 661W. Actividad de las caspasas 3 y 1 usando sustratos específicos y cuantificación por WB del fragmento intermedio de la caspasa 8, p43/p41 (A); actividad de la enzima PARP en lisados celulares (B) cuantificación por WB de las proteínas RIPK1 y RIPK3 (C); WB representativos de caspasa 8 activada, RIPK1 y RIPK3 (D); inmunofluorescencia de caspasa 3 activada y acumulación de polímeros de PAR (E). Las determinaciones se realizaron seis veces para la actividad de las caspasas, cinco para la determinación de PARP y PAR, y siete para los ensayos de WB. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de Mann-Whitney, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. La actina se muestra como control de carga. 100ng/ml de TNF α : TNF α . Barra de escala: 5 μ m; 100 ng/ml de TNF α : TNF α .

Además de la apoptosis, observamos que la muerte de los conos va acompañada de la activación de la caspasa 1, un incremento del 150% de la proteína RIPK3 y una disminución casi del 50% de RIPK1 (Figura 13A, 13C y 13D). Para evaluar la implicación directa de la caspasa 8 en la muerte celular inducida por $TNF\alpha$, las células 661W se preincubaron con Z-IETD-YMK (20 μM o 50 μM) durante dos horas, antes de añadir $TNF\alpha$ a una concentración de 100 ng/ml. Observamos que la inhibición de la caspasa 8 no previene de la muerte celular inducida por $TNF\alpha$ (Figura 14A y 14B). Además, el tratamiento con Z-IETD-YMK tampoco normaliza la actividad de la caspasa 3 en las células expuestas a $TNF\alpha$ exógeno (Figura 14C).

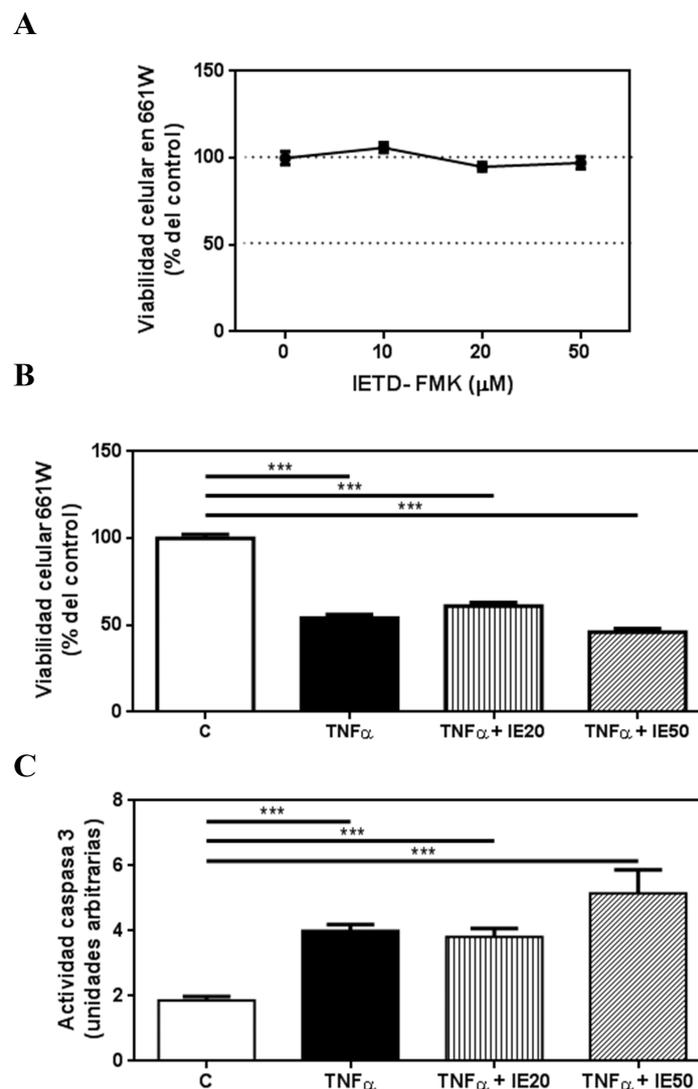


Figura 14. Efecto del inhibidor de la caspasa 8, IETD-FMK sobre la muerte inducida por $TNF\alpha$ en células 661W. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT (A, B); la actividad de las caspasas 3 y 1 se determinó utilizando sustratos específicos (C); las células se trataron con 10, 20, 50 μM de IETD-FMK o con 100 ng/ml $TNF\alpha$ combinado con 20 o 50 μM de IETD-FMK durante 24 horas. Los experimentos se realizaron cinco veces para cada una de las determinaciones. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn *** $p < 0,001$. 20 μM IETD-FMK: IE20; 50 μM IETD-FMK: IE50; 100ng/ml de $TNF\alpha$: $TNF\alpha$.

La activación de PARP es un marcador de muerte celular inducida por estrés oxidativo (Shen y Codogno 2012). Para determinar el efecto del TNF α exógeno sobre la enzima PARP, medimos la actividad de la enzima y la formación de polímeros de PAR mediante inmunofluorescencia. En los lisados de células 661W la actividad PARP tiende a disminuir en las células tratadas con TNF α comparado con las células 661W no tratadas (Figura 13B). Sin embargo, detectamos mediante inmunofluorescencia un aumento en la formación de polímeros de PAR en las células tratadas con TNF α (Figura 13E y 15K). Además, la exposición a TNF α provoca una disminución de la expresión génica del TNFR1 comparándolas con las células control, tras 24 horas de tratamiento (Figura 15A).

El pretratamiento durante dos horas con 5 o 10 μ g/ml de ADA (ADA5 o ADA10) antes de exponer las células a TNF α exógeno, previene significativamente de la muerte celular (Figura 15B). El tratamiento con ADA reduce significativamente la actividad de las caspasas 3 y 1 (Figura 15C, 15E, 15J y 13E), pero no normaliza la actividad de la caspasa 8 en las células tratadas con TNF α (Figura 15D). Con respecto a las proteínas RIPK1 y RIPK3, el tratamiento con ADA restaura el contenido de proteína de RIPK1, pero no tiene efecto sobre el aumento de expresión génica de RIPK3 inducido por TNF α (Figura 15G, 15H y 15I). La actividad PARP y la acumulación de polímeros de PAR tienden a normalizarse en las células tras el tratamiento con ADA, respectivamente (Figura 15F, 15K y 13E). Además, ADA10 previene significativamente de la reducción de la expresión del TNFR1 inducida por TNF α (Figura 15A).

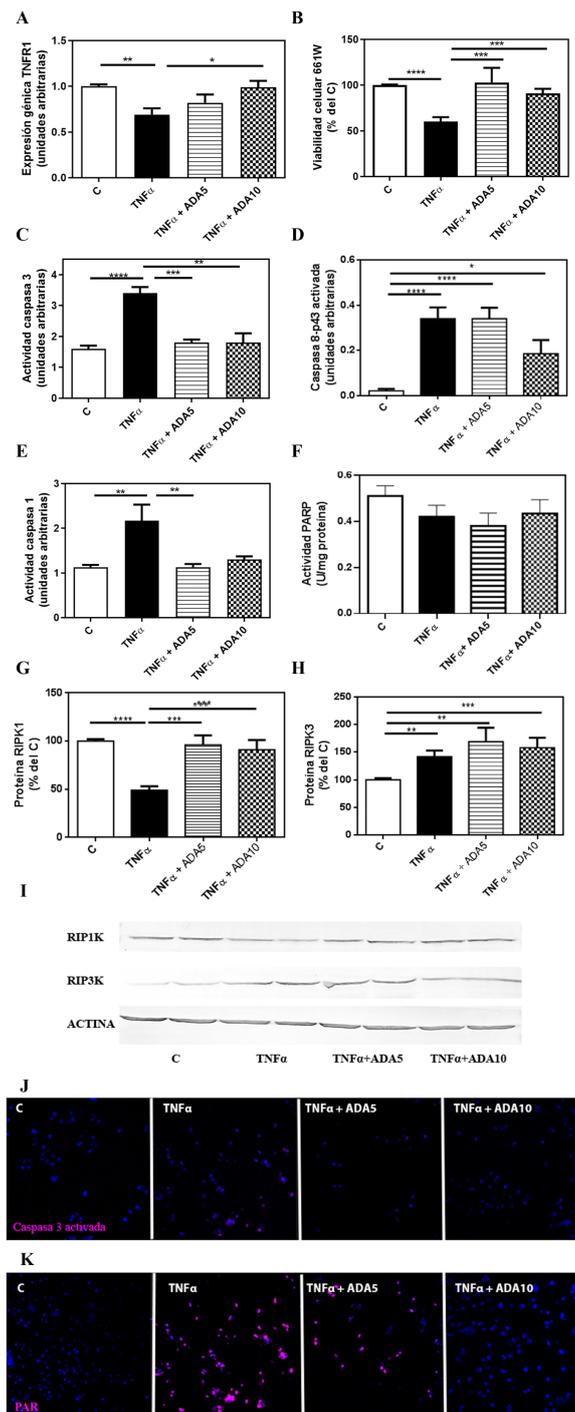


Figura 15. Efecto del Adalimumab sobre la muerte celular inducida por TNF α en células 661W. Expresión génica del TNFR1 (A); viabilidad celular mediante ensayo MTT (B); actividad de las caspasa 3 y 1 usando sustratos específicos y cuantificación por WB del fragmento intermedio de la caspasa 8, p43/p41 (C, D, E); actividad de la enzima PARP en lisados celulares (F); cuantificación por WB de las proteínas RIPK1 y RIPK3 (G, H); WB representativos de RIPK1 y RIPK3 (I); inmunofluorescencia de caspasa 3 activada y acumulación de polímeros de PAR (J, K). Cada experimento se realizó seis veces para cada una de las determinaciones. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). ANOVA de una sola vía, prueba de Tukey para múltiples comparaciones $p < 0,05$ solo para viabilidad celular. Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn para el resto de análisis, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. La actina se muestra como control de carga. Barra de escala: 5 μ m; 5 μ g/ml de ADA: ADA5; 10 μ g/ml de ADA: ADA10; 100 ng/ml de TNF α : TNF α .

Tras 24 horas, el tratamiento con tunicamicina aumenta el TNF α (tanto el contenido de proteína como la expresión génica) y disminuye la expresión génica de TNFR1 de manera dosis dependiente. 10 mg/ml de tunicamicina incrementan el contenido de TNF α y la expresión génica un 180% (Figura 16A y 16B) (Rana, Kotla y col. 2017). El tratamiento con tunicamicina induce un menor incremento en el contenido de la proteína TNF α que la administración exógena de TNF α (100 ng/ml). Como se muestra en la Figura 17, la muerte de células tratadas con tunicamicina va acompañada de un aumento de activación de la caspasa 3 y acumulación de polímeros de PAR como ya se había descrito anteriormente en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (Estornes, Aguilera y col. 2015). La preincubación con ADA10 antes de añadir 10 μ g/ml de tunicamicina, disminuye el contenido y la expresión génica de TNF α (Figura 16C y 16D) y parece reducir la acumulación de polímeros de PAR en las células tratadas con TNF α (Figura 17C). Sin embargo, el tratamiento con ADA no previene de la muerte celular inducida por tunicamicina, la activación de la caspasa 3 o la disminución de la expresión génica del TNFR1 (Figura 17A y 17B; Figura 16D). Estos resultados son similares a los obtenidos en células MEF tratadas con anti-TNF α , lo que sugiere que bajo condiciones de estrés en el RE (tratamiento con tunicamicina) las células mueren por mecanismos independientes de TNF α /TNFR1.

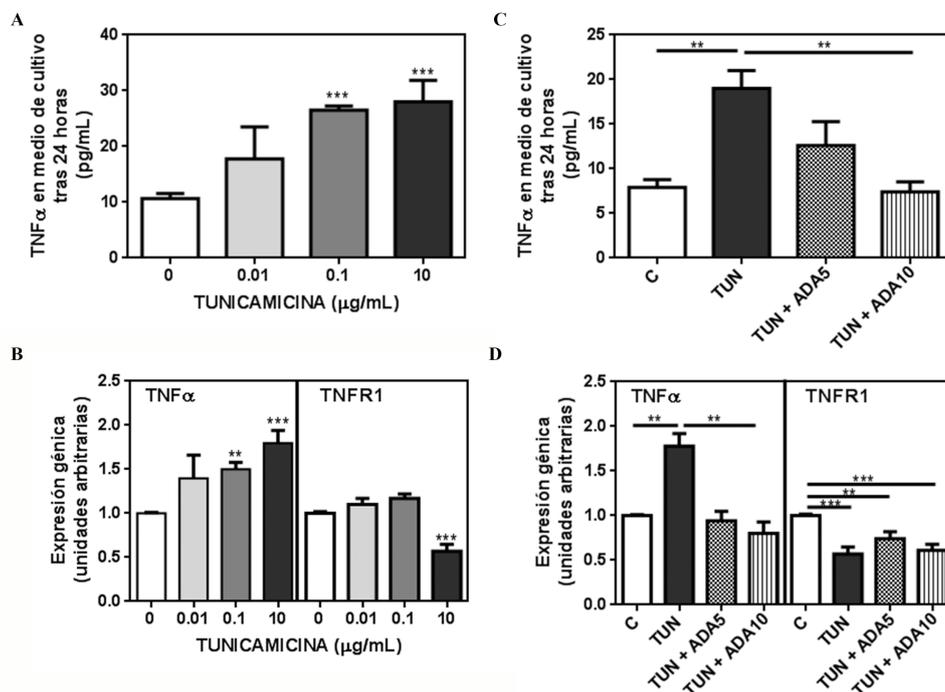


Figura 16. Efecto de la tunicamicina y de la tunicamicina con Adalimumab en el contenido de TNF α y TNFR1 en células 661W. Curva del efecto dependiente de la dosis de tunicamicina sobre la concentración de TNF α en el medio de cultivo (A) y sobre la expresión génica de TNF α /TNFR1 (B); concentración de TNF α en medio de cultivo (C) y expresión génica de TNF α /TNFR1 (D) en células 661W tratadas con tunicamicina 10 μ g/ml (TUN) y/o 5 μ g/ml de ADA (ADA5) o 10 μ g/ml (ADA10) durante 24 horas. Cada experimento se realizó seis veces para cada una de las determinaciones. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn, **p<0,01; ***p<0,001.

Estos resultados sugieren que, el TNF α exógeno promueve la muerte de los fotorreceptores *in vitro* a través de mecanismos dependientes de caspasas. En estas condiciones, parece que la muerte de los fotorreceptores ocurre por apoptosis y no por activación de la necroptosis. Además, el TNF α exógeno incrementa la formación de polímeros de PAR. El tratamiento con ADA protege de la muerte celular inducida por TNF α a través de la inhibición de las caspasas. Sin embargo, no previene de la muerte celular inducida por estrés en el RE.

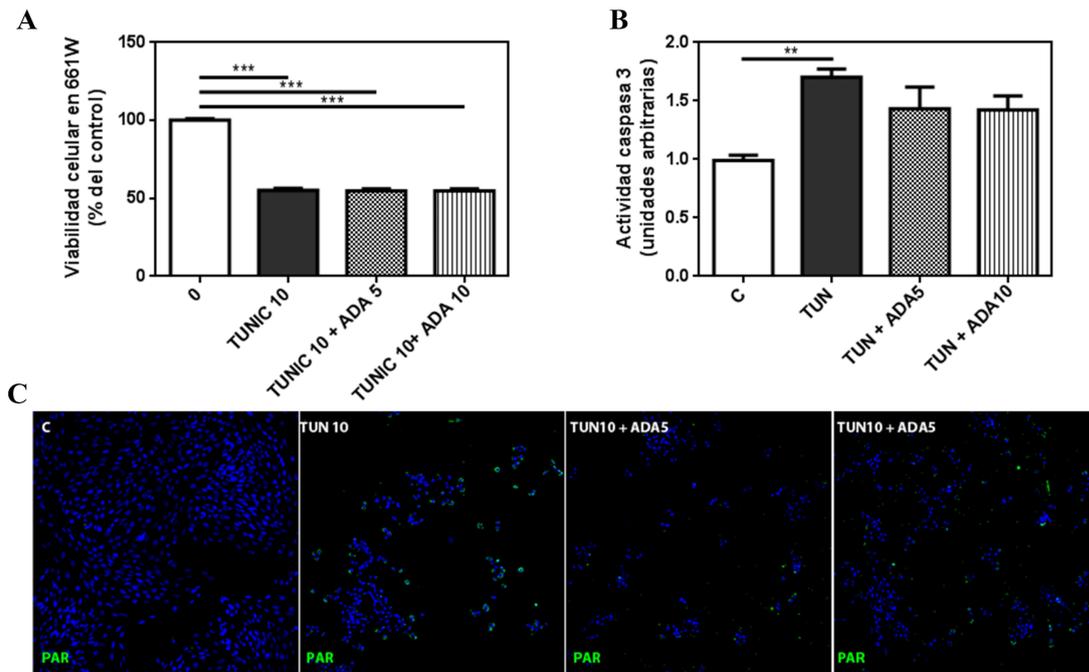


Figura 17. Efecto del ADA en la muerte inducida por tunicamicina en células 661W. Viabilidad celular (A); activación de la caspasa 3 utilizando sustratos específicos (B); inmunofluorescencia de polímeros de PAR (C). Cada experimento se realizó seis veces para cada una de las determinaciones. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 5 $\mu\text{g/ml}$ de ADA (ADA5), 10 $\mu\text{g/ml}$ de ADA (ADA10).

III.2.4. Activación de PARP, del inflammasoma NLRP3, y gliosis reactiva en la retina de ratones *rd10* a P23.

Tras caracterizar el perfil temporal de degeneración retiniana en los ratones *rd10* desde P13 hasta P60, como se describe en el apartado III.2.1, y considerando los resultados previos a P18 y P20 (administración intraperitoneal), seleccionamos la edad P23 para evaluar el efecto del tratamiento con ADA sobre el proceso de degeneración. Antes de administrar el tratamiento, analizamos algunos marcadores celulares para intentar dilucidar los posibles mecanismos implicados en la muerte celular a esta edad. Bajo nuestras condiciones de establecimiento, se

observó un aumento en la activación de las caspasas 3 y 1 en las retinas de los ratones *rd10* (Figura 18A).

En la expresión génica de RIPK1 y RIPK3, se observa un efecto opuesto; mientras que la expresión génica de RIPK1 disminuyó, la expresión de RIPK3 aumentó significativamente (Figura 18B). Además, se confirmó el aumento de la proteína RIPK3 por Western Blot. La acumulación de polímeros de PAR en las retinas de los ratones *rd10* también aumentaba significativamente a esta edad (Figura 18C).

A P23 la degeneración retiniana fue acompañada de un proceso de neuroinflamación, que incluyó un aumento de TNF α , de la gliosis reactiva y de la activación de la microglía (Figura 18D y 18F). Sin embargo, a esta edad, otros marcadores inflamatorios como IL6 o COX2 se encontraban disminuidos (Figura 18D). El aumento de RIPK3 y de la actividad de la caspasa 1 podría indicar una activación del inflamasoma NLRP3. Por lo tanto, se analizaron algunos componentes de este complejo: el contenido de la proteína NLRP3, y la expresión génica de IL-1 β e IL-18. La expresión génica de IL-1 β y la proteína NLRP3 estaban aumentadas en las retinas de los ratones *rd10*, sugiriendo una activación del inflamasoma NLRP3 (Figura 18E). Por el contrario, la expresión génica de la IL-18 estaba significativamente reducida en las retinas de los ratones *rd10* (Figura 18D). Para entender este resultado deberíamos analizar más a fondo las formas activas de estas citoquinas.

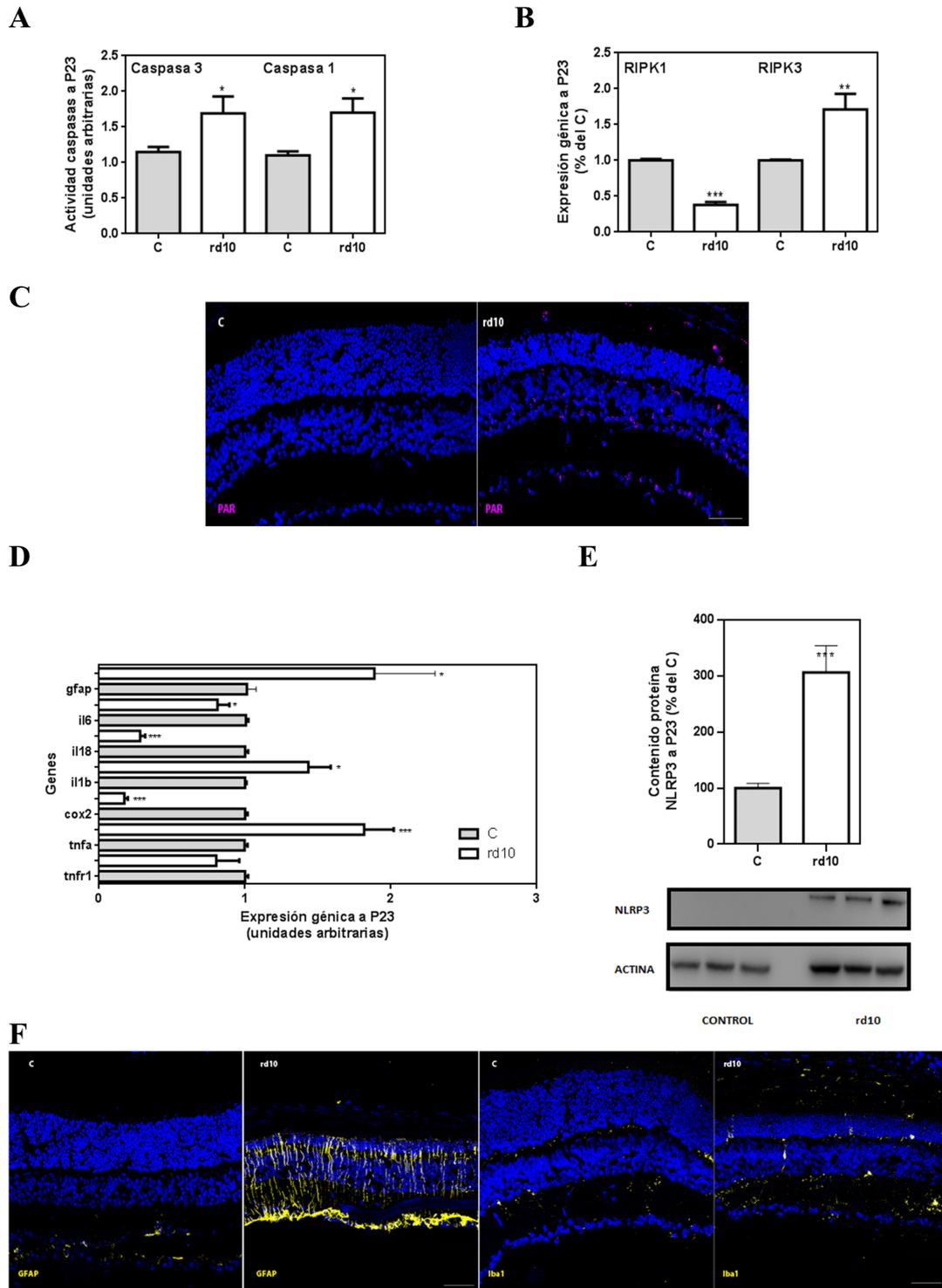


Figura 18. Marcadores de muerte celular e inflamación en retinas de ratón *rd10* a P23. Actividad de las caspasas 3 y 1 utilizando sustratos específicos en retinas control y *rd10* (A); expresión génica de RIPK1 y RIPK3 en retinas control y *rd10* (B); imágenes representativas que muestran el marcaje de PAR en secciones de retinas control y *rd10* contrateñidas con DAPI (C); expresión génica de marcadores inflamatorios en retinas control y *rd10* (D); contenido de la proteína NLRP3 en retinas control y retinas *rd10* (E); imágenes representativas que muestran el marcaje de GFAP (células de Müller) en secciones de retinas control y *rd10* contrateñidas con DAPI (F). Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo de tratamiento. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de la t de Student para muestras independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala: 50 μ m; retinas control: C.

III.2.5. Una dosis única de ADA intravítreo reduce la degeneración de la retina en ratones *rd10* a P23.

Existen evidencias previas de un aumento de TNF α en las retinas de los ratones *rd10*, justo antes del pico de muerte de células fotorreceptoras (Genini, Beltran y col. 2013, Yoshida, Ikeda y col. 2013b). En nuestro caso, describimos que repetidas inyecciones intraperitoneales de ADA disminuyen la degeneración retiniana reduciendo la acumulación de polímeros de PAR y la neuroinflamación en retinas de ratones *rd10* a P18 (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). Sin embargo, no pudimos lograr un efecto protector más allá de esa edad. En este estudio evaluamos si una única dosis de ADA intravítreo previene de la degeneración retiniana durante más tiempo (P23) que las inyecciones intraperitoneales. Se realizó una curva de concentración de ADA (0,125 a 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para determinar si su administración intravítrea protegía de la muerte de las células fotorreceptoras y qué concentración se debería emplear. Se cuantificó el grosor de la ONL y el número de filas de fotorreceptores en las retinas de los ratones *rd10* a P23. Como se muestra en la Figura 19A y 19B, la cuantificación de células fotorreceptoras (núcleos y grosor de la ONL) mostró un rescate significativo tras la inyección intravítrea de ADA a 0,375 o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con un incremento del 140% y del 160%, respectivamente, en el número de células fotorreceptoras entre los ojos tratados y los no tratados. La arquitectura de la retina no se vio afectada negativamente por el tratamiento con ADA (Figura 19C). Basándonos en estos resultados elegimos 0,375 y 4,61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADA para los siguientes estudios.

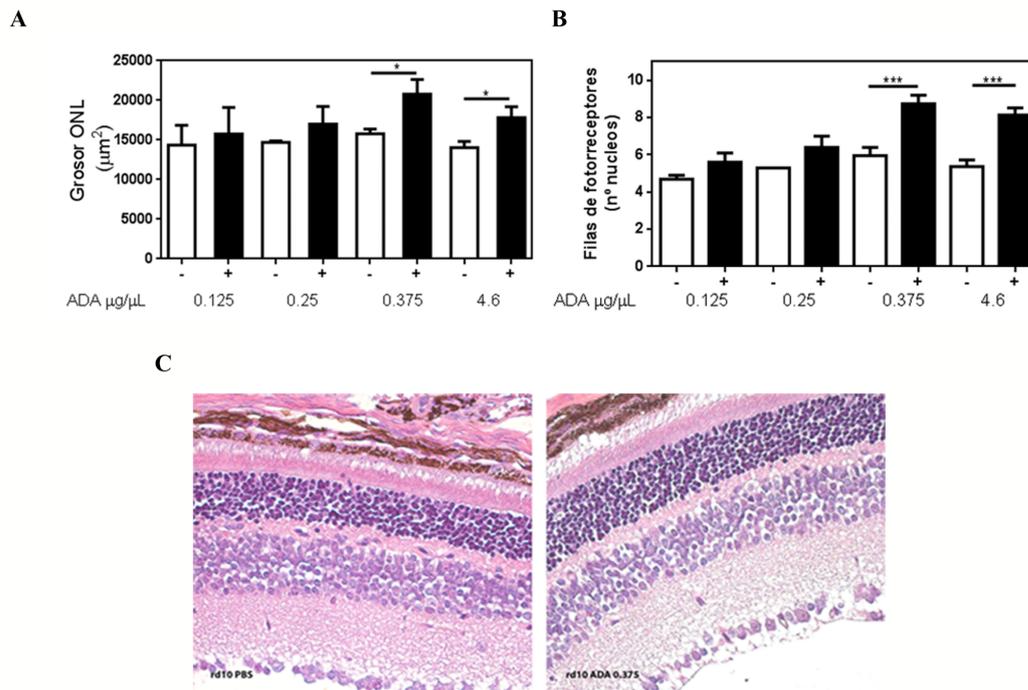


Figura 19. Efecto de distintas concentraciones de Adalimumab sobre la degeneración de los fotorreceptores en ratón *rd10* a P23. El gráfico de barras representa el efecto de las diferentes concentraciones de ADA en el grosor normalizado de la ONL (A) y en el número de filas de núcleos de la ONL (B); tinción representativa de hematoxilina-eosina en retinas de ratones *rd10* tratadas con PBS (vehículo) o con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (C). Se analizaron entre seis y ocho retinas diferentes para cada grupo de tratamiento. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de la t de Student para muestras emparejadas para para la retina del ojo izquierdo de los ratones *rd10* (tratado; +) con respecto al ojo derecho (no tratado; -), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

La administración intraperitoneal de ADA también redujo el número de células TUNEL positivas en la ONL a P18 (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015), pero, el mecanismo por el que el TNF α inducía la muerte celular permanecía sin estar claro. En este estudio se ha profundizado en este tema. Primero, se realizó el ensayo TUNEL para detectar fragmentación en el ADN (un evento temprano en los procesos de apoptosis) tras el tratamiento con ADA a P23. El número de células TUNEL positivas detectadas en la ONL no fue significativamente diferente entre los ojos tratados con ADA y los no tratados. Sin embargo, estos datos sugieren que los ojos tratados con ADA a 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tenían una tendencia a presentar más células TUNEL positivas que los ojos tratados solo con PBS (Figura 20A).

También analizamos la expresión génica de RIPK1 y RIPK3, la actividad de la caspasa 3 (otro evento temprano en los procesos de apoptosis), y el contenido de polímeros de PAR tras la administración intravítrea de ADA (0,375 o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 20B, 20C y 20D). Como se muestra en la Figura 20C, la administración de ADA a 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no tuvo efecto sobre la actividad de la caspasa 3. Del mismo modo, esta concentración no afectó a la expresión génica

de RIPK1, pero sí disminuyó la expresión génica de RIPK3 comparando los ojos tratados con los no tratados (Figura 20B). Las retinas tratadas con ADA a 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mostraron un aumento significativo en la actividad de la caspasa 3 y una disminución de la expresión génica de RIPK3 con respecto a las no tratadas. Con la concentración más alta de ADA la expresión de RIPK1 tendió a aumentar (Figura 20B). Ambas concentraciones de ADA redujeron la acumulación de PAR en las retinas tratadas (Figura 20A).

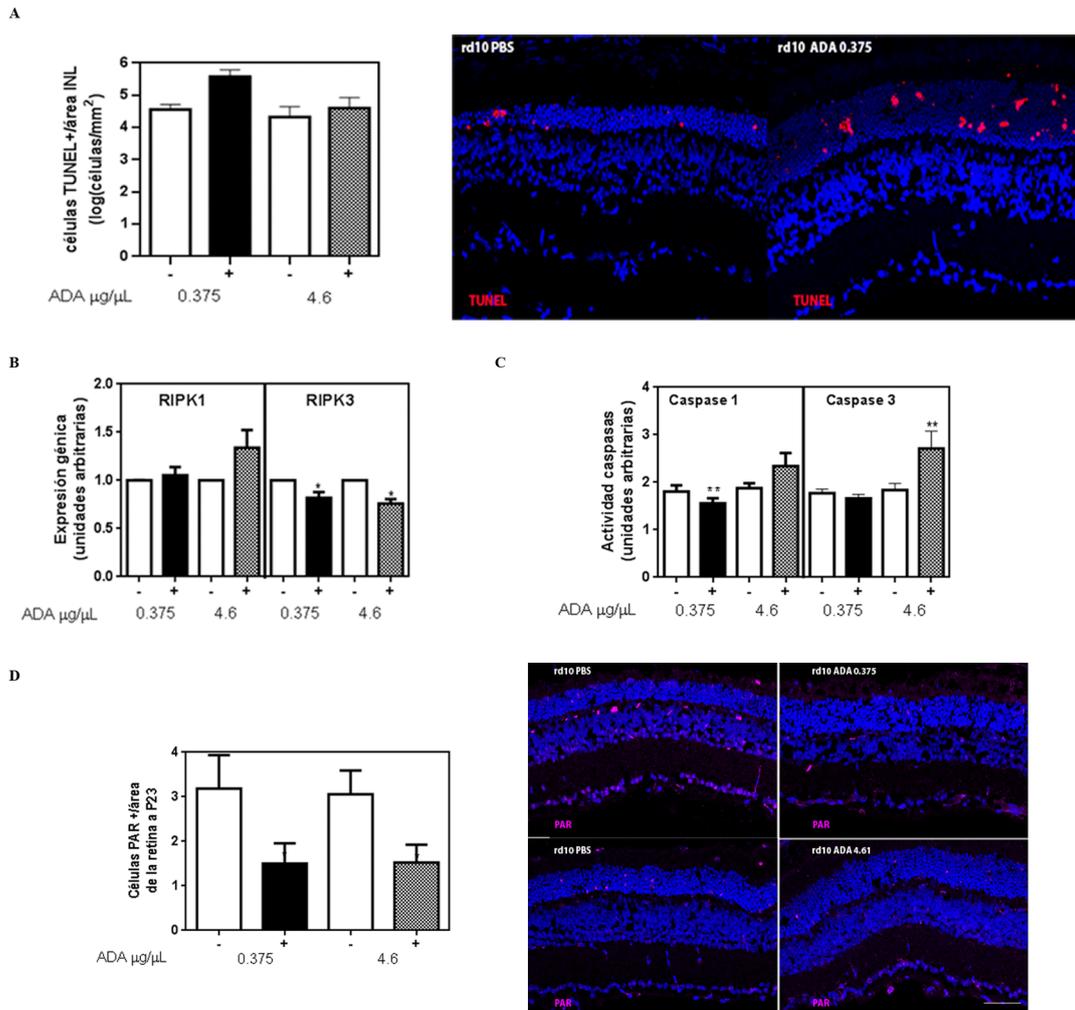


Figura 20. Efecto de la administración intravítrea de Adalimumab sobre la muerte celular en retinas de ratón *rd10* a P23. Número de núcleos celulares TUNEL positivos e imagen representativa de secciones con tinción TUNEL y contrateñidas con DAPI de retinas de ratones *rd10* tratadas con PBS (vehículo) o con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA (A); expresión génica de RIPK1 y RIPK3 en retinas *rd10* tratadas con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA (B); actividad de las caspasas 1 y 3 utilizando sustratos específicos en retinas *rd10* tratadas con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA (C); gráfico de barras que representa las células PAR positivas en retinas de ratones *rd10* tratados 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA e imágenes representativas que muestran el marcaje de PAR en secciones de retinas *rd10* tratadas con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA y contrateñidas con DAPI (D). Se analizaron al menos siete retinas para cada grupo de tratamiento. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de la t de Student para muestras emparejadas para la retina del ojo izquierdo de los ratones *rd10* (tratado;+) con respecto al ojo derecho (no tratado;-), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra escala: 50 μm .

Estos datos sugieren que la inyección intravítrea de ADA podría reducir, al menos parcialmente, la degeneración retiniana a través de la inhibición de PARP.

III.2.6. Una dosis única de ADA intravítrea reduce la activación del inflammasoma NLRP3 y la activación microglial en ratones *rd10* a P23.

Evaluamos si el tratamiento con ADA tenía algún efecto sobre algunos componentes del inflammasoma NLRP3. Para ello, analizamos la actividad de la caspasa 1, el contenido de la proteína NLRP3 y la expresión génica de IL-1 β e IL-18 tras la inyección intravítrea de ADA. Los ojos tratados con ADA 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mostraron una disminución de la actividad de la caspasa 1 (Figura 20C) y del contenido de proteína NLRP3 comparado con los ojos no tratados (Figura 21A). La administración intravítrea de ADA 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tuvo un efecto similar sobre el contenido de NLRP3 pero, no disminuyó la actividad de la caspasa 1, si no que la aumentó. Además, ambas concentraciones de ADA redujeron significativamente la expresión génica de IL-1 β aunque no afectaron la expresión de la IL-18 (Figura 21B).

Finalmente, analizamos el efecto de la inyección intravítrea de ADA en la expresión génica de TNF α /TNFR1 y la neuroinflamación. Se observó una disminución de la expresión génica de TNF α tras la inyección de 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA. Sorprendentemente, la administración de ADA a 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ incrementó la expresión génica de TNFR1 (Figura 21B).

La gliosis reactiva y la activación de la microglía se caracterizan por un aumento de GFAP e Iba1, respectivamente. Iba1 es una proteína de unión al calcio microglía/macrófago específica, que utilizamos para detectar las células de la microglía y calcular su índice de migración como se ha descrito anteriormente (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). La sobreexpresión de GFAP, una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células gliales, es comúnmente utilizada como marcador de la gliosis reactiva en modelos de degeneración retiniana, incluida la RP (Bignami y Dahl 1979, Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). Las células de Müller y los astrocitos expresan GFAP bajo condiciones patológicas (Wakakura y Foulds 1989, Lupien, Brenner y col. 2004). Como se describe en el capítulo siguiente, a P23 se produjo un aumento de la activación de la microglía y del contenido de GFAP en las células de la glía de Müller, lo que comúnmente indica la presencia de gliosis reactiva. Las células gliales activadas pueden liberar citoquinas que exacerban y propagan la neuroinflamación. En este estudio la inyección intravítrea de ADA, tanto a 0,375 como a 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, disminuyó la activación microglial, pero no redujo el aumento de GFAP. Por el contrario, el ADA administrado a 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aumentó el contenido de GFAP en la retina (Figura

21C). No se observaron cambios significativos en los marcadores inflamatorios COX2, iNOS e IL6 (Figura 21B).

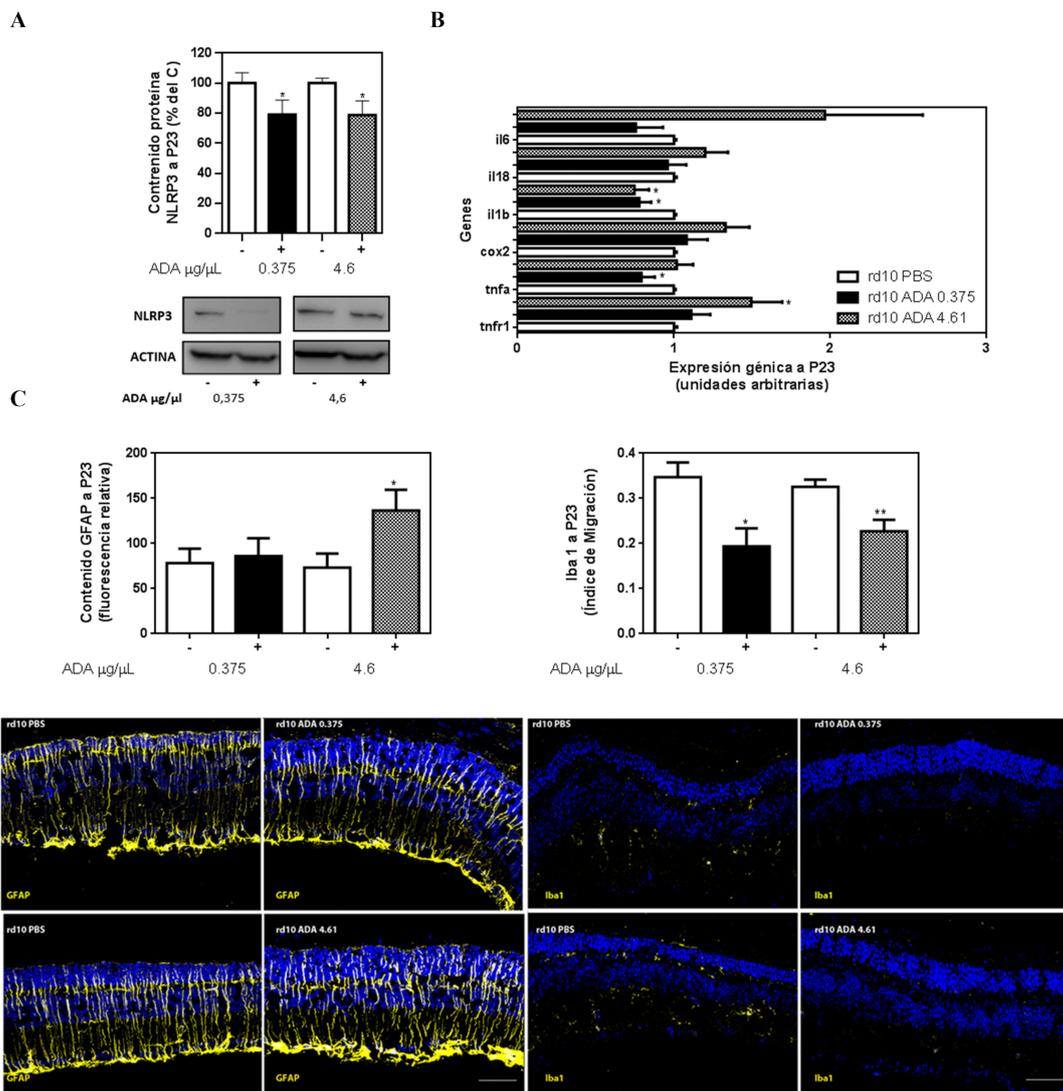


Figura 21. Efecto de la administración intravítrea de Adalimumab sobre la inflamación y el inflammasoma NLRP3 en retinas de ratón *rd10* a P23. Contenido de la proteína NLRP3 en retinas de ratones *rd10* tratados con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA (A); expresión génica de marcadores inflamatorios en retinas *rd10* (A) y en retinas *rd10* tratadas con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA (B); gráfico de barras que representa la fluorescencia corregida de GFAP y el índice de migración de Iba1 (células de Müller y microglía respectivamente) en secciones de retinas de ratones *rd10* tratados con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA e imágenes representativas que muestran el marcaje de GFAP e Iba1 en secciones de retinas de ratones *rd10* tratados con 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADA y contrateñidas con DAPI (C). Se analizaron entre seis y ocho retinas diferentes para cada tratamiento. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de la t de Student para muestras emparejadas para para la retina del ojo izquierdo de los ratones *rd10* (tratado; +) con respecto al ojo derecho (no tratado; -) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de escala: 50 μm .

**CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DEL EFECTO
NEUROPROTECTOR DE LA ESTABILIZACIÓN DE
HIF-1 α EN RATONES *rd10***

CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 α EN RATONES *rd10*

En este trabajo analizamos los niveles de la proteína HIF-1 α y los niveles de expresión de algunos de sus genes diana (VEGF, ET-1, iNOS y GLUT-1) a lo largo de los diferentes estadios de progresión de la degeneración retiniana en el modelo de ratón *rd10*, así como las variaciones en la biodisponibilidad de oxígeno. Evaluamos también si la estabilización de la proteína HIF-1 α en estadios tempranos de RP desencadena respuestas neuroprotectoras reduciendo así la pérdida de células fotorreceptoras.

IV.1. METODOLOGÍA

IV.1.1. Animales y tratamiento

Como modelo de RP autosómica recesiva utilizamos el ratón *rd10* (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME, USA). Como cepa control utilizamos el ratón C57Bl6. Los ratones se estabularon siguiendo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura y humedad controlada y comida y agua *ad libitum*; se mantuvieron en racks con una iluminación constante de 115 \pm 7 lux (95% CI: 98–131), ya que variaciones en este aspecto pueden provocar cambios en el proceso de degeneración de la retina, en la Unidad Central de Investigación (UCIM) de la Universidad de Valencia. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a la legislación de la UE para la protección de animales de experimentación (*European Union Directive 2010/63/EU*). Todos los procedimientos animales y protocolos fueron aprobados (A1333525639514) y monitorizados por el comité de ética en Investigación de la Universidad de Valencia.

Para determinar el perfil temporal de contenido proteico de HIF-1 α y de pérdida de células fotorreceptoras en nuestras condiciones de estabulación, se sacrificaron ratones *rd10* sin tratamiento y C57Bl6 a los días P15, 18, 20, 23, 30, 44 y 60. Los ojos fueron extraídos rápidamente y procesados según se describe en los siguientes apartados.

Para evaluar el efecto de la dimetiloxalil glicina (DMOG), un inhibidor de las proli hidroxilasas, cada ratón *rd10* recibió una inyección intraperitoneal de 200mg/Kg de DMOG (Sigma-Aldrich, Madrid, España), cada dos días desde P9 hasta P23. Esta dosis se eligió basándonos en estudios previos en ratones y ratas para enfermedades oculares (Sears, Hoppe y col. 2008, Trichonas, Lee y col. 2013). No se detectaron efectos secundarios aparentes en los ratones tratados con DMOG. Al mismo tiempo se pincharon ratones con el mismo volumen de DMSO (vehículo). Tanto los ratones *rd10* tratados y no tratados, como los C57Bl6 fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los ojos fueron rápidamente enucleados y

procesados según se describe en los siguientes apartados. Para las determinaciones bioquímicas y los ensayos de expresión génica, las retinas se extrajeron, se introdujeron en el tampón adecuado y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

IV.1.2. Análisis de la respuesta antioxidante

Las retinas se homogeneizaron en tampón fosfato 5mM a pH 7, con 0,9% de NaCl y 0,1% glucosa. El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante se midió la capacidad antioxidante total (TAC) y las actividades enzimáticas de la fracción citosólica de SOD1 (SOD1) y de la CAT, utilizando kits comerciales (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se utilizó para determinar la actividad enzimática de la fracción mitocondrial de la SOD (SOD2). La cantidad de proteína se determinó por el método BCA.

El ensayo TAC cuantifica la capacidad de los antioxidantes presentes en las muestras para inhibir la oxidación del compuesto 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS®) por metmioglobina, en comparación con la actividad antioxidante del Trolox, un análogo soluble del tocoferol. Los niveles de TAC en retina se expresaron en nanomoles por miligramo de proteína (nmol/mg).

El ensayo de actividad de SOD utiliza sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por xantina oxidasa e hipoxantina. Una unidad (U) de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la dismutación del radical superóxido.

El ensayo de actividad CAT utiliza la función peroxidasa de la CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H₂O₂. El formaldehído que esta reacción produce se mide colorimétricamente a través de un cromógeno que forma heterociclos bicíclicos con los aldehídos tras la oxidación. 1 U de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 0,1 nM por minuto de formaldehído a 25°C.

Las actividades SOD y CAT se expresaron en unidades por miligramo de proteína (U/mg proteína).

Se analizaron entre seis y ocho retinas por edad para cada determinación.

IV.1.3. Determinación de la proteína HIF-1α mediante ELISA

El contenido proteico de HIF-1α se cuantificó en retinas control y retinas de ratones *rd10* desde P15 hasta P60 utilizando un kit ELISA de Fine Test (Wuhan Fine Biotech, Wuhan, China) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las retinas se homogeneizaron en 180 µl de PBS 0,1 M

que contenía inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) y se centrifugaron a 5000 g durante cinco minutos. El sobrenadante se utilizó para medir los niveles de HIF-1 α , expresados en picogramos por retina (pg/retina). Para cada edad se utilizaron entre seis y ocho ratones control o *rd10*.

IV.1.4. Medida de la biodisponibilidad de oxígeno en la retina

La presencia de hipoxia o disminución de oxígeno en la retina puede detectarse utilizando el compuesto bioreactivo pimonidazole (HP), que forma aductos irreversibles con los grupos thiol de las proteínas en los tejidos con una presión de O₂ por debajo de 10 mm Hg. Se administró intraperitonealmente una dosis de 60 mg/kg de HP (Hypoxyprobe, Burlington, MA, EEUU) en agua estéril a ratones control y *rd10* a P18, P44 y P60, utilizando una cohorte de ocho ratones por edad.

Tras la enucleación, las retinas se homogenizaron en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con NaCl 50 mM; 1% (v/v) Tritón X100; 0,1% SDS; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La concentración de proteína de las muestras se determinó mediante el método BCA. Los extractos de retina se incubaron en una membrana de nitrocelulosa poniendo 3 μ g de proteína por muestra, durante 90 minutos a temperatura ambiente, para que las proteínas se uniesen a la membrana. La membrana se bloqueó con seroalbúmina bovina al 5% en tris-buffer salino-polisorbato con Tween 20 (TBS-T) y se incubó con el anticuerpo para HP (1:2000; Hypoxyprobe, Burlington, MA, EEUU) o β -actina (1:2000; Sigma- Aldrich, España) durante una hora a temperatura ambiente. El dot blot se lavó tres veces con TBS-T y se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (mouse, 1:2000; Sigma- Aldrich, España) durante una hora a temperatura ambiente y se lavó de nuevo con TBS-T. A continuación la membrana se incubó con el buffer de fosfatasa alcalina (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) que contiene el sustrato de la enzima (6,6 ml NBT/ml y 3,3 ml BCIP/ml, Bio Rad, California, EEUU). La reacción colorimétrica que tiene lugar se paró con agua destilada. Los dot blots de HP se cuantificaron y se normalizaron con la β -actina usando el programa Alphamager 2200 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EEUU).

IV.1.5. Ensayo TUNEL e histoquímica

Para obtener secciones de retina, los ojos se procesaron del mismo modo que se ha descrito en el capítulo anterior.

La muerte celular, el grosor de la retina, el número de núcleos celulares y las inmunofluorescencias también se realizaron del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo de tratamiento.

IV.1.6. Microscopía y cuantificación

Las secciones de retina se examinaron utilizando un microscopio confocal (40X magnificación, Leica TCS SP5 Confocal microscope; Leica Microsystems) y se analizaron utilizando el software de imagen Leica Microsystems LAS AF lite e ImageJ. El grosor y el número de filas de la ONL, el número de células TUNEL e Iba-1 positivas y la intensidad de fluorescencia de GFAP, se cuantificaron utilizando el software Image J, del mismo modo que se ha descrito en el capítulo anterior.

IV.1.7. Extracción de ARN y síntesis de cADN

Se extrajo el ARN total de seis retinas para cada uno de los grupos de tratamiento, utilizando el kit comercial RNeasyMiniKit (Qiagen, Hilden, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ARN total y utilizando el kit comercial GeneAmp Gold ARN PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, obtuvimos cADN mediante RT-PCR, partiendo de una concentración inicial de 1 µg de ARN. Se utilizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo de edad y tratamiento.

IV.1.8. PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión relativa de los genes VEGF, iNOS, GLUT1, y ET-1 se determinó mediante PCR en tiempo real, utilizando la plataforma ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y las sondas TaqMan específicas para esos genes [Mm01281449_m1 (VEGF), Mm00440502_m1 (iNOS), Mm00441480_m1 (GLUT1), y Mm00438656_m1 (ET-1), (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems)]. El gen de la b2-microglobulina [(b2m) (Mm00437762_m1; Applied Biosystems)] se utilizó como control endógeno en las muestras. La PCR en tiempo real se realizó siguiendo el programa descrito en el capítulo anterior.

IV.1.9. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software R (versión 3.4.0). Las comparaciones entre los grupos de diferentes edades se hicieron con la prueba de Mann–Whitney. Se utilizaron modelos de mínimos cuadrados generalizados (GLS) para evaluar la asociación entre el DMOG y los dos grupos experimentales con las diferentes variables respuesta. Estos modelos son capaces de evaluar diferencias entre grupos mientras se controlan otras covariables y diferencias en la varianza. Las variables respuesta GFAP, GLUT-1 y HIF-1 α se transformaron logarítmicamente para realizaranálisis paramétricos con el fin de estabilizar la varianza y normalizar su distribución. Un valor p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. Perfil temporal de la proteína HIF-1 α y sus genes diana en ratones *rd10*

La cantidad de proteína HIF-1 α se midió a lo largo de la progresión de la degeneración retiniana en retinas de ratones control y ratones *rd10* desde P15 hasta P60 (Figura 22), utilizando un ELISA. La proteína se detectó en todas las edades en ambos grupos (Figura 22A) conforme disminuía el número de fotorreceptores en la retina (Figura 22B).

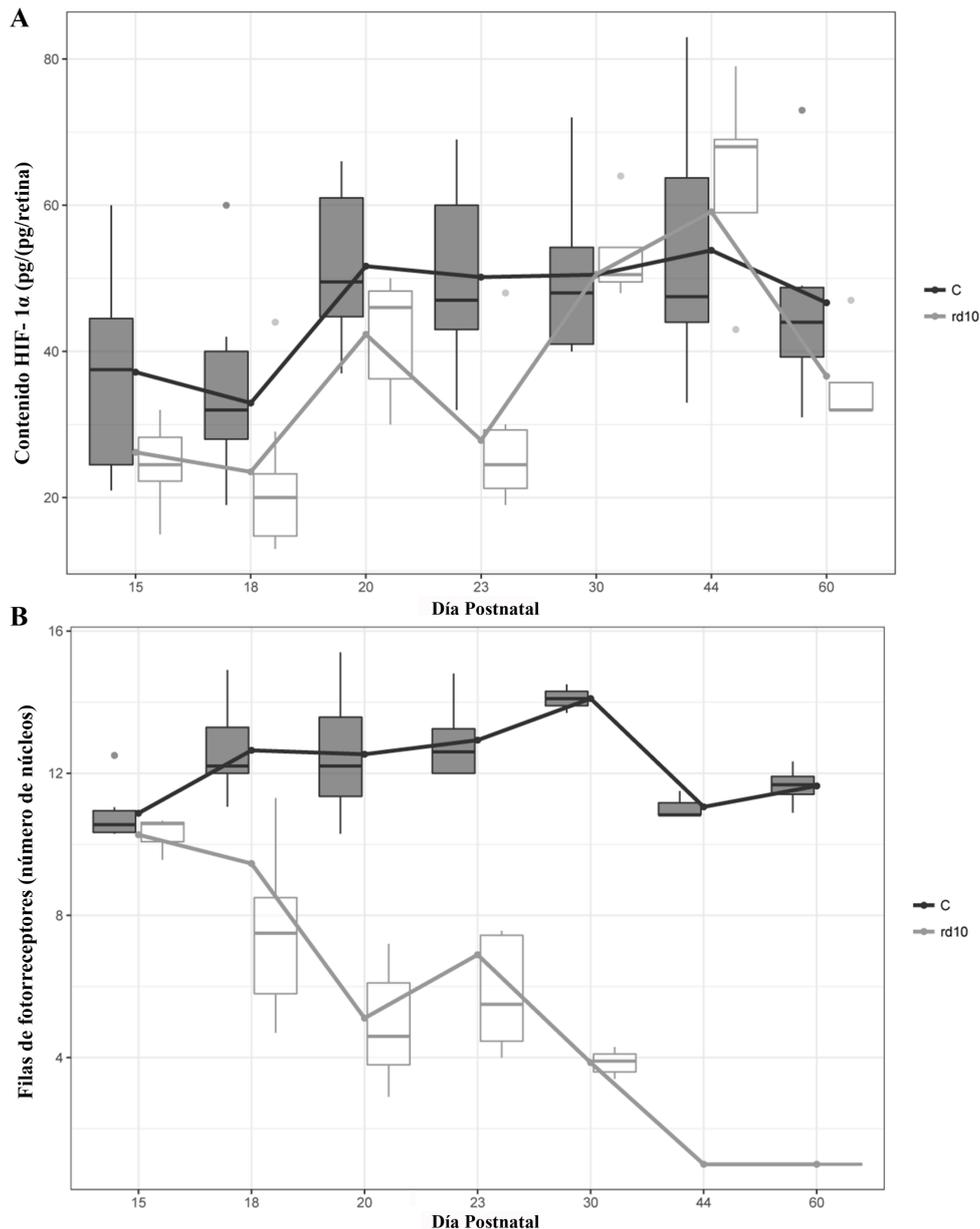


Figura 22. Progresión de la proteína HIF-1 α y degeneración retiniana en retinas *rd10*. Cuantificación de HIF-1 α mediante ELISA (A); número de filas de núcleos de fotorreceptores (B) a diferentes edades postnatales en retinas de ratones control y *rd10*. Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo y edad. Para cada edad y grupo las cajas de los gráficos representan la mediana y el primer y tercer cuartil; las líneas representan la media de los grupos. GLS. Retinas control: C. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

Los análisis estadísticos revelan diferentes niveles de proteína en las retinas control y las retinas de los ratones *rd10*. Observamos una menor concentración de proteína HIF-1 α en las retinas de los ratones *rd10* antes (P15), durante (P18) y después (P20-23) del primer pico de degeneración de células fotorreceptoras que podría sugerir un estado de hiperoxia. A continuación observamos un estado transitorio que podría indicar normoxia, donde aumentan los valores de HIF-1 α (P30-P44), que coincide con un segundo pico de pérdida de fotorreceptores. A P60, cuando sólo quedan una o dos filas de fotorreceptores en la retina bajo nuestras condiciones de estabulación, el nivel de HIF-1 α disminuye de nuevo (Figura 22). Estos resultados podrían sugerir que, durante la progresión de la RP, la retina se encuentra en condiciones de hiperoxia, excepto en un estado transitorio de normoxia (P30-P44) en los ratones *rd10*.

Para determinar si las oscilaciones en los valores de proteína HIF-1 α corresponderían a cambios en los niveles de oxígeno, evaluamos el contenido de los aductos proteicos con HP en la retina de ratones control y *rd10* a P18, P44 y P60 mediante Dot Blot (Figura 23A y 23B). El análisis estadístico muestra que los aductos están reducidos significativamente en las retinas de los ratones *rd10* a P18 y P60, comparado con los valores observados en las retinas control (Figura 20B) y que, a P44, los aductos no aumentan significativamente. Esto sugiere que la hiperoxia es el estado predominante durante todo el proceso de degeneración (con niveles bajos de HIF-1 α y aductos HP) excepto en el estado de transición de normoxia (con niveles altos de HIF-1 α y de aductos de HP). La inmunofluorescencia de aductos de HP con anticuerpos anti-pimidazole muestra que estos se localizan principalmente en la OPL, la IPL y la INL en las retinas de los ratones control (Figura 23C). En las retinas de los ratones *rd10* la formación de estos aductos está significativamente disminuida en estas capas, lo que corrobora los resultados del Dot Blot (Figura 23).

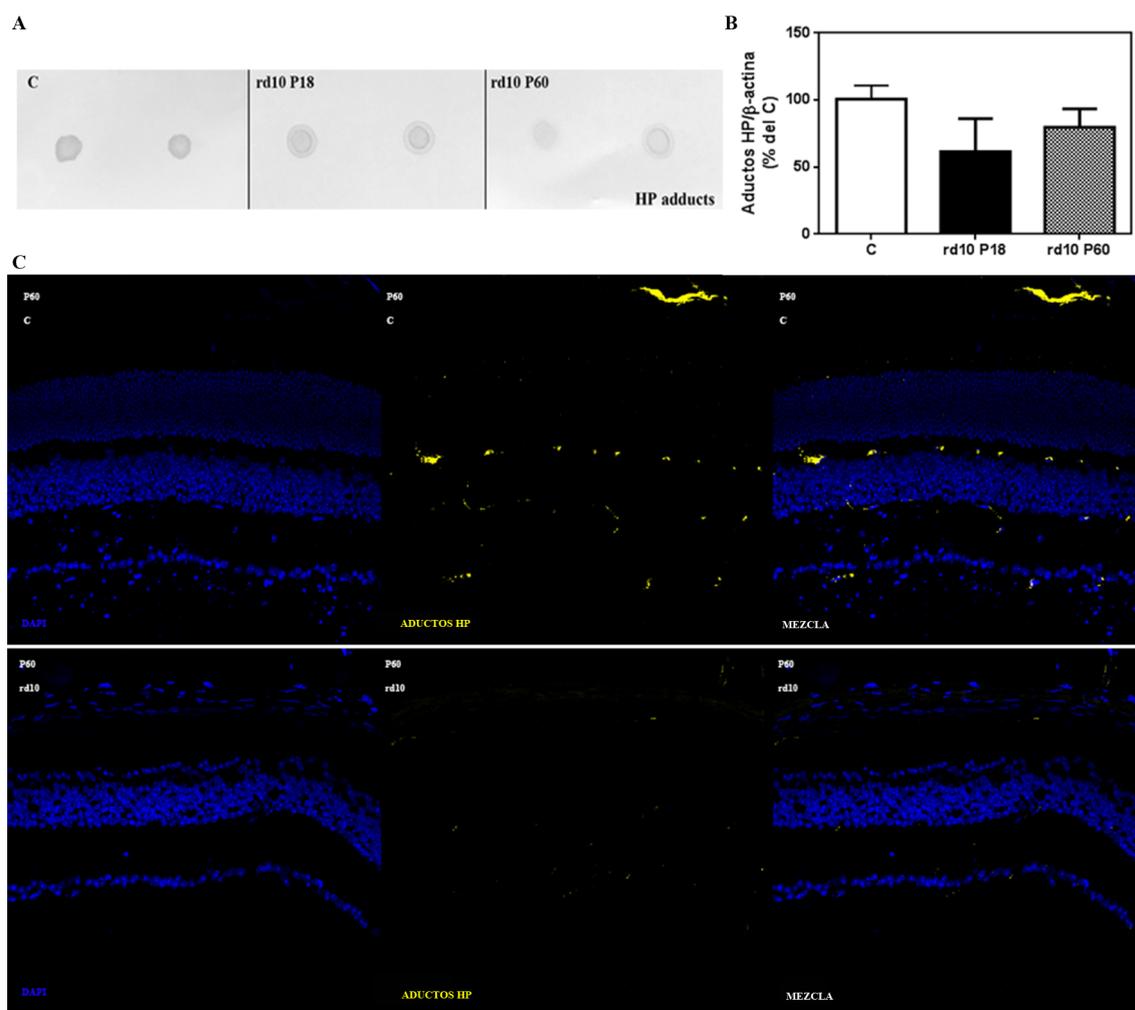


Figura 23. Detección de hipoxia en la retinas de ratones control y *rd10* tras la inyección intraperitoneal de HP. Dot blot representativo de la formación de aductos de HP (indicador de hipoxia) en retinas de ratones *rd10* a P18 y P60 (A); cuantificación del dot blot en retinas control y *rd10* a P18 y P60 (B); inmunofluorescencia representativa que muestra la localización de los aductos de HP en retinas de ratones control y *rd10* a P60 contrateñidas con DAPI (C). Se analizaron al menos nueve retinas por grupo. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. Barra de escala: 50 μ m; retinas control: C. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

También analizamos la expresión génica de algunos de los genes diana de HIF-1 α que se han visto alterados en RP como GLUT1, VEGF, y ET-1 desde P13 a P60 mediante PCR cuantitativa (Figura 24). La expresión relativa de estos genes está disminuida desde P18 a P60, apoyando la hipótesis de un ambiente hiperóxico en la retina. En humor acuoso de pacientes con RP también se ha observado una disminución del factor VEGF-A (Salom, Diaz-Llopis y col. 2008). El mayor nivel de expresión de los genes diana de HIF-1 α se observa antes del inicio del proceso de degeneración retiniana, a P13, y después disminuye drásticamente desde P18 a P20 (pico de muerte de los fotorreceptores). A P23 se observa un pequeño incremento en todas las dianas. Desde P44 a P60, la expresión de estos genes permanece disminuida (Figura 24).

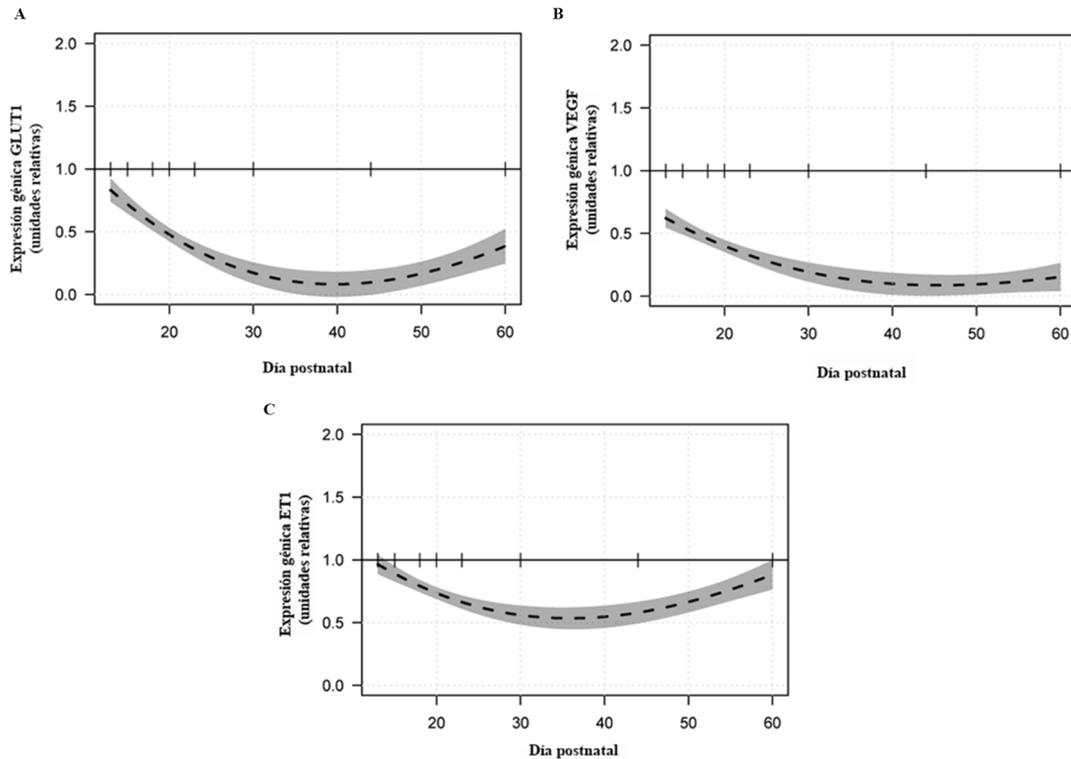


Figura 24. Perfil temporal de expresión de los genes diana de HIF-1 α : GLUT1, VEGF y ET-1 a diferentes días postnatales en retinas control y retinas *rd10*. La relación entre días y valores de expresión se ha suavizado mediante regresión local (LOESS). Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada grupo de edad. La región sombreada corresponde a un intervalo de confianza de 95% para la línea de regresión. La línea horizontal representa los valores de expresión de las retinas control normalizados a 1. GLS. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

IV.2.2. La estabilización de HIF-1 α previene de la pérdida de células fotorreceptoras a P18 y, en menor medida, a P23

Basándonos en el perfil temporal de la proteína HIF-1 α en las retinas de los ratones *rd10*, evaluamos si la estabilización de HIF-1 α utilizando DMOG presenta un efecto neuroprotector durante el pico de degeneración retiniana (P18) y antes de la fase transitoria de normoxia (P23), cuantificando la degeneración de las células fotorreceptoras en los ratones *rd10* tras el tratamiento con DMOG (Figura 25).

Primero evaluamos si el tratamiento estabilizaba los niveles de la proteína de HIF-1 α a P18, al inhibir la prolil-hidroxilación de este factor de transcripción. El contenido de HIF-1 α es significativamente menor en las retinas de los ratones *rd10* no tratados ($20 \pm 1,4$ pg/ml; $p < 0,01$) que en las retinas de ratones control ($35 \pm 2,4$ pg/ml), mientras que el tratamiento con DMOG incrementa el contenido HIF-1 α en los ratones *rd10* (28 ± 1.7 pg/ml; $p < 0,05$).

También evaluamos el efecto del tratamiento sobre la expresión de los genes diana de HIF-1 α (Tabla 2). Como podemos observar en la Figura 24 y en la Tabla 2 a P18, la expresión génica de todas las dianas de HIF-1 α estudiadas se encuentra disminuida en las retinas de los ratones *rd10* con respecto a los niveles observados en las retinas control. En este caso, el tratamiento con DMOG no afecta de la misma forma a todos los genes estudiados. Se produce un incremento en los niveles de expresión génica de iNOS y en menor medida de ET-1 y VEGF. Sin embargo, no se observa un incremento en la expresión de GLUT-1 tras el tratamiento (Tabla 2).

La evaluación histológica muestra que el tratamiento con DMOG preserva las células fotorreceptoras a esta edad. El grosor de la ONL es mayor en las retinas de los ratones *rd10* tratados con DMOG que en los ratones *rd10* no tratados (Figura 25A). El tratamiento con DMOG previene de la pérdida de fotorreceptores en las retinas de los ratones *rd10* comparado con los ratones *rd10* no tratados (Figura 25A). El número de células TUNEL positivas detectadas en la ONL es significativamente menor en las retinas de los ratones *rd10* tratados con DMOG que en los no tratados (Figura 25A y 25B), lo que indica un efecto protector de la estabilización de HIF-1 α , que contribuye a la supervivencia de los fotorreceptores.

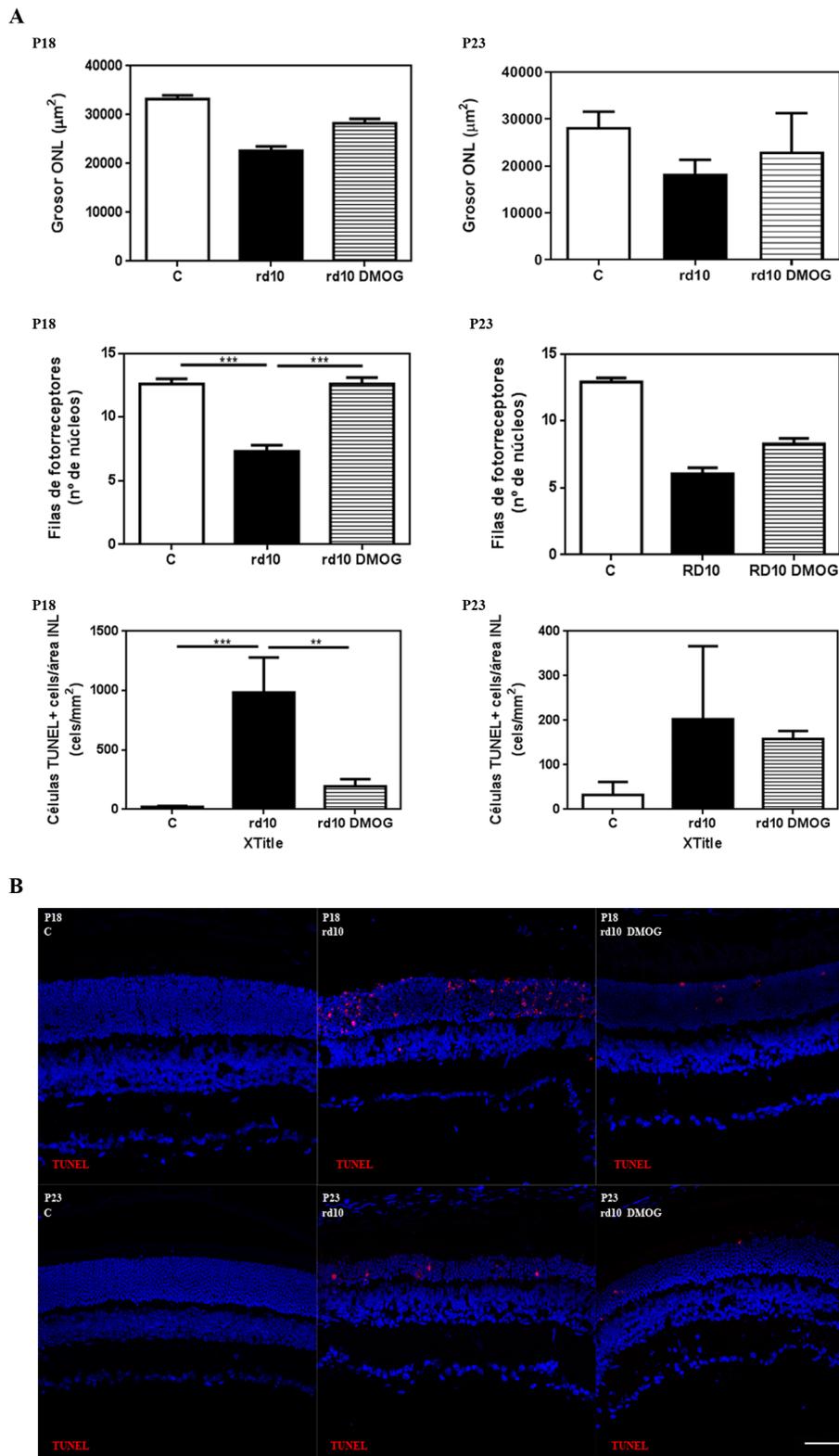


Figura 25. Efecto de administración de DMOG sobre la degeneración retiniana en retinas de ratones *rd10* a P18 y P23. El gráfico de barras muestra el efecto del DMOG sobre el grosor normalizado de la ONL, el número de núcleos de fotorreceptores de la ONL y el número de núcleos TUNEL positivos a P18 (izquierda) y a P23 (derecha) (A). Imagen representativa de secciones con tinción TUNEL y contrateñidas con DAPI de retinas de ratones *rd10* a P18 y P23 (B). Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada edad y grupo. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). GLS, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala: 50 μ m. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

A continuación, evaluamos si el tratamiento con DMOG tenía efecto neuroprotector también a P23. A esta edad observamos un efecto significativo del tratamiento solo en la expresión génica de iNOS mientras que no vemos efectos sobre GLUT1, ET-1 o VEGF (Tabla 2). La diferencia entre el grosor de la ONL de los ratones *rd10* tratados con DMOG y los no tratados no es estadísticamente significativa (Figura 25A). Sin embargo, el tratamiento sí reduce significativamente la pérdida de células fotorreceptoras en la retina de los ratones *rd10* en comparación con los no tratados (Figura 25A). El número de células TUNEL positivas detectadas en la ONL es similar en los ratones tratados con DMOG y los no tratados (Figura 25A y 25B).

Tabla 2. Efecto del tratamiento con DMOG sobre la expresión génica de algunos genes diana de HIF-1 α a P18 en retinas de ratones *rd10* (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

Expresión génica (expresión relativa)	Grupo	Media (SD)	
		P18	P23
VEGF	C	1,00 (0,29)**	1,00 (0,29)***
	<i>rd10</i>	0,18 (0,10)	0,42 (0,13)
	<i>rd10 +DMOG</i>	0,32 (0,14)*	0,43 (0,07)
iNOS	C	1,00 (0,04)***	1,00 (0,06)***
	<i>rd10</i>	0,13 (0,11)	0,31 (0,20)
	<i>rd10 +DMOG</i>	0,80 (0,47)**	0,53 (0,10)**
GLUT-1	C	1,00 (0,60)*	1,00 (0,23)***
	<i>rd10</i>	0,14 (0,05)	0,45 (0,17)
	<i>rd10 +DMOG</i>	0,17 (0,05)	0,46 (0,08)
ET-1	C	1,00 (0,08)***	1,00 (0,05)***
	<i>rd10</i>	0,08 (0,05)	0,41 (0,08)
	<i>rd10 +DMOG</i>	0,18 (0,09)*	0,45 (0,10)

Expresión génica (expresión relativa) en cada grupo. Análisis GLS para diferencias entre ratones *rd10* con vehículo (*rd10*), *rd10* tratados (*rd10+DMOG*) y controles (C). SD: desviación estándar; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV.2.3. IV.2.3 La estabilización de HIF-1 α reduce la activación microglial y la gliosis reactiva a P18

Tanto en pacientes con RP (Gupta, Brown y col. 2003) como en ratones *rd10* (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015) y otros modelos animales de RP (Hughes, Schlichtenbrede y col. 2004, Peng, Xiao y col. 2014) se ha observado un aumento de la activación microglial y la gliosis reactiva. Como ya hemos descrito en estudios anteriores, el marcaje mediante inmunofluorescencia de GFAP es mayor en las retinas de los ratones *rd10* no tratados a P18 que en los ratones control (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015) (Figura 26). El tratamiento con DMOG reduce la activación de GFAP en las retinas de los ratones *rd10* comparado con los ratones no tratados a P18 (Figura 26). Esto sugiere una disminución de la gliosis reactiva.

El marcaje y distribución de células Iba1 positivas, marcador de microglía, también es mayor en las retinas de los ratones *rd10* no tratados. Detectamos que la microglía migra a la retina externa y, además, se observa un cambio en su morfología, que es ameboide y característica de la microglía activada. Sin embargo, la microglía no activa, permanece quiescente en la retina interna de los ratones control (Figura 26). Por lo tanto, existe un aumento de la activación de la microglía en las retinas de los ratones *rd10* con respecto a las retinas de los ratones control. Tras el tratamiento con DMOG, la microglía vuelve a localizarse principalmente en las capas internas de la retina, y observamos un menor índice de migración a las capas externas (Figura 26). A P23 observamos que la intensidad de marcaje de GFAP es similar a la observada a P18, pero a esta edad, el tratamiento con DMOG no es efectivo en la reducción de la gliosis reactiva. El índice de migración de la microglía permanece elevado con respecto a los controles en los ratones *rd10*, y el tratamiento con DMOG no presenta ningún efecto sobre el proceso inflamatorio a esta edad (Figura 26).

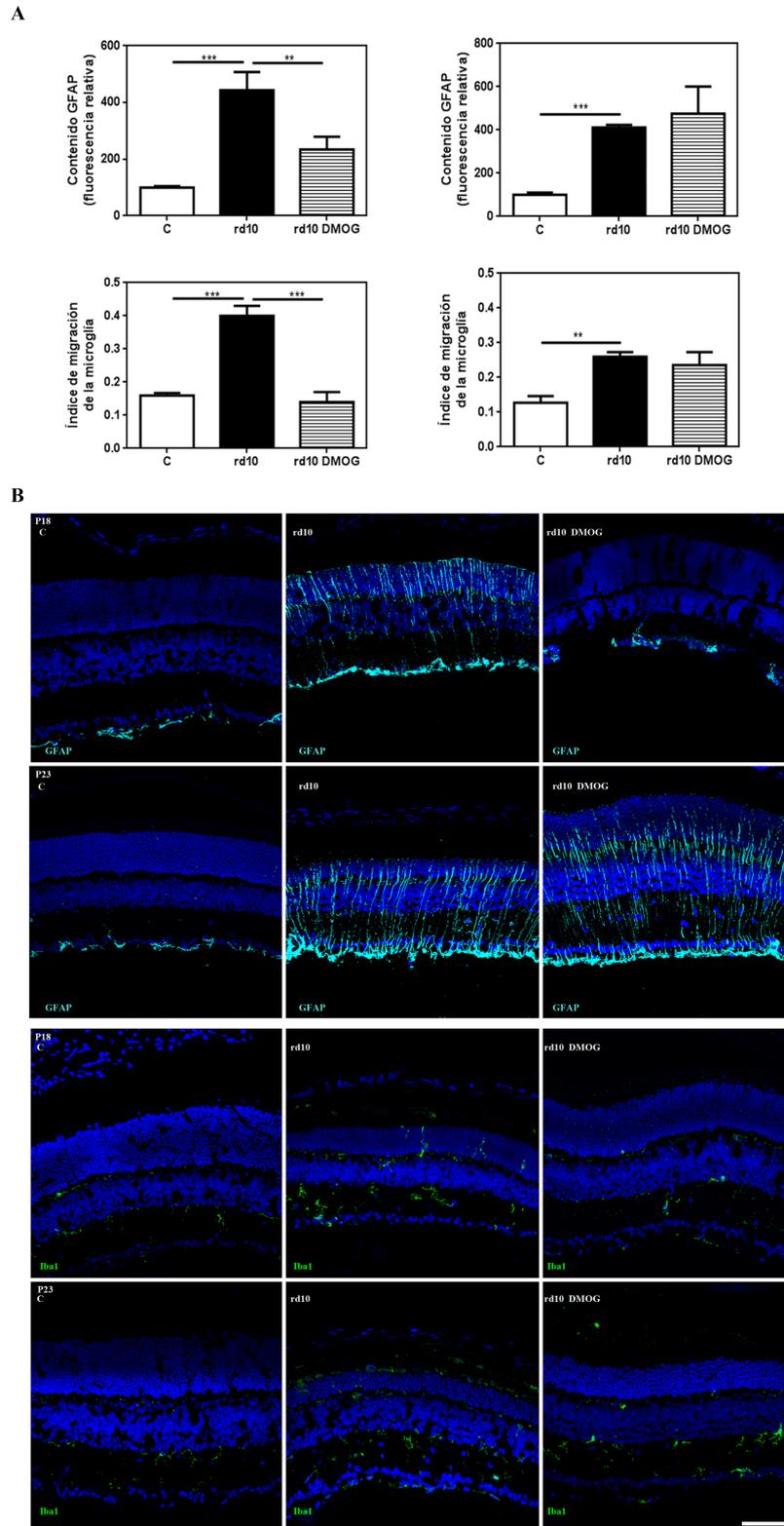


Figura 26. Efecto de la administración intraperitoneal de DMOG sobre la activación glial en retinas de ratón *rd10* a P18 y P23. Los gráficos de barras muestran el efecto del tratamiento con DMOG sobre el índice de migración de la microglía (IM) y la intensidad de fluorescencia corregida del GFAP a P18 (izquierda de la imagen) y a P23 (derecha de la imagen) (A); las inmunofluorescencias son imágenes representativas del marcaje de GFAP e Iba1 para visualizar las células microgliales contrateñidas con DAPI de retinas de ratones control y ratones *rd10* a P18 y a P23 (B). Se analizaron entre seis y ocho retinas para cada edad y grupo. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). GLS, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Barra de escala: 50 μ m; retinas control: C. Adaptada de Olivares-González y col. (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

IV.2.4. IV.2.4 La estabilización de HIF-1 α mejora la respuesta antioxidante a P18 en nuestras muestras

En estudios anteriores, ya hemos descrito que la respuesta antioxidante se encuentra disminuida en las retinas de los ratones *rd10* a P18 (Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). En este estudio analizamos si la estabilización de HIF-1 α presenta algún efecto sobre la respuesta antioxidante (TAC y actividades enzimáticas de SOD1, SOD2 y CAT). Corroboramos nuestros resultados previos observando una disminución de TAC y SOD1 en las retinas de los ratones *rd10* y un aumento de la actividad de CAT en los ratones *rd10* no tratados comparado con las retinas de los ratones control (Tabla 3). No encontramos diferencias significativas en la actividad de la SOD2. El tratamiento con DMOG parece restaurar la respuesta antioxidante con respecto a la observada en las retinas de ratones control (TAC, SOD1 y CAT), pero el efecto no llega a ser significativo en ninguno de los casos (Tabla 3). A P23 la TAC y SOD1 presentan valores similares en las retinas control y los *rd10* no tratados, pero SOD2 y CAT parecen aumentadas en las retinas de los *rd10* no tratados con respecto a los controles. En este aspecto, no encontramos ningún efecto beneficioso del DMOG (Tabla 3). Sin embargo, nuestros resultados indican que la estabilización de HIF-1 α utilizando DMOG previene de la pérdida de células fotorreceptoras, la gliosis reactiva, la activación de la microglía y restaura la respuesta antioxidante durante el pico máximo de degeneración retiniana (P18), a pesar de que el efecto desaparece a P23.

Tabla 3. Respuesta antioxidante en ratones *rd10* a P18 y P23 (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018).

Marcador		<i>Media (SD)</i>	
		<i>P18</i>	<i>P23</i>
TAC	<i>C</i>	124 (27)***	127 (37)
	<i>rd10</i>	97 (22)	140 (46)
	<i>rd10 +DMOG</i>	112 (32)	112 (25)
SOD1	<i>C</i>	6,8 (1,4)**	7,2 (1,7)
	<i>rd10</i>	5,5 (1,5)	6,8 (3,8)
	<i>rd10 +DMOG</i>	6,6 (2,3)	6,1 (2,9)**
SOD2	<i>C</i>	1,4 (0,6)	1,1 (0,3)*
	<i>rd10</i>	2,2 (1,3)	2,4 (1,8)
	<i>rd10 +DMOG</i>	2,8 (1,0)	1,7 (1,1)
CAT	<i>C</i>	7,6 (2,2)**	7,5 (2,9)
	<i>rd10</i>	10,1 (3,9)	9,8 (5,4)
	<i>rd10 +DMOG</i>	6,5 (1,5)	9,4 (4,4)

Las diferencias entre los ratones *rd10* (*rd10*) no tratados y los controles (C) o los ratones *rd10* tratados DMOG (*rd10+DMOG*) se analizaron mediante análisis GLS, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

**CAPÍTULO V: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL
TRATAMIENTO CON NUTRACÉUTICOS
ANTIOXIDANTES EN PACIENTES CON RP**

CAPÍTULO V: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NUTRACÉUTICOS ANTIOXIDANTES EN PACIENTES CON RP

En este estudio hemos evaluado el efecto de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre la progresión del deterioro de la función visual y sobre el estado antioxidante-oxidante en humor acuoso y sangre de pacientes con RP. El estudio no se considera un ensayo clínico con medicamentos, ya que entre la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica Independiente de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y la Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) determinaron que no se trataba de un medicamento sino de un nutraceutico y que, por tanto, este estudio debía regirse por la Ley Biomédica y no por el Real Decreto de Ensayos Clínicos con Medicamentos. El estudio se diseñó como un proyecto de investigación y fue aprobado por el Comité de Ético de Investigación Biomédica (CEIB) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe el 5 de noviembre de 2013 (nº registro: 2013/0388) y posteriormente modificado y aprobado el 15 de junio de 2016.

V.1. METODOLOGÍA

V.1.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio enmascarado a doble ciego en pacientes con RP típica en el que se evaluó el efecto de la administración oral durante dos años de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre el estado redox y la función visual. Se estudiaron un total de 25 pacientes adultos con RP típica, en un rango de edad comprendido entre 18 y 65 años, distribuidos aleatoriamente en dos grupos A (nutraceuticos) y B (placebo). Se realizaron estudios para determinar el estado redox en sangre y humor acuoso, la función visual en los pacientes y el estado nutricional de todos los participantes. En la Figura 27 se muestra el diagrama de flujo de los participantes del estudio. Los 33 pacientes reclutados inicialmente eran integrantes de la Asociación de afectados por RP de la Comunidad Valenciana (RETINACV) que fueron evaluados por el Servicio de Oftalmología del Hospital de Manises.

Como grupo control de muestras oculares, participaron sujetos que iban a someterse a una operación de cataratas sin enfermedad del polo posterior del ojo en el Hospital de Manises. Durante la operación se les extrajo una muestra de humor acuoso, previa autorización. Obtuvimos un total de 10 muestras control. Como grupo control de muestras de sangre, participaron 20 sujetos sanos sin enfermedad ocular o inflamatoria sistémica. En las encuestas nutricionales participaron un total de 38 pacientes con RP y 20 sujetos sanos. Todos los

participantes firmaron el correspondiente consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. El estudio fue evaluado y aprobado por el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (ref. 2013/0388 “Efecto de la administración de nutracéuticos sobre el estado antioxidante/oxidante en pacientes con retinosis pigmentaria”). Este proyecto formaba parte de un proyecto del ISCIII (PI15/0052).

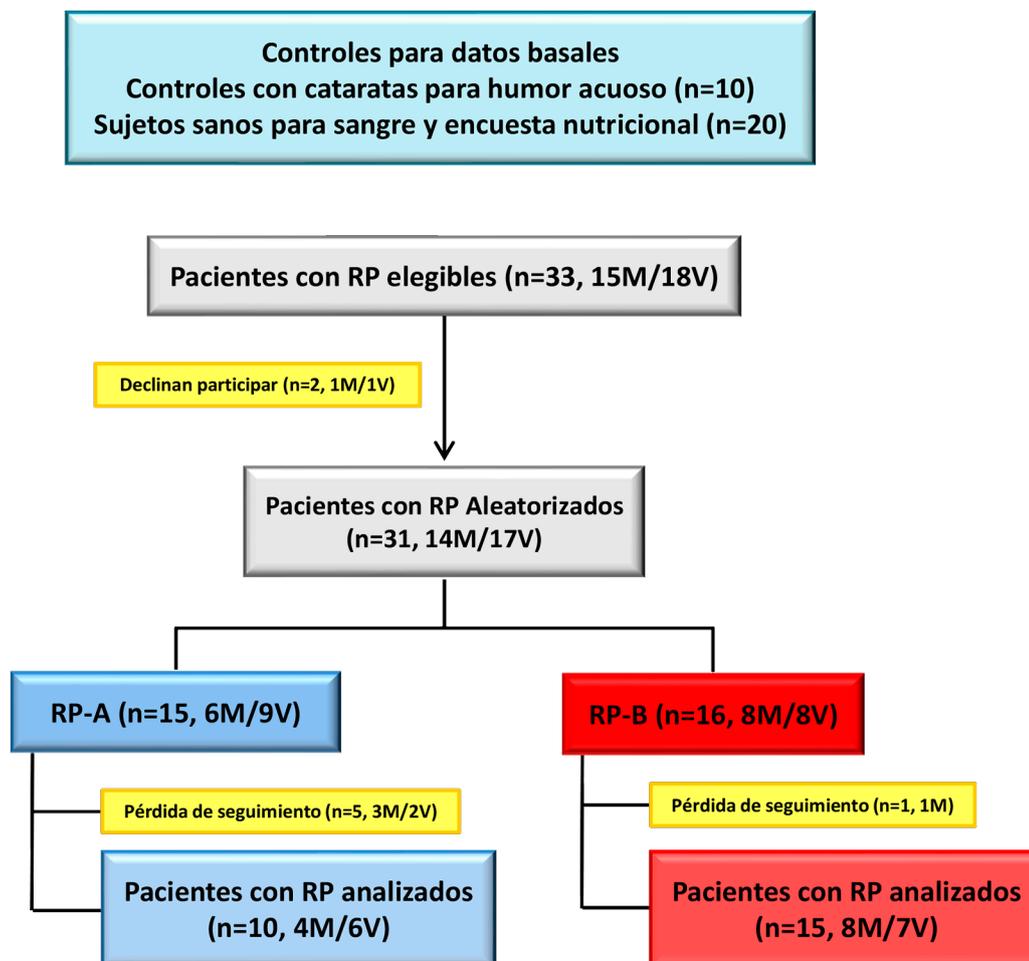


Figura 27. Diagrama de flujo de los participantes a través de las fases del estudio: entrada al estudio, asignación de la intervención, seguimiento, análisis de datos. M: mujer, V: varón.

En el estudio había tres objetivos concretos (Figura 28):

1. Evaluar el estado redox basal en pacientes con RP antes de la intervención con nutracéuticos.

Determinación basal de marcadores de respuesta antioxidante y de estrés oxidativo en sangre y humor acuoso. Se emplearon diversos kits para determinar actividades enzimáticas y marcadores de estrés oxidativo.

2. Evaluar el estado nutricional de pacientes con RP y de sujetos control.

Determinación del tipo de dieta habitual y su composición en sustancias antioxidantes. Se emplearon cuestionarios recordatorio ingesta 24 horas. El análisis de la dieta lo realizó una nutricionista utilizando el programa de nutrición denominado DIAL.

3. Evaluar el efecto de una mezcla nutraceutica con propiedades antioxidantes sobre la función visual y el estado redox en pacientes con RP.

Se evaluó a tres tiempos (basal, a los 12 meses y a los 24 meses) el estado redox en sangre y humor acuoso. Por otro lado, se realizaron diversas pruebas en el Servicio de Oftalmología del hospital de Manises para determinar la evolución de la función visual durante el tratamiento.

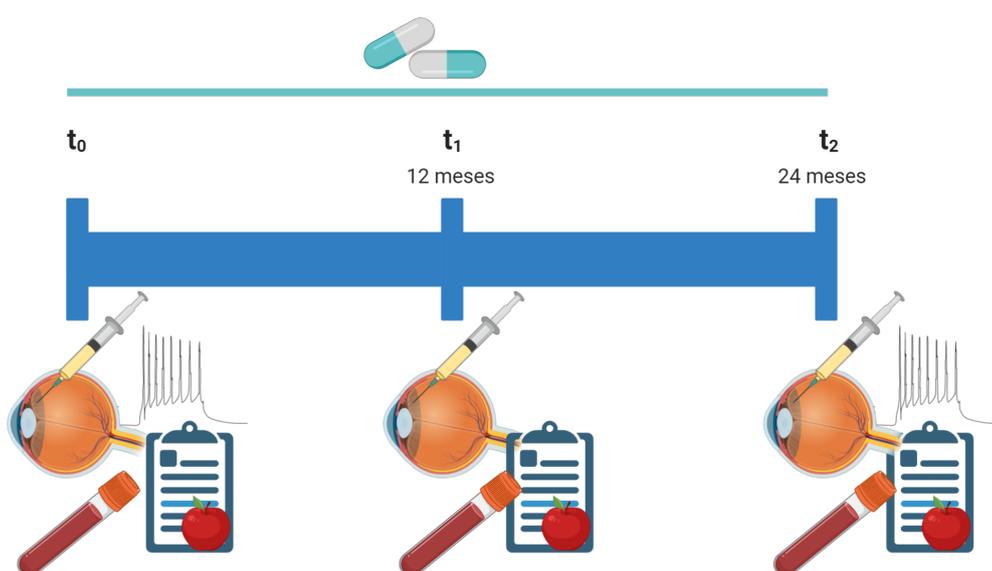


Figura 28. Esquema de la duración completa del estudio y tipos de muestras tomadas en los diferentes tiempos. Hecho con Biorender.

V.1.1.1. Criterios de inclusión

- Criterios oftalmológicos: diagnóstico clínico oftalmoscópico, campimétrico y electroretinográfico de RP típica; umbral final de adaptación a la oscuridad elevado; estrechamiento arteriolar retiniano, alteraciones pigmentarias características en media periferia; disminución concéntrica del CV y electroretinograma (ERG) reducido y retrasado.
- Criterios médicos y otros: mayores de 18 años; índice de Masa Corporal ≤ 40 y peso \geq al percentil cinco para cada edad, sexo y altura; los pacientes debían comprender la naturaleza del estudio y aceptar sus condiciones, firmando un consentimiento informado; estudios serológicos negativos para VHB, VHC, VIH.

V.1.1.2. Criterios de exclusión:

- RP atípica (RP en sector, RP paravenosa, Enfermedad de Refsum, Síndrome de Bardet-Biedl y Retinitis Puntata Albicans); pacientes con sordera congénita profunda; enfermedades oculares como glaucoma, retinopatía diabética, uveítis, cataratas subcapsulares posteriores mayores del 11% del área total del cristalino (P3 del LOCSIII) o sistémicas graves; pacientes que estuviesen tomando vitaminas u otros antioxidantes; embarazo o pacientes que al realizar una evaluación nutricional pudieran superar los límites de nivel superior de ingesta tolerable al darle la mezcla; trastornos alimentarios o psiquiátricos; enfermedades infecciosas activas o no infecciosas graves.

V.1.2. Participantes

Como se observa en el diagrama de flujo (Figura 27) inicialmente se reclutaron 33 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Los pacientes seleccionados se fueron incorporando progresivamente al estudio, realizándose previamente una evaluación energética y nutricional (para estimar el consumo natural de antioxidantes) y fueron asignados de forma aleatoria a cada uno de los dos grupos del estudio (A) o (B). En la Tabla 4 se incluyen las características de los participantes que finalizaron el estudio (25 pacientes con RP).

Tabla 4. Características participantes del estudio.

	Muestras Humor Acuoso		Muestras de Sangre		Análisis Nutricional		Tratamiento	
	<i>C</i>	<i>RP</i>	<i>C</i>	<i>RP</i>	<i>C</i>	<i>RP</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Nº Sujetos	10	25	20	33	20	38	10	15
Mujeres	5	11	12	15	13	16	3	8
Hombres	5	16	8	16	6	20	7	7
Edad (años) (Media±SD)	69±5	51±2	39±3	50±2	47±3	50±2	49±5	53±2

C: controles; A: tratamiento; B: placebo.

- **Grupo A:** Formado por 15 pacientes que recibirían la mezcla de nutracéuticos. Debido a diferentes complicaciones en el reclutamiento de los pacientes y a los abandonos que se han producido a lo largo del estudio por causas personales, el número final de pacientes pertenecientes a este grupo fue 10 (Figura 27).

- **Grupo B:** Inicialmente formado por 16 pacientes. El número final de pacientes para este grupo fue 15 (Figura 27). Estos pacientes recibieron un compuesto no antioxidante inocuo que consistía en el excipiente utilizado para el grupo A; celulosa microcristalina (98,05%) y sílice coloidal anhidra (1,95%).

Los pacientes del grupo A y B tomaron dos cápsulas de la mezcla nutraceutica con propiedades antioxidantes al día durante 24 meses. El periodo de seguimiento fue de dos años empezando a contar desde la toma de la primera cápsula (Figura 28).

V.1.3. Elaboración de las cápsulas

La mezcla de nutraceuticos antioxidantes fue diseñada por el Dr. José Miguel Soriano del Castillo, Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, CC. Aliment, Toxic.y Med. Legal y director de la Cátedra UNESCO de Estudios sobre el Desarrollo de la Universidad de Valencia. Los componentes fueron encapsulados en el Departamento de Farmacia del Hospital La Fe por la farmacéutica Mar Melero y bajo la supervisión de los facultativos Eduardo López Briz y Nieves Vila. Al tratarse de componentes antioxidantes, debieron tomarse las precauciones necesarias para evitar que se oxidasen. Por eso, las cápsulas se prepararon y suministraron mensualmente, o cada dos meses a los pacientes.

Cada cápsula de nutraceuticos contenía los siguientes compuestos: ácido fólico, vitamina B6, vitamina A, zinc, cobre, selenio, luteína y zeaxantina. Para establecer las concentraciones de cada uno de estos nutrientes se utilizaron los valores de ingestas de referencia para la población española en el año 2010. Además, para evitar riesgos de toxicidad para los pacientes, se empleó el parámetro de nivel superior de ingesta tolerable (*tolerable upper intake level*; UL) establecido en las Ingestas Alimentarias de Referencia (*Dietary Reference Intakes*; DRI) americanas. Para el caso de la luteína y la zeaxantina se trabajó con el documento del *Joint Expert Committee on Food Additives of the FAO/WHO* (JECFA), estableciéndose una ingesta diaria aceptable de luteína y zeaxantina de hasta 2 mg/kg p.c., que equivale a 120 mg/día para una persona de 60 Kg. Además, Shao y Hathcock en 2006 determinaron el Nivel Seguro Observado (*Observed Safe Level*; OSL) para la luteína en 20 mg/día (Shao y Hathcock 2006). La combinación de todos los componentes ayudaría al desarrollo visual y el normal funcionamiento ocular, la protección de los componentes celulares del daño oxidativo (vitamina A, zinc, cobre, selenio, luteína y zeaxantina), el mantenimiento de la visión normal (vitamina A y, el zinc), el correcto funcionamiento del sistema nervioso y el normal metabolismo de la homocisteína (vitamina B6 y ácido fólico).

V.1.4. Seguimiento

El periodo de seguimiento de los pacientes fue de dos años a contar desde la toma de la primera cápsula. Al año de comenzar con el tratamiento se realizó una analítica convencional para comprobar que los parámetros hematológicos y bioquímicos no estuviesen alterados. Asimismo, al menos un par de veces al año, se realizaron los cuestionarios de recordatorio de ingesta de 24h para evaluar el estado nutricional de los pacientes.

Las variables del estudio se evaluaron en tres momentos (tiempo (t_0 , t_1 , y t_2):

- t_0 : examen basal que se realizó como máximo dos semanas antes del inicio del tratamiento.
- t_1 : al año de tratamiento.
- t_2 : a la finalización del tratamiento, es decir, tras 24 meses de empezar a tomar las cápsulas.

V.1.5. Variables del estudio

Los exámenes oftalmológicos necesarios para determinar las variables del estudio se realizaron en el Servicio de Oftalmología del Hospital de Manises a t_0 , y t_2 . Durante todo el estudio se evaluó la presencia de posibles reacciones adversas, mediante entrevistas a los pacientes durante las consultas.

Los análisis bioquímicos se han realizado en tres tipos de muestras (Figura 27):

- Humor acuoso del ojo con peor visión (peor resultado del ERG) de pacientes con RP de los grupos A y B que se obtuvo a t_0 , t_1 y t_2 . Se extrajeron aproximadamente unos 150 μ L de humor acuoso en condiciones de esterilidad.
- Suero y plasma obtenidos por centrifugación de la sangre en las condiciones apropiadas (con o sin EDTA) de pacientes pertenecientes a los dos grupos a t_0 , t_1 , y t_2 .

Todas las muestras se alicuotaron tras la extracción y se almacenaron a -80°C con las sustancias adecuadas para preservar las moléculas que se fuesen a determinar posteriormente.

V.1.5.1. Variables oftalmológicas

- *Electrorretinograma multifocal (mERG)*: sumatorio de la amplitud en nV de la curva P1 de cada una de las 4 curvas resultantes del protocolo de análisis por cuadrantes del mERG (Retiscan, Roland Consult, Wiesbaden, Alemania). El mERG permite registrar múltiples respuestas de las diferentes zonas de la retina, permitiendo crear un mapa topográfico y funcional de la misma.

- *Tomografía de coherencia óptica (OCT)*: espesor de la zona más central de retina utilizando el protocolo de adquisición “*macular cube 512 × 128*” (Cirrus, Carl Zeiss Ophthalmic System, Inc, Dublín, Calif, Irlanda), que escanea un área de 6 x 6 mm. La OCT genera una fotografía de alta resolución de las diferentes capas de la retina.
- *Campo visual (CV)*: puntuación total en decibelios del CV obtenido a partir del programa 30-2, con estímulo luminoso V del analizador campimétrico Humphrey (Carl Zeiss Ophthalmic System, Inc, Dublín, Calif, Irlanda). El campo visual determina el área periférica que el ojo es capaz de registrar mientras enfoca un punto central.

V.1.5.2. Variables de la respuesta antioxidante y estrés oxidativo

- *TAC. Actividad enzimática de SOD3 y CAT*: Se determinaron en humor acuoso y sangre de pacientes y controles, del mismo modo que se ha descrito en el capítulo anterior. Los resultados de TAC se expresan en $\mu\text{mol/ml}$, los de SOD3 y CAT en nmol/min.mg proteína en humor acuoso y en U/ml para la SOD3 y nmol/min.ml para la CAT en plasma.

- *Actividad GPx*: Se determinó utilizando un kit comercial (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo determina de manera indirecta la actividad de la enzima mediante una reacción acoplada a la GR. El GSSG producido tras la oxidación del hidroperóxido por la GPX, es llevado a su estado reducido por la GR utilizando NADPH. La oxidación del NADPH a NADP^+ va acompañada de una disminución de la absorbancia. Cuando el paso limitante para la GPx es la velocidad de la reacción, la disminución de la absorbancia es proporcional a la actividad de la GPX en la muestra. Los resultados se expresan en nmol/min.ml .

- *Aductos de carbonilo*: El daño oxidativo también puede determinarse mediante la cantidad de grupos carbonilo en las muestras debidos a la presencia de proteínas carboniladas. Los grupos carbonilo se generan por oxidación de varias cadenas de aminoácidos en presencia de NOS y ROS. Las proteínas carboniladas son muy estables, por lo que permiten una medida bastante fiable del estrés oxidativo (Mañon Rossi, Garrido y col. 2016). Para ello, utilizamos un kit comercial (Protein Carbonyl Content Assay Kit, Abcam, ab235631, Cambridge, Reino Unido) que determina el contenido de proteínas carboniladas mediante una sonda fluorescente (Fluoroscein-5-Thiosemicarbazide, FTC), que reacciona covalentemente con los residuos oxidados, generando una señal fluorimétrica. La concentración de aductos de carbonilo se expresa en micromoles/ μl (μM).

- *Peróxidos lipídicos (TBARS)*: Los peróxidos lipídicos se descomponen para formar compuestos más reactivos y complejos, como el malonildialdehído (MDA) que puede unirse a proteínas y alterar su función. Empleamos la medida de formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la determinación de peroxidación lipídica en plasma, utilizando un kit comercial (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El MDA presente en las muestras reacciona con el ácido tiobarbitúrico a 90-100 °C, formando un aducto MDA-TBA que puede medirse a 530-540 nm. Los datos se interpolan con una curva patrón de malonildialdehído, y se expresan en $\mu\text{mol/ml}$.

- *Derivados del óxido nítrico (NO)*: Para determinar el contenido de NO intracelular medimos la cantidad de nitritos, su metabolito estable y nitratos mediante la reacción espectrofotométrica de diazotación de Griess (El-Mlili, Rodrigo y col. 2008) en plasma. Para determinar la cantidad de nitratos y nitritos presentes en las muestras se realiza una curva patrón de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), y los resultados se expresan en nmoles/ml.

- *Otros marcadores de daño oxidativo*: La determinación de los niveles de S-5-adenosyl-L-metionina (SAM), y de S-adenosil-L-homocisteína (SAH); de fenilalanina (Phe) y de las tirosinas 3-nitro-tirosina (N-Tyr), DL-o-tirosina (o-Tyr), y L-tirosina (p-Tyr) como marcadores de daño oxidativo en las proteínas, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) en la Unidad Analítica del IIS La Fe. El sistema UPLC-MS/MS consiste en un sistema Acquity UPLC (Waters, Manchester, Reino Unido), interconectado a un espectrómetro de masas Xevo TQ-S (Waters, Manchester, Reino Unido). Los datos fueron procesados utilizando el software Waters Masslynx 4.1 para los análisis cuantitativos (Carretero, León y col. 2014) .

V.1.5.3. Estado nutricional

Para evaluar el estado nutricional de los pacientes se realizaron dos tipos de encuestas diferentes, el recordatorio de 24 horas y el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

- *Recordatorio de 24 horas (R24H)*: Es un método subjetivo y retrospectivo que requiere una entrevista con el paciente que puede durar entre 20 y 30 minutos. Consiste en recordar, describir y cuantificar de forma precisa, la ingesta de alimentos y bebidas consumidas durante las 24 horas previas, o durante el día anterior a la entrevista, desde la primera ingesta de la mañana hasta la última de la noche. La información se recoge en un cuestionario preestablecido y debe describir el tipo de alimento, sus características y la cantidad consumida. También

permite incluir los complementos o suplementos alimenticios que se puedan estar añadiendo a la dieta (Salvador Castell, Serra-Majem y col. 2015, Foster y Bradley 2018).

Se realizaron como mínimo tres encuestas vía telefónica a cada participante del estudio, con intervalos mínimos de tres meses para establecer la ingesta habitual de nutrientes y estimar su consumo medio.

- *Capacidad antioxidante de la dieta (ORAC)*: La capacidad antioxidante de la dieta se determinó mediante la capacidad de absorción de radicales del oxígeno (*oxygen radical absorbance capacity*; ORAC). El ORAC de la dieta mide la capacidad de los antioxidantes presentes en los alimentos ingeridos para contrarrestar los radicales libres en el organismo (Limberaki, Eleftheriou y col. 2012). El valor ORAC para cada alimento permite realizar una aproximación del potencial antioxidante de la dieta habitual para cada individuo y se expresa en milimoles de equivalentes Trolox por gramo (mmol TroloxE/g). La capacidad antioxidante de la dieta se calculó utilizando el programa DIAL. Se trata de un programa que permite la evaluación y valoración de los alimentos consumidos juzgando su adecuación a las ingestas recomendadas. El programa dispone de diversas tablas de datos referentes a composición nutricional, medidas y raciones habituales o ingestas diarias recomendadas que permiten efectuar diferentes valoraciones dietéticas (Ortega, López-Sobaler y col. 2019). El aceite no fue incluido en la valoración a pesar de ser un alimento habitualmente consumido y con una importante contribución a la ingesta de energía y lípidos, debido a que su consumo en varios platos y varias veces al día dificultaba la estimación de su frecuencia. Por ello se optó por aplicar a todos los sujetos un consumo de 46 g/día de aceite (Trinidad Rodríguez, Fernández Ballart y col. 2008).

V.1.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software R (versión 3.4.0). Las comparaciones entre los grupos para evaluar las diferencias en la dieta y en los marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante entre pacientes y controles se realizaron mediante regresión lineal. El análisis del efecto del consumo de nutraceuticos sobre la función visual se realizó mediante análisis de regresión lineal bayesiana teniendo en cuenta la edad, el género, el consumo de tabaco, el ORAC de la dieta y el ojo. Para hacer comparaciones en ORAC entre controles y pacientes se empleó una prueba no paramétrica (Mann Whitney), ya que los datos no se distribuían normalmente. Un valor p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

V.2. RESULTADOS

V.2.1. Los pacientes con RP presentan un desequilibrio basal en el estado antioxidante-oxidante en humor acuoso y sangre periférica.

Como ya habíamos descrito anteriormente, los pacientes con RP presentan una alteración en el estado antioxidante-oxidante tanto en humor acuoso como en plasma. Debido a la limitación de volumen disponible de humor acuoso en este tipo de muestras determinamos TAC, SOD3, CAT y aductos de carbonilo. En plasma determinamos TAC, SOD3, CAT, GPx, NOx, TBARS, SAM, SAH y tirosinas (orto- y para-). Observábamos una disminución de la TAC en humor acuoso y un aumento de la formación de TBARS y disminución de la actividad SOD en sangre periférica (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013). En el estudio actual, hemos observado de nuevo una disminución basal en la respuesta antioxidante con menor TAC y menor actividad de SOD extracelular o SOD3 y CAT en humor acuoso de los pacientes de RP que en sujetos control. Estas determinaciones se realizaron en las muestras antes de comenzar el tratamiento (Figura 29A). Además, observamos un aumento significativo en la formación de aductos de carbonilo, un potente indicador de la presencia de estrés oxidativo (Figura 29B).

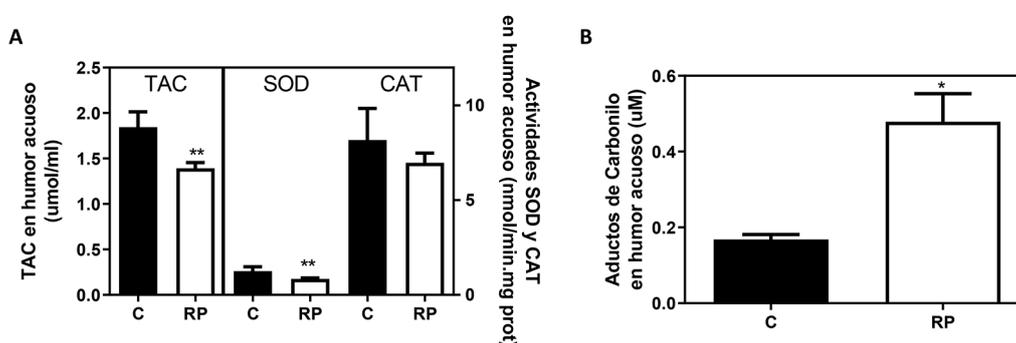


Figura 29. Respuesta antioxidante y estrés oxidativo basal en humor acuoso de controles y pacientes con RP. Capacidad antioxidante total y actividades SOD extracelular y CAT (A) y formación de aductos de carbonilo (B) en humor acuoso del grupo control y del grupo de pacientes con RP. Las determinaciones se realizaron en al menos nueve sujetos para el grupo control y 27 para el grupo RP. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Regresión lineal, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Grupo control: C; grupo RP: RP.

En plasma, también observamos una disminución de las actividades CAT y SOD3, aunque la diferencia no llega a ser significativa. No observamos cambios en la actividad de la enzima GPx (Figura 30). Sin embargo, la TAC parece estar ligeramente aumentada, en los pacientes con RP con respecto a los controles, hecho que posiblemente esté influenciado por la dieta, como veremos más adelante.

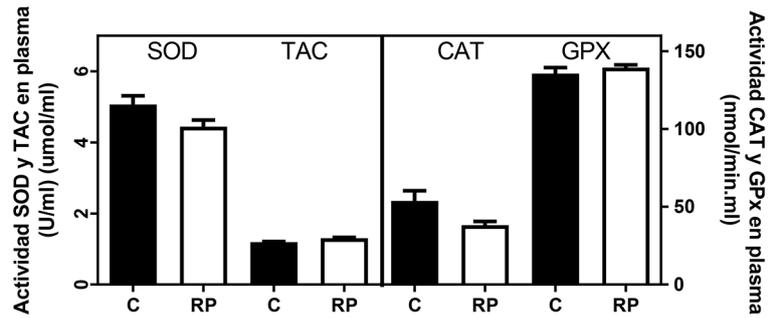


Figura 30. Respuesta antioxidante basal en plasma de controles y pacientes con RP. Capacidad antioxidante total y actividades SOD y CAT y GPX en plasma del grupo controles y del grupo de pacientes con RP. Las determinaciones se realizaron en al menos nueve sujetos para el grupo control y 24 para el grupo RP. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Regresión lineal. Grupo control: C; grupo RP: RP.

Otros indicadores de la presencia de estrés oxidativo también parecen estar aumentados en los pacientes con RP a nivel basal. En este caso, la diferencia no es significativa, posiblemente por el reducido número de pacientes del estudio, pero se observa una tendencia al aumento de la peroxidación lipídica (formación de TBARS) y a la formación de NOx en sangre (Figura 31A).

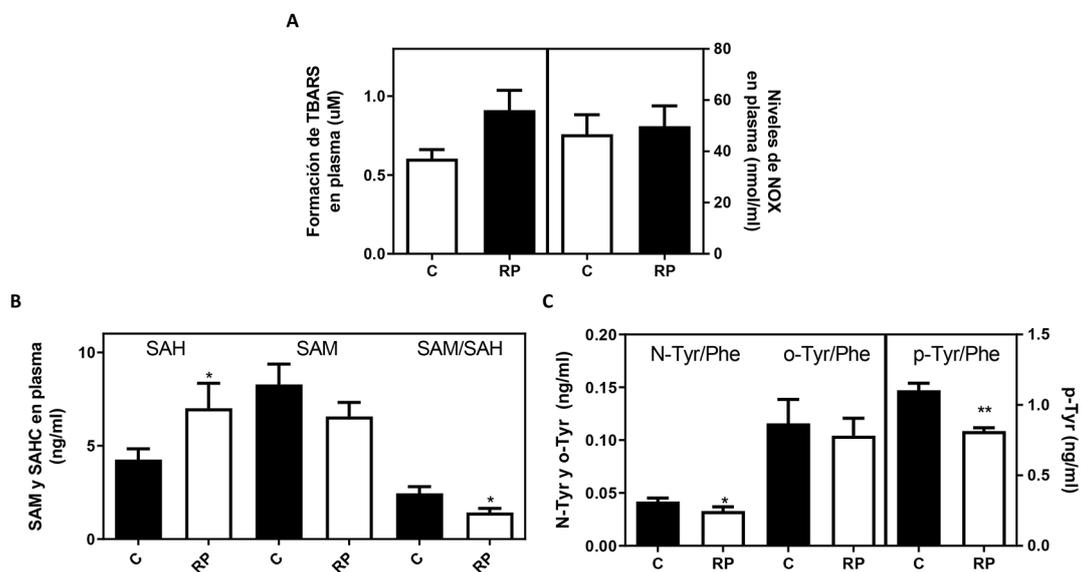


Figura 31. Estrés oxidativo basal en plasma de controles y pacientes con RP. Formación de TBARS (indicador de peroxidación lipídica) y NOx (metabolitos estables del óxido nítrico) (A), de SAM y SAH (indicadores de metilación) (B) y tirosinas (C) en plasma del grupo control y del grupo de pacientes con RP. Las determinaciones se hicieron en al menos diez sujetos para el grupo control y 20 para el grupo RP. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Regresión lineal * $p < 0.05$. Grupo control: C; grupo RP: RP; N-Tyr: 3-nitro-tirosina; o-Tyr: DL-o-tirosina; p-Tyr: L-tirosina.

SAM es un importante donante de grupos metilo y precursor de homocisteína, GSH, y de SAH. Una disminución de la síntesis de SAM puede afectar a la actividad normal de metilación y disminuir la síntesis de GSH afectando a la capacidad antioxidante normal del organismo (Panayiotidis, Stabler y col. 2009). El análisis de SAM realizado, sugiere que existe estrés oxidativo en el plasma, ya que el cociente entre ambos (SAM/SAH) es significativamente menor en pacientes con RP que en controles (Figura 31B).

El aumento de determinadas tirosinas como la nitro-, o la L-tirosina, es considerado un marcador de estrés oxidativo y se ha observado tanto en modelos animales como en diferentes patologías humanas (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013, Blanco, Hernández y col. 2017, Cuffe, Xu y col. 2017, Bavaresco, Schwalm y col. 2018, Grzesiak y Gaj 2018, Carvalho-Silva, Gomes y col. 2019), por lo que decidimos analizar los niveles de N-Tyr, o-Tyr y p-Tyr. Observamos una disminución significativa de la N- y de la p-tirosina en el plasma de pacientes con RP (Figura 31C). Sorprendentemente, los resultados de N-Tyr no corroboran los obtenidos previamente por el grupo (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013), por lo que intentaremos repetir el análisis en el futuro con un mayor número de muestras.

Estos resultados nos indican una alteración en el funcionamiento de las enzimas encargadas del mantenimiento redox de las células, que desencadena en una alteración del estado antioxidante-oxidante en los pacientes tanto en humor acuoso como en sangre, aunque más acentuado en el primero de los casos. Esto se debe posiblemente a la proximidad al lugar donde se está produciendo el proceso de degeneración, y a la dificultad de traspaso de sustancias a la sangre periférica que supone la barrera hemato-retiniana.

V.2.2. Los pacientes con RP presentan una dieta más rica en antioxidantes que la población control

Como parte de este estudio, la nutricionista Natalia Mejía realizó un análisis exhaustivo de la dieta de los pacientes con RP. En ella se valoró la composición en moléculas antioxidantes como las vitaminas A, D y E y los minerales Se, Zn y Fe. Para esta tesis doctoral nos centramos en los datos que nos indicaban el poder antioxidante global de la dieta, es decir el ORAC. Como vemos en la Figura 32 la TAC de la dieta, representada por los valores de ORAC, de los pacientes con RP, es estadísticamente superior a la observada en el grupo control. El análisis de los datos mostró que, en este caso, ni la edad ni el género influyen en el resultado. El valor de ORAC obtenido en ambos grupos (11318 ± 1480 nmol ET/gr/día, con $n=20$ en el grupo control y 19112 ± 2712 nmol ET/gr/día con una $n=38$) se comparó con el valor de ORAC considerado como la cantidad adecuada de consumo de antioxidantes diario que proporciona una dieta variada,

equilibrada y distribuida en tres comidas (19401 nmol ET/gr/día) (Román y Izquierdo 2012). En este sentido el ORAC de la dieta de los pacientes de RP se aproxima más al valor recomendado, lo que podría estar indicando que los pacientes se encuentran más preocupados por su estado antioxidante general, e intentan incluir en su dieta alimentos con mayor aporte antioxidante. Quizá esto podría estar influyendo, como hemos comentado anteriormente, en el aumento de TAC observado en sangre periférica y contrarrestar los efectos de la enfermedad a nivel sistémico. Al observar estos resultados, incluimos la variable ORAC de la dieta como un posible factor que podía influenciar los resultados obtenidos en el estado redox o función visual tras el tratamiento con nutraceuticos.

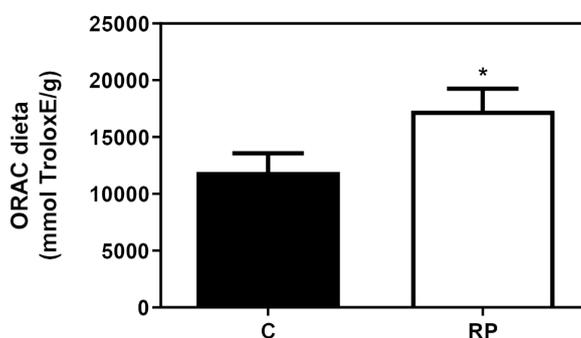


Figura 32. Capacidad antioxidante de la dieta (ORAC) en el grupo control y en el grupo de pacientes con RP. Las determinaciones se hicieron en 19 sujetos para el grupo control y 38 para el grupo RP. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Prueba U de Mann-Whitney, * $p < 0,05$. Grupo control: C; grupo RP: RP.

V.2.3. El tratamiento con la mezcla de nutraceuticos tiene efectos beneficiosos sobre el deterioro visual

Tras comprobar el desequilibrio en el estado antioxidante-oxidante y la presencia de un proceso inflamatorio asociado a la degeneración retiniana en los pacientes del estudio, evaluamos el efecto del tratamiento con la mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre el mERG, la OCT y el CV de los pacientes. Para ello se realizó un análisis de regresión lineal Bayesiana en el que se tuvo en cuenta la edad, el sexo, el consumo de tabaco, el ojo y el valor ORAC de la dieta. En la Tabla 5 se muestran los resultados del análisis estadístico en el que se observa el efecto del tratamiento B (placebo) con respecto al A (nutraceuticos) (ttB) y como afectó el transcurso de los dos años (tiempo 2), el sexo, la edad, el ORAC y el consumo de tabaco. Si observamos el dato "estimate", comprobamos que se detectó un efecto negativo del tratamiento B con respecto al A (-0.897), de la edad (-0.037), del consumo de tabaco (-3.132) y de la interacción del tiempo con el tratamiento B (placebo) (-2.482). Esto significaría que el

consumo de tabaco, tener más edad y pertenecer al grupo que tomaron placebo harían que los valores de mERG a los dos años sean peores que a tiempo cero.

Tabla 5. Resultados del análisis de regresión lineal obtenido con el programa R para la variable mERG

<i>Variables</i>	<i>Estimate</i>	<i>Std..Error</i>	<i>exp.Estimate</i>	<i>Lower.95.</i>	<i>Upper.95.</i>
<i>ttoB</i>	-0.897	1.394	0.408	0.026	6.751
<i>tiempo2</i>	0.538	0.704	1.712	0.445	6.826
<i>sexo</i>	1.238	1.298	3.448	0.267	46.134
<i>edad</i>	-0.037	0.057	0.963	0.854	1.077
<i>orac_dieta_miles</i>	0.042	0.093	1.043	0.869	1.254
<i>Tabaco1</i>	-3.132	1.512	0.044	0.002	0.813
<i>ttoB:tiempo2</i>	-2.482	0.993	0.084	0.012	0.575
<i>sd(Intercept)</i> <i>id_acuoso</i>	1.937	0.838	-	0.355	3.719
<i>sd(Intercept)</i> <i>id_acuoso:time</i>	2.101	0.603	-	0.996	3.319
<i>WAIC</i>	937.587	37.996			

*structure(list(formula = ordered(erg) ~ tto * tiempo + sexo + ORAC + tabaco + edad*

Dicho de otra manera, los pacientes que tomaron el tratamiento A, es decir, la mezcla de nutracéuticos, mostraron una tendencia a mejorar (+0.274) su mERG mientras que en los que tomaron tratamiento B éste disminuyó significativamente (-1.24). El intervalo de credibilidad fue [0,45-6,86] para A y [0,013-0,55] para B. Tras dos años, la probabilidad de que los pacientes que tomaron nutracéuticos tuviesen un mejor mERG era del 79%, mientras que la probabilidad de que los que tomaron placebo evolucionasen peor era del 99,7%. No observamos efecto de la dieta, pero si un efecto negativo del consumo de tabaco sobre la progresión del mERG, ya que provocó una disminución del mismo (análisis Bayesiano). En la Figura 33A se muestra la evolución de mERG en ambos grupos.

En cuanto al análisis de la OCT, observamos que en los datos obtenidos de la zona más central de la retina existía también una mejora del tratamiento A con respecto a B (en términos de probabilidades). En este caso la OCT de retina más central indicó que la probabilidad de que

evolucionasen peor los pacientes que tomaron placebo (B) respecto a los que tomaron nutraceuticos (A) era del 94%. La OCT se mantiene más constante durante los dos años en grupo que tomó nutraceuticos (A). En este caso, ni la dieta ni el consumo de tabaco presentan ningún efecto sobre la progresión de la OCT (Figura 33B).

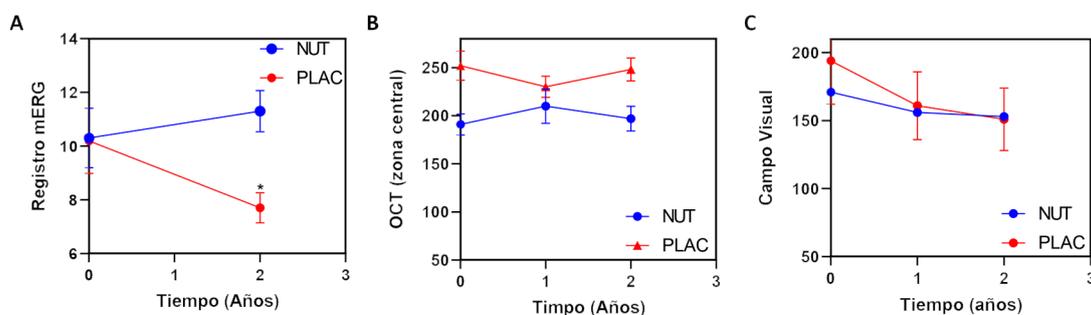


Figura 33. Efecto de la administración oral de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre la función visual de pacientes con RP: Resultado de las pruebas de mERG (A), de la OCT (B) y CV (C) en un total de diez pacientes que tomaron nutraceuticos (NUT) y 15 pacientes que tomaron placebo (PLAC) durante los dos años de duración del estudio. Regresión lineal bayesiana teniendo en cuenta la edad, el género, el consumo de tabaco, el ORAC de la dieta y el ojo.

También analizamos el efecto del tratamiento sobre el CV en ambos grupos. En este caso, el tratamiento con nutraceuticos no presenta ningún efecto beneficioso; tanto en los pacientes que han tomado nutraceuticos como en los que han tomado placebo, el CV parece empeorar con el tiempo (Figura 33C).

V.2.4. El tratamiento con la mezcla de nutraceuticos no tiene un efecto significativo sobre el estado redox

Como ya hemos descrito anteriormente, la respuesta antioxidante se encuentra disminuida en humor acuoso de pacientes con RP (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013). Tras comprobarlo en este trabajo, analizamos si el tratamiento con la mezcla de nutraceuticos antioxidantes conseguía disminuir el estrés oxidativo y restaurar la respuesta antioxidante en los pacientes. Solo se pudieron determinar TAC, SOD3 y CAT como marcadores de respuesta antioxidante y aductos de carbonilo como marcador de estrés oxidativo. El tratamiento con nutraceuticos antioxidantes no cambió significativamente la respuesta antioxidante endógena (TAC, actividades SOD3 y CAT) (Figura 34A). El análisis de regresión lineal Bayesiana reveló que el tiempo y la edad tienen tendencia a disminuir los valores de SOD3 en humor acuoso siendo esta tendencia mayor en aquellos pacientes que tomaron placebo, es decir, la probabilidad de que la actividad SOD3 baje más en el grupo placebo (B) que en el de nutraceuticos (A) era del

99%. Sin embargo, observamos que había una tendencia a una menor formación de aductos de carbonilo en el grupo de pacientes que habían tomado nutraceuticos aunque no se reducen a los niveles observados en los controles (Figura 34B).

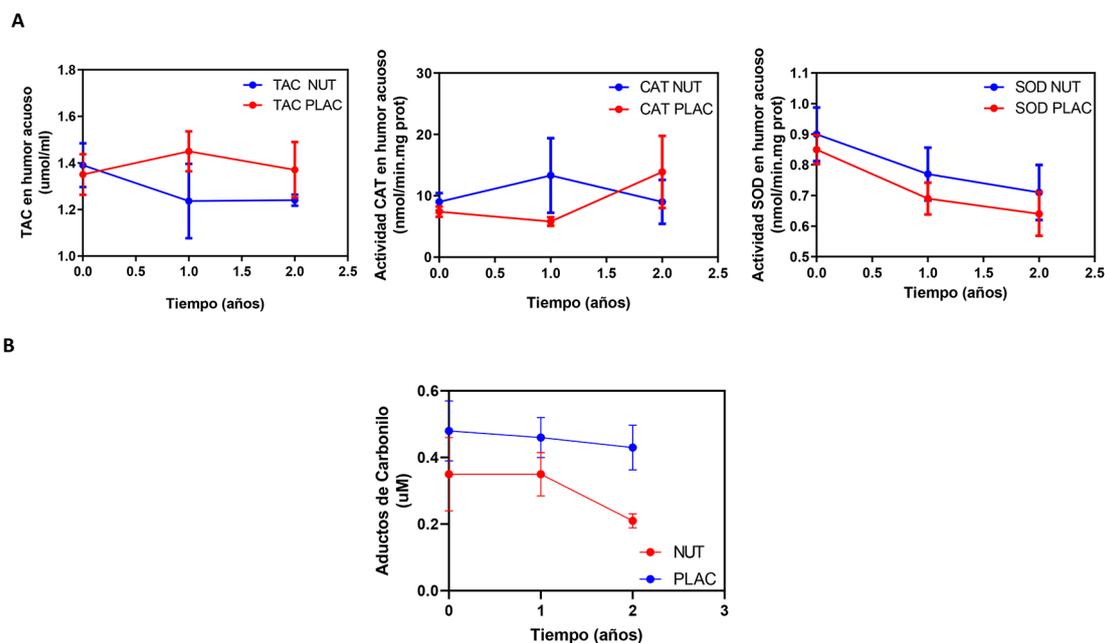


Figura 34. Efecto de la administración oral de una mezcla de nutraceuticos antioxidantes sobre la respuesta antioxidante y estrés oxidativo en humor acuoso de pacientes con RP. TAC y actividades CAT y SOD3 (A) y formación de aductos de carbonilo (B) en humor acuoso de pacientes que tomaron nutraceuticos (NUT) y pacientes que tomaron placebo (PLAC) durante los dos años de duración del estudio. Las determinaciones se hicieron en al menos seis sujetos para el grupo control y trece para el grupo RP. Regresión lineal. Tiempo cero: T0; un año de tratamiento: T1; dos años de tratamiento: T2.

En este estudio no se pudo analizar el efecto del tratamiento sobre los mediadores inflamatorios en humor acuoso al no disponer de suficiente muestra.

En plasma determinamos los marcadores TAC, SOD3, CAT, GPx, NOx, TBARS, SAM y SAH, y observamos que el tratamiento con nutraceuticos no tuvo efecto significativo sobre ninguno de ellos.

Esperamos poder determinar algún marcador más que pudiese reflejar el efecto del tratamiento. También esperamos finalizar el estudio con la determinación de marcadores inflamatorios en plasma.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

La retinosis pigmentaria es un grupo de degeneraciones hereditarias de la retina. Sin embargo, existen diferentes procesos celulares como la inflamación o el estrés oxidativo que pueden exacerbar o aumentar la muerte de las células fotorreceptoras (Viringipurampeer, Bashar y col. 2013, Kruk, Kubasik-Kladna y col. 2015), ya que numerosos estudios muestran que la degeneración retiniana va acompañada de un aumento de TNF α , ROS y RNS (Yoshida, Ikeda y col. 2013a, Campochiaro y Mir 2018).

En esta tesis se presentan distintas aproximaciones terapéuticas de neuroprotección que tienen como objetivo retrasar la degeneración retiniana independientemente del defecto genético. Evaluamos el efecto de la inhibición de TNF α con anticuerpos anti-TNF α (Capítulo III) y de la estabilización de HIF-1 α con DMOG (Capítulo IV) en un modelo de RP recesiva, el ratón *rd10*. Finalmente, evaluamos el efecto del consumo de una mezcla de nutracéuticos con propiedades antioxidantes sobre el estado redox y función visual en pacientes con RP (Capítulo V).

La oxidación de lípidos, proteínas y ADN derivada del estrés oxidativo generado tras la muerte de los bastones, puede contribuir entre otros factores a activar la microglía y desencadenar un proceso inflamatorio, que si se prolonga en el tiempo, también puede contribuir al proceso de degeneración retiniana (Roy, Jana y col. 2008, Rojo, McBean y col. 2014). Las crecientes evidencias de la implicación de los procesos inflamatorios crónicos en la progresión de la enfermedad, principalmente por su influencia en la muerte de los conos que supone un gran problema para los pacientes porque implica la pérdida de la visión central, han hecho que el bloqueo farmacológico de estas moléculas inflamatorias o la inhibición de las células gliales sean unas dianas terapéuticas muy estudiadas actualmente (Peng, Xiao y col. 2014, Zhao, Zabel y col. 2015, Massengill, Ahmed y col. 2018, Zhang, Cui y col. 2018). En el Capítulo III hemos mostrado la implicación de la inflamación en el proceso degenerativo de pacientes con RP y de retinas de ratones *rd10*. Otros autores han observado el aumento de diversas citoquinas en el ojo de pacientes con RP. En este trabajo empleamos un ELISA multiplex para determinar los niveles basales de las citoquinas IFN- γ , TNF α , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL1- β , IL-2, IL-4 e IL-6 en humor acuoso de pacientes. Tras el análisis, solo pudimos cuantificar tres de ellas, ya que el resto estaba por debajo del nivel de detección. Observamos un aumento de IL-10 y de IL-6 y TNF α (aunque no significativo) que confirmaría que existe un proceso inflamatorio en los pacientes de RP (Gupta, Brown y col. 2003, Zeng, Zhu y col. 2005, He, Bui y col. 2008, Sasahara, Otani y col. 2008, Ebert, Weigelt y col. 2009, Sheets, Jun y col. 2013, Yoshida, Ikeda y

col. 2013b, Yoshida, Ikeda y col. 2013a, Murakami, Yoshida y col. 2015, Appelbaum, Santana y col. 2017, Murakami, Ikeda y col. 2018, Ten Berge, Fazil y col. 2019).

Del mismo modo que ocurre en nuestro modelo animal, en el que se produce un aumento de los marcadores inflamatorios justo antes del pico de degeneración retiniana (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018), otros autores han encontrado que la activación de la microglía y el pico del proceso inflamatorio coinciden o preceden a la muerte de las células fotorreceptoras (Al-Gayyar y Elsherbiny 2013, Yoshida, Ikeda y col. 2013b). En estudios anteriores observamos una correlación positiva entre el TNF α y la función visual de los pacientes, pues aquellos en los que encontramos un nivel más elevado de TNF α , presentaban una mejor función visual. Los resultados obtenidos en ratones apoyan estos resultados, ya que en los pacientes también podría estar produciéndose un incremento de TNF α previo a la muerte de los fotorreceptores y después descendería conforme va progresando la degeneración. Es decir, observamos niveles elevados de TNF α en pacientes en los que todavía no está afectada la función visual de forma severa (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013).

En estudios previos utilizamos el TNF α como posible diana terapéutica para el tratamiento de la RP (Martinez-Fernandez de la Camara, Sequedo y col. 2013, Martinez-Fernandez de la Camara, Olivares-Gonzalez y col. 2014, Martinez-Fernandez de la Camara, Hernandez-Pinto y col. 2015). Tras el bloqueo del TNF α con varias inyecciones intraperitoneales de ADA, la muerte de los fotorreceptores y la gliosis reactiva disminuyeron en retinas de ratones *rd10* de 18 días postnatales. Sin embargo, el efecto no fue duradero, y dejó de observarse esta neuroprotección a P20. Además, debido a que las inyecciones intraperitoneales podían ocasionar efectos sistémicos secundarios, como ocurre en la administración prolongada en humanos, decidimos cambiar la vía de administración. Por eso, optamos por evaluar el efecto del tratamiento realizando una inyección única intravítrea, disminuyendo así los posibles efectos secundarios, puesto que el ojo es un órgano inmunoprivilegiado y aumentando la efectividad temporal del tratamiento (Capítulo III).

Por otro lado, el mecanismo de muerte de los fotorreceptores no estaba claro y queríamos profundizar en su conocimiento. Como ocurre en otros tipos de degeneraciones retinianas, sabíamos que se producían diferentes procesos de muerte celular en RP y que existían varios autores trabajando en dilucidar los procesos de muerte secundaria por los que se mueren los conos tras la muerte de los bastones. Los mecanismos propuestos hasta el momento eran la apoptosis y la necroptosis para la muerte de los bastones y los conos respectivamente (Murakami, Matsumoto y col. 2012). Hasta hace algunos años solo se conocían dos mecanismos

básicos de muerte: apoptosis y necrosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular mediado por caspasas, que puede ser activada por la vía intrínseca o por la vía extrínseca, como ya se ha comentado. La necrosis por su parte es un proceso de muerte celular descontrolado o al menos eso se pensaba hasta hace unos años. Posteriormente, se ha demostrado la existencia de otros tipos de muerte, como la necroptosis, la ferroptosis, el parthanatos, o la piroptosis, que pueden actuar como impulsores de la muerte celular necrótica “programada o regulada” durante las degeneraciones retinianas, como la degeneración macular asociada a la edad o la RP (Yoshida, Ikeda y col. 2013a, Gao, Cui y col. 2018, Totsuka, Ueta y col. 2019). La necroptosis es una forma regulada de necrosis mediada por los receptores de muerte. Esta forma de necrosis se caracteriza morfológicamente por hinchazón de la célula, seguida de la rotura de la membrana plasmática. Típicamente se desencadena por estímulos como la unión a sus receptores del TNF α , que conduce a la activación de RIPK1. Por lo tanto, el TNF α puede inducir tanto apoptosis como necroptosis. Además, altos niveles de TNF α o estrés oxidativo también podrían activar la enzima PARP1, dando lugar a otro tipo de muerte celular denominada parthanatos, mediada por la hiperactividad de esta enzima (Lindahl, Satoh y col. 1995). A parte de su papel en la reparación del daño del ADN, PARP1 modula los procesos neuroinflamatorios en las células gliales (Chiarugi y Moskowitz 2003). Por ejemplo, es indispensable para la activación de la microglía mediada por NF- κ B y la transcripción de IL-1 β o TNF α (Chiarugi y Moskowitz 2003, Nakajima, Nagaso y col. 2004). Sin embargo, la hiperactividad de PARP1 puede agotar el almacenamiento celular de ATP y NAD⁺ tratando de reparar el ADN dañado. Esta depleción conduciría a un colapso bioenergético y a una muerte celular necrótica. Por otra parte, PARP1 también podría inducir la muerte celular programada, a través de la producción de polímeros PAR, que estimularían a las mitocondrias para liberar AIF, que induciría la muerte celular (Cregan, Fortin y col. 2002, Hong, Dawson y col. 2004, Yu, Andrabi y col. 2006). Este mecanismo parece ser independiente de las caspasas.

Para estudiar los mecanismos de muerte que podría mediar el TNF α en fotorreceptores realizamos un estudio *in vitro* en células 661W. Hemos observado que la exposición a TNF α *in vitro* induce la muerte celular, la activación de las caspasas 3 y 8 y cambios en la actividad de PARP en células 661W derivadas de conos de ratón. La activación de la caspasa 3 también ha sido observada por otros grupos, sugiriendo que el TNF α induce la muerte celular, por mecanismos dependientes de caspasas, al menos, parcialmente. Además, el TNF α aumenta la formación de polímeros de PAR en estas células. PARP1 es la proteína diana más importante para la parilación (Rouleau, Patel y col. 2010), y la autoparilación inhibe PARP1 debido a la carga negativa de los polímeros de PAR que altera la estructura de la enzima (Bai 2015). Por lo tanto, es posible que la actividad reducida de PARP1 sea una consecuencia de esta autoparilación. Por

otra parte, la reducción de la actividad de PARP1 podría deberse a su escisión por caspasa 3, 7 o incluso 1 (Kaufmann, Desnoyers y col. 1993, Lazebnik, Kaufmann y col. 1994, Tewari, Quan y col. 1995, Margolin, Raybuck y col. 1997, Fischer, Janicke y col. 2003). PARP1 se escinde por caspasa 3 al principio del proceso de apoptosis en muchas líneas celulares diferentes. La escisión de PARP1 resultaría en una enzima inactiva para prevenir su reclutamiento a sitios de daño del ADN y se produciría para prevenir el agotamiento de la energía (NAD⁺ y ATP), que es necesario para las etapas posteriores de la apoptosis. También se cree que la escisión PARP1 impide la reparación de las roturas de las hebras de ADN durante el programa apoptótico (Kaufmann, Desnoyers y col. 1993, Lazebnik, Kaufmann y col. 1994, Schlegel, Peters y col. 1996, Margolin, Raybuck y col. 1997, Wang, Stingl y col. 1997). Aunque los resultados no se muestran en este trabajo, analizamos el efecto del inhibidor de PARP, olaparib, sobre la muerte celular inducida por TNF α y obtuvimos resultados similares a los de otros estudios. La activación de PARP inducida por TNF α y el uso de inhibidores para esta enzima no reducen la muerte celular inducida por TNF α en células L929, Jurkat, HT-29 y NIH3T3 (fibroblastos) (Sosna, Voigt y col. 2014). A parte de activación de caspasas y aumento de polímeros PAR, la muerte celular inducida por TNF α va acompañada de un aumento en la actividad de la caspasa 1, de RIPK3 y disminución de RIPK1 en estas células. El tratamiento con ADA aumenta la supervivencia celular, disminuyendo la actividad de la caspasa 3 y normalizando el contenido de RIPK1 y la actividad de PARP. En las células 661W, el TNF α exógeno parece activar mecanismos dependientes de caspasa, pero no el proceso de necroptosis después de la exposición durante 24h.

Aunque los estudios *in vitro* nos aportaron información sobre los procesos de muerte que puede mediar el TNF α , debíamos determinar si ocurría algo similar *in vivo* donde existen otros factores que pueden contribuir a la muerte. Evaluamos estos mecanismos en retinas de ratón *rd10* a P23 y el efecto de ADA intravítreo sobre estos mecanismos. En las retinas de ratón *rd10* observamos activación de las caspasas 1 y 3, acumulación de polímeros de PAR, aumento de la proteína RIPK3 y disminución de la proteína RIPK1 a P23 como ocurría *in vitro* en células 661W expuestas a TNF α . A esta edad postnatal, sugerimos que las células fotorreceptoras estarían degenerando por mecanismos dependientes de caspasa o por sobre-activación de PARP (parthanatos). Sin embargo, el papel de las caspasas es controvertido en la RP. Varios autores han propuesto un desajuste en las actividades de las caspasa 3 y 8 y la liberación del citocromo C mitocondrial en modelos de RP como ratas transgénicas *S33ter*, ratones *tubby* o ratones *rd8* (Bode y Wolfrum 2003, Lohr, Kuntchithapautham y col. 2006, Kaur, Chauhan y col. 2011, Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019). Por otra parte, se han encontrado otros mecanismos dependientes de la caspasa 3 implicados en la muerte de los bastones en ratones

rd o ratas P23H (Cottet y Schorderet 2009, Kaur, Mencl y col. 2011). En este caso, la caspasa 3 también se vio alterada. Una única dosis intravítrea ADA redujo significativamente la acumulación de polímeros de PAR, a las dos concentraciones de ADA ensayadas, pero se produjo un aumento de la actividad de las caspasas a la concentración de ADA más alta. A diferencia de los estudios *in vitro* en los que los mecanismos apoptóticos mediados por caspasas son los principales efectores de la muerte celular, la sobre-activación de PARP (parthanatos) parece ser una importante promotora de la muerte celular en las retinas de los ratones *rd10* a P23.

Un hallazgo importante en nuestro estudio es el desequilibrio entre RIPK1 y RIPK3. Se observó una disminución de la proteína RIPK1 en las células de retina expuestas a TNF α y de su expresión génica en las retinas de los ratones *rd10*. RIPK1 puede mediar necroptosis, apoptosis e inflamación (Wegner, Saleh y col. 2017). RIPK1 se recluta por el TNFR1 para mediar la señalización pro-inflamatoria y regular la muerte celular inducida por TNF α (Polykratis, Hermance y col. 2014). La interacción RIPK1/RIPK3 es un paso esencial para activar la necroptosis. RIPK1 activado puede asociarse con RIPK3 para inducir necroptosis dependiente de MLKL y la producción de citoquinas inflamatorias, o reclutar FADD (proteína asociada a Fas con dominio de muerte) y activar la caspasa 8 para inducir apoptosis. La deficiencia de RIPK1 produce sensibilidad a la apoptosis inducida por TNF α en lugar de necroptosis (Polykratis, Hermance y col. 2014, Wegner, Benson y col. 2017). Otros estudios de deficiencia de RIPK1 señalan que RIPK1 suprime la apoptosis dependiente de caspasa 8 en algunos tipos celulares, y la necroptosis dependiente de RIPK3/MLKL en otros. Por otra parte, la eliminación de RIPK1 a corto plazo aumenta las citoquinas inflamatorias, mientras que a largo plazo lleva a la apoptosis mediada por caspasa 3 en condrocitos primarios (Qiu, Zhuang y col. 2019). En las retinas de los ratones *rd10* mostramos que una disminución de RIPK1 podría ser en parte responsable de la activación de la apoptosis, en lugar de la activación de la necroptosis e incluso de la inflamación a P23.

Por otro lado, observamos un aumento de la proteína RIPK3 en las células de la retina expuestas a TNF α y de su expresión génica en las retinas de ratones *rd10* a P23. RIPK3 es una serina/treonina quinasa esencial para la necroptosis, pero que también puede producir inflamación sin que se produzca la muerte de células necroptóticas. Después de su fosforilación, RIPK3 activa al ejecutor de necroptosis MLKL, pero también regula funciones no necroptóticas como NF- κ B, la activación inflamatoria y la apoptosis independiente de quinasas (Moriwaki y Chan 2017). La participación de la necroptosis en la muerte de células fotorreceptoras durante la PR sigue siendo controvertida. Por ejemplo, Viringipurampeer y col. propusieron que el principal impulsor de la muerte temprana de los bastones era un proceso dependiente de caspasa, mientras que la muerte de conos se producía por necroptosis dependiente de RIPK3 en

el modelo de rata *S334ter* (Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019). Los mismos autores describieron que la necroptosis primaria estaba implicada en la muerte precoz de bastones, mientras que la pérdida de los conos se produce a través de la activación inflamatoria en ratas P23H (Viringipurampeer, Gregory-Evans y col. 2019). Otros estudios sugieren que los procesos de apoptosis ocurren en las primeras etapas de la degeneración de los bastones, pero la necroptosis mediada por RIPK3 es la responsable de degeneración de los conos en etapas posteriores (a partir de P35) en ratones *rd10* (Murakami, Matsumoto y col. 2012). A partir de P35, en las retinas de los ratones *rd10* se encontró una alteración de RIPK1 y RIPK3 (Murakami, Matsumoto y col. 2012, Yang, Fu y col. 2017). Estos autores mostraron que la expresión génica y el contenido de proteína RIPK1 y RIPK3 no cambia a P21 en ratones *rd10*. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos una expresión desequilibrada de estos dos componentes principales de la vía de necroptosis en las retinas de los ratones *rd10* a P23. En parte estamos de acuerdo con ellos en que la muerte de las células podría ser causada por apoptosis, pero también por la activación de PARP a P23. No obstante, creemos que RIPK3 está jugando un papel clave en la activación del inflamasoma NLRP3 que, a su vez, podría promover otro tipo de muerte celular, la piroptosis. Nuestro estudio se ha llevado a cabo en las primeras etapas de la RP, a P23, cuando los conos todavía están vivos y la muerte masiva de células se debe a la degeneración de los bastones. El bloqueo de la señalización por TNF α no afecta a la expresión génica de RIPK1, pero reduce la expresión génica de RIPK3 en la retina de los ratones *rd10*.

Encontramos una alteración de algunos componentes del inflamasoma NLRP3 (caspasa 1, NLRP3 e IL-1 β) en las retinas de los ratones *rd10*. La elevada actividad de la caspasa 1, la proteína NLRP3 y la IL- β sugieren que la degeneración de la retina se acompaña de una activación inflamatoria NLRP3 a esta edad postnatal. Altos niveles de TNF α y estrés oxidativo y nitrosativo pueden activar PARP y el inflamasoma NLRP3, dando lugar a necroptosis, ferroptosis o piroptosis (Rodríguez-Vargas, Ruiz-Magana y col. 2012, Abais, Xia y col. 2015, Cao y Dixon 2016). RIPK3 puede activar el inflamasoma NLRP3 e inducir un aumento de la expresión de ASC y de la caspasa 1 activada con la consecuente secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, resultando en piroptosis (Malik y Kanneganti 2017, Moriwaki y Chan 2017). Algunos autores también han descrito la activación del inflamasoma en modelos murinos y caninos de RP como P23H, *rd1*, *rcd1* o *xlpra2* (Syeda, Patel y col. 2015, Viringipurampeer, Metcalfe y col. 2016, Appelbaum, Santana y col. 2017). Además, el inflamasoma NLRP3 está implicado en la progresión de otras degeneraciones de la retina como la degeneración macular asociada a la edad o la retinopatía diabética (Kauppinen, Paterno y col. 2016, Akhtar-Schafer, Wang y col. 2018, Yerramothu, Vijay y col. 2018). En nuestro estudio, una única dosis intravítrea de ADA no

sólo reduce la hiperactividad de PARP, sino que también reduce el aumento de RIPK3, NLRP3 e IL1- β , lo que sugiere que el bloqueo de la señalización iniciada por TNF α inhibe la activación inflamatoria NLRP3. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar este punto.

Como ya hemos descrito previamente, la degeneración de la retina se acompaña de gliosis reactiva y activación de microglía en diferentes días postnatales, incluyendo P23. En nuestro caso el ADA no evitó el aumento de GFAP como marcador de la gliosis reactiva, pero impidió la activación de la microglía a ambas concentraciones (Bringmann, Pannicke y col. 2006, Langmann 2007). PARP regula la activación microglial a través de NF- κ B (Stoica, Loane y col. 2014, Xu, Wang y col. 2016) y por ello, consideramos que el ADA podría prevenir la activación de microglía a través de la inhibición de PARP.

Por lo tanto, proponemos diferentes mecanismos implicados en la muerte celular en ratones *rd10* en etapas intermedias de la enfermedad (P23) (Figura 35). La sobreactivación de la enzima PARP (parthanatos) parece ser el principal contribuyente a la muerte celular a esta edad, pero los mecanismos dependientes de caspasas (apoptosis) también parecen estar implicados en el proceso, aunque en menor medida. Además, RIPK3 podría promover la activación del inflammasoma NLRP3 y, de esta forma, la muerte celular mediada por mecanismos no necroptóticos como la piroptosis. Los mecanismos de muerte y la relación entre ellos durante el proceso de degeneración retiniana en RP parecen ser muy complejos. La idea más extendida entre muchos autores es que los procesos predominantes durante las primeras etapas de la enfermedad (muerte de los bastones) son principalmente procesos apoptóticos, mientras que los procesos necroptóticos y piroptóticos predominan en las etapas siguientes (muerte de los conos). Sin embargo, hemos visto que la implicación de PARP (parthanatos) en la degeneración retiniana también es importante, como sugieren otros autores (Paquet-Durand, Silva y col. 2007, Paquet-Durand, Sanges y col. 2010). Por ello, creemos que existe una interacción compleja de todos estos procesos a lo largo del proceso de degeneración y que es importante profundizar en ellos y determinar en qué momento de la patología predomina cada uno.

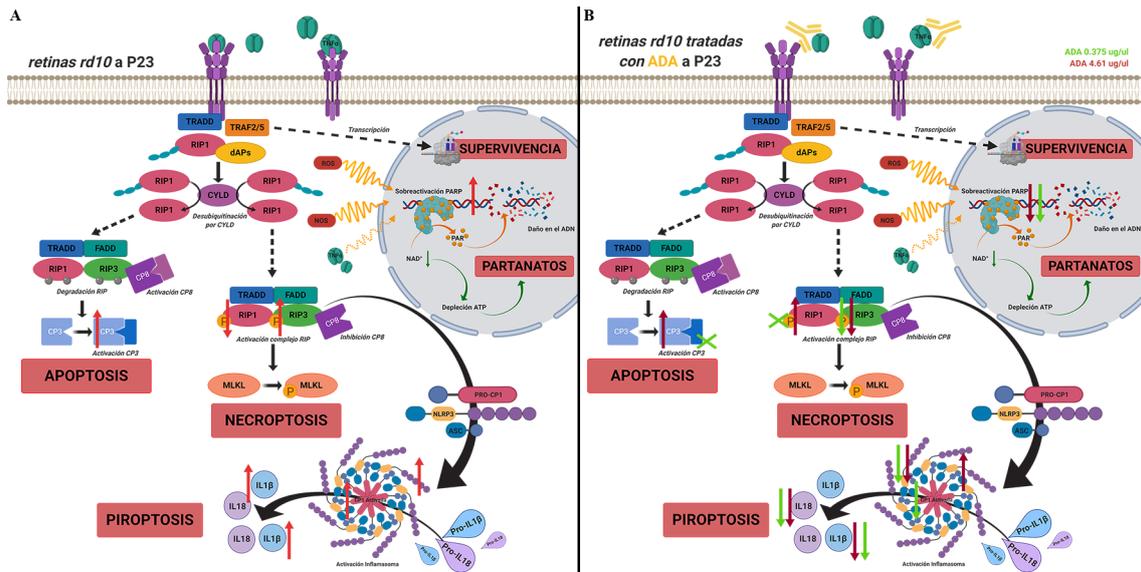


Figura 35. Esquema de los posibles mecanismos implicados en la muerte celular inducida por TNF α en retinas de ratones *rd10* a P23 (A) y efecto de la administración intravítrea de ADA sobre los mecanismos de muerte en retinas de ratones *rd10* a P23 (B). El TNF α puede activar diferentes vías de muerte en las células. En la vía TNF α /TNFR1, el TNF α se une a su receptor TNFR1. El dominio intracelular del TNFR1 recluta a la proteína adaptadora TRADD, que a su vez recluta a TRAF2 y RIPK1 para formar el complejo 1. Este complejo es importante en la activación de NF- κ B. El complejo 1 se disocia de TNFR1 e integra a la proteína FADD y la pro-caspasa 8 para formar el complejo 2. La asociación FADD/CP8 depende de que RIPK1 esté fosforilado. La CP8 activa induce la activación de la CP3 y la apoptosis. En la formación del complejo 1, NF- κ B regula la expresión de genes anti-apoptóticos y bloquea la iniciación de la apoptosis por el complejo 2. La necroptosis también puede estar mediada por la vía de señalización del TNF α . Bajo condiciones apoptóticas, la CP8 activada previene la señalización necroptótica cortando e inactivando RIPK1 y RIPK3. En cambio, cuando la CP8 está inactiva, RIPK1 recluta a RIPK3 y forman un complejo que desencadena procesos de necroptosis. RIPK3 fosforila la proteína MLKL, que se trasloca a la membrana celular e induce la necroptosis al provocar su permeabilización, lo que provoca la entrada de Ca $^{+}$ y Na $^{+2}$ en la célula. RIPK3 también puede promover respuestas inflamatorias mediadas por el inflammasoma NLRP3. El TNF α o el estrés oxidativo pueden activar la vía de muerte denominada parthanatos que implica la hiperactivación de PARP1. PARP1 acopla polímeros de PAR a proteínas receptoras y componentes de la maquinaria de reparación de ADN. La hiperactividad del PARP1 puede agotar el almacenamiento celular de ATP y NAD $^{+}$ y provocar un colapso bioenergético y muerte celular necrótica. A P23, en las retinas de los ratones *rd10* podemos observar activación de la CP3, disminución de RIPK1 y aumento de RIPK3 y algunas proteínas del inflammasoma NLRP3 (IL1 β , actividad de la CP1 y NLRP3) (A). El bloqueo de TNF α con 0,375 μ g/ μ l de ADA reduce RIPK3, la activación de PARP1, IL1b, NLRP y la activación de la CP1 (↓). En cambio, no se observa ningún efecto sobre la activación de la CP3, RIPK1 o IL18 (X). El bloqueo del TNF α con 4,61 μ g/ μ l de ADA reduce RIPK1, la sobreactivación de PARP1, IL1b y NLRP3 (↓). Sin embargo, esta concentración aumenta la actividad de las caspasas 1 y 3 y en menos medida RIPK1 (↑). No se observa efecto sobre IL18 (X) (B). Hecho con Biorender.

También hemos evaluado si los cambios en la biodisponibilidad de oxígeno en la retina se podrían correlacionar con los cambios en la concentración de proteína HIF-1 α , con el fin de desarrollar un nuevo enfoque terapéutico, el tratamiento con DMOG (Capítulo IV).

Detectamos una disminución generalizada en el contenido de la proteína HIF-1 α a lo largo de la progresión de la enfermedad, excepto entre P30 y P44, en las retinas de los ratones *rd10*. HIF-1 α es una proteína regulada por los niveles de oxígeno, por lo que el perfil temporal observado nos está indicando que se están produciendo cambios en los niveles de oxígeno durante el proceso de degeneración en el modelo de ratón *rd10*. El oxígeno es uno de los metabolitos retinianos más importantes y esencial para la función retiniana. Aunque no medimos directamente la saturación de oxígeno o la entrada de oxígeno a las células de la retina, los cambios en el contenido proteico de HIF-1 α y la menor formación de aductos HP, sugieren un entorno hiperóxico a medida que la degeneración progresa, excepto para una etapa de transición en la que encontramos niveles normales de oxígeno (entre P30 y P44). El suministro de oxígeno a los fotorreceptores, principales consumidores de oxígeno de la retina, deriva principalmente de la coroides, mientras que a la retina interna se le suministra principalmente por la vasculatura retiniana (Linsenmeier y Padnick-Silver 2000). Nuestros resultados apoyan, en parte, la hipótesis de toxicidad del oxígeno que propone que la pérdida de fotorreceptores secundarios (principalmente los conos) se debe a la hiperoxia, que resulta de la disminución de la absorción de oxígeno tras la pérdida inicial de bastones (Yu y Cringle 2005). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la hiperoxia también está presente en las primeras etapas de degeneración, desde P15 hasta P18, durante la pérdida inicial de fotorreceptores en los ratones *rd10*. Yu y colaboradores midieron el ambiente de oxígeno intrarretinal en diferentes etapas de la degeneración retiniana en los modelos de rata de RP PH23 y RCS (Yu, Cringle y col. 2000, Yu, Cringle y col. 2004). Ambos modelos mostraron cambios en la distribución de oxígeno durante la degeneración de la retina, reflejando la pérdida gradual del metabolismo del oxígeno de los fotorreceptores. Las ratas *RCS* y *P23H* presentaron mayores niveles de oxígeno en la retina externa que los controles y una alteración importante en el flujo de oxígeno desde la coroides hasta la retina interna. No se analizó la concentración de oxígeno antes del inicio de los procesos degenerativos, por lo que no estaba claro si los cambios de oxígeno eran causa o consecuencia del proceso degenerativo en estos modelos de RP (Yu y Cringle 2005).

En pacientes con RP se ha medido la saturación de oxígeno, el flujo sanguíneo y el diámetro en los vasos retinianos. Varios autores han encontrado una atenuación del flujo sanguíneo y del diámetro de los vasos retinianos (Merin y Auerbach 1976, Hartong, Berson y col. 2006, Ma, Kawasaki y col. 2012, Eysteinnsson, Hardarson y col. 2014, Zong, Lin y col. 2016) que se

correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Cellini, Lodi y col. 1997, Ma, Kawasaki y col. 2012). A pesar de esto, los datos relativos a la saturación de oxígeno de los vasos retinianos, indicadores de disfunción metabólica de la retina, siguen siendo controvertidos. Por ejemplo, se observó una mayor saturación de oxígeno en las vénulas retinianas (VS) de pacientes con RP avanzada en comparación con controles, en los que disminuye la saturación arteriovenosa (AVS) (Eysteinnsson, Hardarson y col. 2014) y una correlación negativa con la electroretinografía de campo completo (ERG) (Todorova, Turksever y col. 2016). Türksever et al. encontraron una mayor saturación de oxígeno en las arteriolas retinianas (AS) y las VS y menor AVS en los pacientes con RP en comparación con los controles, lo que podría sugerir un menor aporte de oxígeno a la circulación retiniana (Turksever, Valmaggia y col. 2014). Otros autores detectaron diferencias en EA y AVS pero no en VS en diferentes grupos de edad de pacientes con RP. En este caso los pacientes con RP más jóvenes presentaron EA y AVS más altos y los pacientes con RP más viejos AS y AVS más bajos (Zong, Lin y col. 2016). Ueda-Consolvo y sus colaboradores propusieron que la gravedad de la RP se correlaciona con una elevada saturación de oxígeno en las venas retinianas y una disminución de los calibres de los vasos retinianos (Ueda-Consolvo, Fuchizawa y col. 2015).

En nuestro caso, partimos de la hipótesis de que en las primeras etapas de la RP (P15-P18) y después del primer pico de degeneración de los fotorreceptores (P20-P23), bajo nuestras condiciones de estabulación, la pérdida o degeneración de bastones reduciría la utilización de oxígeno, lo que conduce a un estado de hiperoxia en la retina externa y a la desregulación de HIF-1 α y de los aductos HP (Stone, Maslim y col. 1999, Yu, Cringle y col. 2004, Padnick-Silver, Kang Derwent y col. 2006). Desde P30 a P44 parece que existe una etapa de normoxia transitoria donde el contenido de HIF-1 α y los aductos de HP aumentan. Este entorno normóxico de transición se superpone, en parte, con un segundo pico de pérdida de fotorreceptores (fase principal de muerte de los conos). De P44 a P60 sólo queda una fila de núcleos de fotorreceptores. A P60, el contenido de HIF-1 α y los aductos de HP disminuyen sugiriendo un ambiente hiperóxico de nuevo. En modelos murinos de RP, se ha descrito un aumento de HIF-1 α y de sus dianas durante la degeneración de los conos, pero en este caso probablemente sea debido a la baja biodisponibilidad de glucosa y no a condiciones hipóxicas (Punzo, Kornacker y col. 2009, Uren, Lee y col. 2014, Wang, Xiao y col. 2014b).

HIF-1 α se expresa abundantemente en la retina (Hughes, Groot y col. 2010), y se han identificado numerosos genes diana para este factor de transcripción, que bajo condiciones normales de oxígeno, se expresan en un nivel relativamente bajo. Estos genes diana desempeñan un papel clave en la regulación de varios procesos celulares importantes como la

angiogénesis, la apoptosis, la inestabilidad génica, la diferenciación, el metabolismo energético, la eritropoyesis o el metabolismo de la glucosa (Vadlapatla, Vadlapudi y col. 2013). Hemos determinado el nivel de expresión de algunos de estos genes relacionados con el tono vascular (iNOS y ET-1), el metabolismo energético (GLUT-1) y la angiogénesis (VEGF-A) desde P13 a P60. Observamos que todos ellos sufren una desregulación a lo largo del proceso degenerativo, que corrobora la hipótesis de que la hiperoxia es el estado predominante durante el proceso de degeneración retiniana, incluso en las primeras etapas de la enfermedad (desde P15 a P18), aunque, el papel de HIF-1 α en la retina sigue sin ser del todo claro. Las evidencias indican que HIF-1 α y sus genes diana contribuyen a la neuroprotección de la retina en algunas enfermedades degenerativas como el glaucoma, la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía diabética u oclusiones de la vena retiniana (Harten, Ashcroft y col. 2010, Cheng, Yu y col. 2017). La manipulación farmacológica (por ejemplo, DMOG, Roxadustat, deferoxamina o piruvato) que conduce a la estabilización o activación de HIF-1 α ha presentado efectos neuroprotectores en modelos animales de degeneración retiniana como la degeneración retiniana inducida por la luz o la retinopatía del prematuro inducida por oxígeno (Ren, Liu y col. 2011, Trichonas, Lee y col. 2013, Hoppe, Lee y col. 2014, Hoppe, Yoon y col. 2016).

Las principales vías de señalización celular que median este efecto neuroprotector incluirían: mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial, angiogénesis, proliferación, funciones antiinflamatorias y anti-apoptóticas, regulación vasomotora, metabolismo energético y antioxidante. En nuestro trabajo, hemos evaluado el posible efecto neuroprotector de la administración de DMOG, un inhibidor para PHDs. El DMOG estabiliza la proteína HIF-1 α que se transloca al núcleo, donde se une a elementos sensibles a HIF (Hres) y estimula la expresión de sus genes diana. Observamos que el tratamiento con DMOG tiene un efecto neuroprotector importante a P18 en los ratones *rd10*. A esta edad, HIF-1 α y sus genes diana (iNOS, ET-1, GLUT-1 y VEGF-A) se ven significativamente alterados. El tratamiento con DMOG aumenta los niveles de HIF-1 α , VEGF-A e iNOS y en menor medida de ET-1. Aunque el tratamiento no normaliza los niveles de las proteínas codificadas por los genes diana de HIF-1 α , parece que el pequeño aumento observado en nuestro trabajo podría ser suficiente para reducir la degeneración de la retina. A P18 el DMOG es capaz de reducir la muerte celular manteniendo el número de filas de fotorreceptores en los ratones *rd10*. Además, el tratamiento con DMOG previene la gliosis reactiva. Aunque nosotros no lo hemos evaluado, otros autores han demostrado que HIF-1 α y sus dianas pueden ejercer efectos anti-apoptóticos y anti-inflamatorios a través de la vía de señalización ERK-1/2 y/o activación de la vía de Akt (Ryou, Flaherty y col. 2009, Ryou, Liu y col.

2012, Ma, Cheng y col. 2016, Wei, Hong y col. 2017). Aun así, se necesitan más estudios para aclarar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto neuroprotector del DMOG.

A P23 el contenido de proteína HIF-1 α se encuentra reducido en los ratones *rd10*, pero la expresión de sus genes diana aumenta con respecto a P18. El tratamiento con DMOG no tiene ningún efecto aparente en este aspecto. En cuanto al efecto neuroprotector, observamos que las retinas de los ratones *rd10* tratadas con DMOG todavía tienen más filas de células fotorreceptoras que las retinas *rd10* no tratadas. Sin embargo, el número de fotorreceptores apoptóticos es similar en ambos casos, lo que sugiere que el efecto neuroprotector del DMOG empieza a desaparecer a esa edad. El papel neuroprotector de HIF-1 α y sus genes diana también ha sido observado por otros autores en el SNC (Correia y Moreira 2010, Harten, Ashcroft y col. 2010). El cerebro es el órgano más sensible a los bajos niveles de oxígeno que, durante un período prolongado, pueden causar varios trastornos neurológicos, e incluso la muerte cerebral. La inducción de la vía de señalización de hipoxia, por ejemplo mediante la estabilización de HIF-1 α , se ha propuesto como objetivo terapéutico para mitigar o prevenir enfermedades neurodegenerativas como accidentes cerebrovasculares isquémicos, Alzheimer, Parkinson, enfermedades relacionadas con priones y la enfermedad de Huntington (Correia y Moreira 2010, Ogle, Gu y col. 2012, Jeong, Moon y col. 2013, Ghasemi Moravej, Vahabian y col. 2016, Khan, Khan y col. 2017). Como ya se ha comentado, HIF-1 α desencadena la expresión de varios genes involucrados en la angiogénesis, transporte de oxígeno, metabolismo glicolítico, supervivencia celular, apoptosis y otros procesos que serían los que disminuyen la muerte de las células neuronales, aumentando el flujo sanguíneo cerebral, estimulando el proceso de neuroreparación o mitigando el deterioro cognitivo (Correia y Moreira 2010, Ogle, Gu y col. 2012, Jeong, Moon y col. 2013, Ghasemi Moravej, Vahabian y col. 2016, Ashok, Ajith y col. 2017, Iyalomhe, Swierczek y col. 2017, Khan, Khan y col. 2017).

Sabemos que el daño oxidativo contribuye a la patogénesis de la enfermedad en pacientes y modelos animales de RP (Komeima, Rogers y col. 2007, Lee, Usui y col. 2011, Oveson, Iwase y col. 2011). El daño oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de ROS y RNS y su eliminación a través del sistema de defensa antioxidante. La hiperoxia aumenta la producción de radicales libres como el anión O₂⁻ y otros ROS y RNS que inducen daño oxidativo en las macromoléculas como los lípidos, el ADN y las proteínas. Los pacientes y los modelos animales de RP presentan una disminución de la respuesta antioxidante y un aumento de ROS o RNS (Shen, Yang y col. 2005, Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013, Campochiaro, Strauss y col. 2015, Martínez-Fernández de la Cámara, Hernández-Pinto y col. 2015). En la presente tesis hemos corroborado los resultados anteriores a P18 en ratones *rd10*.

A esta edad se reduce la capacidad antioxidante total y la actividad de SOD1 y se observa un aumento de las actividades SOD2 y CAT. Sin embargo, a P23 la TAC y la actividad SOD1 parecen normalizarse. A P18 el tratamiento con DMOG tiende a mejorar la TAC y las actividades SOD1 y CAT en la retina de los ratones *rd10*, aunque no observamos ningún efecto a P23.

La retina es extremadamente sensible al estrés oxidativo, ya que se trata de uno de los tejidos metabólicamente más activos del organismo, presenta una elevada tasa de consumo de oxígeno y está sometido a estrés fotoquímico constante. Como hemos comentado anteriormente, la muerte de los bastones puede suponer una disminución del consumo de oxígeno provocando una situación de hiperoxia que provocaría la muerte de los conos por daño oxidativo (Shen, Yang y col. 2005, Usui, Komeima y col. 2009, Campochiaro y Mir 2018).

Finalmente, los estudios previos en pacientes y en modelos animales nos llevaron al diseño y al estudio del efecto de una mezcla de nutracéuticos con propiedades antioxidantes sobre el estado redox y la función visual de pacientes con RP (Capítulo V). Primero analizamos el estado redox de 33 pacientes con RP a nivel ocular y sistémico (plasma). A nivel basal, los pacientes con RP presentaron alteraciones en el sistema de defensa antioxidante endógeno, principalmente una disminución de TAC y la actividad de la enzima SOD extracelular o SOD3 en humor acuoso, corroborando estudios previos de nuestro grupo (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013). Esto haría que tuvieran menor capacidad para hacer frente al daño oxidativo, lo que contribuiría a su patogénesis, ya que existe una correlación entre el estado antioxidante ocular y el campo visual; los pacientes con menor capacidad antioxidante endógena presentan un peor campo visual (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013). Este tipo de asociación se ha observado también en otros estudios, en los que una disminución de la actividad de la enzima SOD3 se correlaciona con una peor función visual de los pacientes (Ishizu, Murakami y col. 2019) e incluso en otras enfermedades retinianas como la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía del prematuro o el glaucoma (Ferreira, Lerner y col. 2004, Rivera, Sapieha y col. 2011, Goyal, Srivastava y col. 2014, Matsuura y Kaneko 2020). Por otro lado, se observó un aumento en la formación de aductos de carbonilo en el humor acuoso de estos pacientes corroborando los resultados de Campochiaro y col (Campochiaro, Strauss y col. 2015).

Aunque se trata de una enfermedad ocular, analizamos el estado redox en plasma, ya que previamente habíamos detectado alteraciones de algunos marcadores antioxidantes u oxidantes (Martínez-Fernández de la Cámara, Salom y col. 2013). Nuestros resultados muestran una ligera disminución de las actividades enzimáticas de las enzimas antioxidantes CAT y SOD extracelular y un aumento, aunque no significativo, de los marcadores de estrés oxidativo

(formación de TBARS) y nitrosativo (NOx) en sangre, en los pacientes con respecto al grupo control. Además, encontramos una disminución del cociente SAM/SAH en el plasma de pacientes con RP. SAM es una molécula con una estructura híbrida entre la metionina y la adenosina que constituye el segundo cofactor más importante en el cuerpo. Su función principal es actuar como donante de grupos metilo a ADN, proteínas, lípidos y ARN a través de las metiltransferasas dependientes de SAM. Sus niveles disminuyen con la edad y, en ocasiones, se suplementa exógenamente por su importancia. Su deficiencia contribuye al establecimiento de muchas situaciones patológicas (enfermedades hepáticas, neurodegenerativas, óseas, etc). Además, está implicado en el estrés oxidativo, ya que durante este proceso se altera la homeóstasis de aminoácidos sulfuro. Esta disminución en el cociente SAM/SAH sugiere una alteración en los niveles de metilación que podría contribuir al estrés oxidativo, por ejemplo, por cambios en la metilación de la SOD3 (Lakshmi, Naushad y col. 2013). Habría que profundizar en este aspecto. En conjunto, los resultados sugieren que la alteración ocular tiene, de alguna manera, un reflejo sistémico aunque no llega a ser significativo.

La importancia del estrés oxidativo en la progresión de la enfermedad hace que numerosas estrategias se centren en disminuir o neutralizar los ROS mediante la administración exógena de suplementos orales antioxidantes como la vitamina A, la vitamina E, el DHA, la luteína, la zeaxantina, la progesterona o el AL, que han demostrado la capacidad de retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la función de las células en modelos animales (Dias, Joo y col. 2018, Hernandez-Rabaza, Lopez-Pedrajas y col. 2019) y en pacientes de RP (Berson, Rosner y col. 2004, Berson, Weigel-DiFranco y col. 2018). Otro tipo de estrategia utilizada se basa en aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, ya sea mediante la administración de sustancias como la progesterona (Pajovic, Saicic y col. 1996, Stein, Wright y col. 2008) o bien mediante modificación génica en modelos *in vitro* o animales (Lu, Oveson y col. 2009, Usui, Komeima y col. 2009).

En nuestro caso, una vez detectada la alteración en el estado redox ocular y sistémico, decidimos evaluar el efecto de una mezcla de nutracéuticos antioxidantes sobre la función visual de los pacientes. Durante los dos años de duración del estudio los pacientes tomaron una mezcla de nutracéuticos con propiedades antioxidantes. Evaluamos su efecto sobre la función visual y los marcadores del estado redox en los pacientes al año y a los dos años de tratamiento. Tras dos años de tratamiento, los pacientes que habían tomado la mezcla de nutracéuticos presentaban una mejor función visual (mERG) que los pacientes que habían tomado placebo. Los resultados obtenidos en la OCT parecen indicar que la probabilidad de que el resultado de esta prueba empeore sin tomar nutracéuticos es del 94%, pero el efecto no llega a ser

significativo. Sin embargo, no conseguimos observar ningún efecto sobre el CV. A nivel de estado redox ocular observamos un ligero efecto beneficioso del tratamiento con respecto al placebo sobre la actividad SOD extracelular y la formación de aductos de carbonilo. A nivel sistémico no observamos ningún efecto sobre el estado redox. Es posible que necesitemos un mayor número de pacientes para hacer más robusta la detección de algunas variables, ya que finalmente contamos con un grupo muestral relativamente pequeño. Sin embargo, los resultados son bastante prometedores. Hemos conseguido ralentizar la pérdida de función visual en los pacientes durante dos años.

La alimentación es otro aspecto importante a tener en cuenta en la progresión de la enfermedad, pues puede aumentar la capacidad antioxidante del organismo para hacer frente al estrés oxidativo asociado al proceso degenerativo. En nuestro estudio realizamos una encuesta nutricional para evaluar el consumo de antioxidantes que los pacientes estaban incorporando de manera natural con la dieta. Hemos observado que presentan una dieta más rica en sustancias antioxidantes que la de la población del grupo control. Es muy probable que en los pacientes exista una mayor preocupación por aumentar el consumo de alimentos con elevada capacidad antioxidante para así reforzar su maquinaria antioxidante endógena y contribuir a mejorar su función visual.

Hemos visto que existen variaciones en la cantidad de oxígeno presente en la retina en nuestro modelo animal (Olivares-Gonzalez, Martinez-Fernandez de la Camara y col. 2018) y existen evidencias de que en los pacientes de RP también se producen variaciones en la saturación de oxígeno y en el flujo sanguíneo a lo largo de la progresión de la enfermedad (Turkseven, Valmaggia y col. 2014, Lang y Harris 2019). Monitorizando el flujo sanguíneo ocular y determinado la saturación de oxígeno en la retina, podrían desarrollarse dietas concretas, incluyendo suplementos alimenticios, que aumentasen el aporte de antioxidantes en el momento adecuado, es decir, cuando la influencia del estrés oxidativo sea más notable, para ayudar a reforzar el sistema antioxidante y reducir los daños producidos por el proceso oxidativo. Así podrían desarrollarse terapias antioxidantes personalizadas para cada paciente y para cada momento de la degeneración, que podrían ser más efectivas.

Nuestros resultados en general sugieren que tanto el estrés oxidativo como la inflamación son procesos muy implicados en la degeneración retiniana asociada a la RP. Utilizando estrategias para frenar cada uno de ellos por separado conseguimos ralentizar, al menos en parte, el avance de la enfermedad independientemente del defecto genético, por lo que el diseño de estrategias combinadas para hacer frente a ambos procesos podría ser un enfoque

interesante. Profundizar en los mecanismos de muerte y procesos subyacentes a la degeneración retiniana, nos ayuda a encontrar nuevas dianas terapéuticas y a diseñar terapias más específicas y adecuadas al momento de degeneración en el que nos encontramos.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

1. La inflamación está implicada en el proceso de degeneración retiniana. Observamos un aumento de la expresión de los marcadores inflamatorios IL-6, iNOS, LIF y TNF α en ratones *rd10* justo antes del pico de máxima degeneración de los fotorreceptores (P13-P18). En los pacientes con RP también se observa un aumento de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-10 y TNF α en humor acuoso.
2. El TNF α *in vitro* induce la muerte celular en cultivos de células 661W a través de la activación de las caspasas 3 y 8. El tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α , Adalimumab, previene la muerte celular a través de la inhibición de los mecanismos apoptóticos.
3. A día postnatal 23 se observa una sobre-activación de PARP, de caspasas, del inflamasoma NLRP3 y de la gliosis reactiva en retinas de ratones *rd10*.
4. La inyección intravítrea de Adalimumab disminuye la degeneración retiniana en ratones *rd10* a P23, a través de la inhibición de PARP, de la activación del inflamasoma NLRP3 y de la microglía.
5. La administración intravítrea de Adalimumab aumenta la ventana terapéutica y la efectividad del tratamiento, ya que una única inyección produce un efecto neuroprotector más duradero que la administración repetida de inyecciones intraperitoneales.
6. La retina de los ratones *rd10* se encuentra expuesta a un ambiente hiperóxico en las primeras etapas de la degeneración, lo que provoca una disminución de la proteína HIF-1 α y, por tanto, de la expresión de sus genes diana. Esta disminución es predominante a lo largo de la progresión de la enfermedad, excepto entre P30 y P44.
7. La estabilización de HIF-1 α mediante el tratamiento con un inhibidor de prolil-hidroxilasas, DMOG, tiene un efecto neuroprotector en ratones *rd10* a P18 y P23, aumentando la supervivencia de las células, reduciendo los procesos gliales y normalizando parcialmente la respuesta antioxidante.
8. La maquinaria antioxidante endógena se encuentra alterada en los pacientes con RP. Presentan una disminución de la capacidad antioxidante y de las actividades enzimáticas

de la SOD extracelular y la CAT en humor acuoso y sangre. Algunos marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo también se encuentran aumentados en estos fluidos.

9. El tratamiento con nutracéuticos antioxidantes orales evita el empeoramiento de la función visual (mERG y OCT) y produce una ligera mejoría del estado redox ocular (SOD y aductos de carbonilo). Sin embargo, no tiene efecto sobre el CV ni el estado redox sistémico.
10. Dada la implicación de la inflamación y el estrés oxidativo en la enfermedad, podría ser apropiado diseñar una estrategia combinada de antioxidantes y antiinflamatorios para reducir la progresión de la degeneración.
11. La dieta de los pacientes con RP parece ser más rica en antioxidantes que la de los controles. Se asemeja más a las cantidades diarias recomendadas para conseguir el aporte de antioxidantes necesario. Posiblemente los pacientes con RP se preocupan más de ingerir alimentos con propiedades antioxidantes que contribuyan a mejorar su función visual.

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS

Abais, J. M., M. Xia, Y. Zhang, K. M. Boini, P. L. Li (2015). "Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?" Antioxid Redox Signal **22**(13): 1111-1129.

Aboobacker, S., A. M. Al Aboud (2020). Infliximab-abda. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Ahn, S. J., K. E. Kim, S. J. Woo, K. H. Park (2014). "The effect of an intravitreal dexamethasone implant for cystoid macular edema in retinitis pigmentosa: a case report and literature review." Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina **45**(2): 160-164.

Akhtar-Schafer, I., L. Wang, T. U. Krohne (2018). "Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases." **10**(10).

Al-Gayyar, M. M., N. M. Elsherbiny (2013). "Contribution of TNF-alpha to the development of retinal neurodegenerative disorders." Eur Cytokine Netw **24**(1): 27-36.

Appelbaum, T., E. Santana, G. D. Aguirre (2017). "Strong upregulation of inflammatory genes accompanies photoreceptor demise in canine models of retinal degeneration." PLoS One **12**(5): e0177224.

Aral, K., M. R. Milward (2020). "Inflammasomes and their regulation in periodontal disease: A review."

Arjamaa, O., M. Nikinmaa (2006). "Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors." Exp Eye Res **83**(3): 473-483.

Arjunan, P., X. Lin, Z. Tang, Y. Du, A. Kumar, L. Liu, X. Yin, L. Huang, W. Chen, Q. Chen, Z. Ye, S. Wang, H. Kuang, L. Zhou, K. Xu, X. Chen, H. Zeng, W. Lu, Y. Cao, Y. Liu, C. Zhao, X. Li (2018). "VEGF-B is a potent antioxidant." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(41): 10351-10356.

Ashok, B. S., T. A. Ajith, S. Sivanesan (2017). "Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease." Clin Exp Pharmacol Physiol **44**(3): 327-334.

Assawachananont, J., M. Mandai, S. Okamoto, C. Yamada, M. Eiraku, S. Yonemura, Y. Sasai, M. Takahashi (2014). "Transplantation of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D Retinal Sheets into Retinal Degenerative Mice." Stem Cell Reports **2**(5): 662-674.

Athanasiou, D., M. Aguila, J. Bellingham, W. Li, C. McCulley, P. J. Reeves, M. E. Cheetham (2018). "The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy." Prog Retin Eye Res **62**: 1-23.

Bai, P. (2015). "Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance." Mol Cell **58**(6): 947-958.

Bakondi, B., W. Lv, B. Lu, M. K. Jones, Y. Tsai, K. J. Kim, R. Levy, A. A. Akhtar, J. J. Breunig, C. N. Svendsen, S. Wang (2016). "In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." Mol Ther **24**(3): 556-563.

Baumgartner, R., G. Meder, C. Briand, A. Decock, A. D'Arcy, U. Hassiepen, R. Morse, M. Renatus (2009). "The crystal structure of caspase-6, a selective effector of axonal degeneration." Biochem J **423**(3): 429-439.

Bavaresco, D. V., M. T. Schwalm, B. M. Farias, L. B. Ceretta, M. I. D. Rosa, S. S. Valvassori (2018). "INCREASED OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF OSTOMY PATIENTS." Arg Gastroenterol **55**(2): 164-169.

Benlloch-Navarro, S., L. Trachsel-Moncho, A. Fernandez-Carbonell, T. Olivar, J. M. Soria, I. Almansa, M. Miranda (2019). "Progesterone anti-inflammatory properties in hereditary retinal degeneration." J Steroid Biochem Mol Biol **189**: 291-301.

Bennett, J., J. Wellman, K. A. Marshall, S. McCague, M. Ashtari, J. DiStefano-Pappas, O. U. Elci, D. C. Chung, J. Sun, J. F. Wright, D. R. Cross, P. Aravand, L. L. Cyckowski, J. L. Bennicelli, F. Mingozzi, A. Auricchio, E. A. Pierce, J. Ruggiero, B. P. Leroy, F. Simonelli, K. A. High, A. M. Maguire (2016). "Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial." Lancet **388**(10045): 661-672.

Bergsbaken, T., S. L. Fink, B. T. Cookson (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." Nat Rev Microbiol **7**(2): 99-109.

Berson, E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, K. C. Hayes, B. W. Nicholson, C. Weigel-DiFranco, W. Willett (1993). "A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa." Arch Ophthalmol **111**(6): 761-772.

Berson, E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, C. Weigel-DiFranco, R. J. Brockhurst, K. C. Hayes, E. J. Johnson, E. J. Anderson, C. A. Johnson, A. R. Gaudio, W. C. Willett, E. J. Schaefer (2010). "Clinical trial of lutein in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A." Arch Ophthalmol **128**(4): 403-411.

Berson, E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, C. Weigel-DiFranco, A. Moser, R. J. Brockhurst, K. C. Hayes, C. A. Johnson, E. J. Anderson, A. R. Gaudio, W. C. Willett, E. J. Schaefer (2004). "Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses." Arch Ophthalmol **122**(9): 1306-1314.

Berson, E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, C. Weigel-DiFranco, W. C. Willett (2012). "ω-3 intake and visual acuity in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A." Arch Ophthalmol **130**(6): 707-711.

Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" Metabolism **49**(2 Suppl 1): 3-8.

Bignami, A., D. Dahl (1979). "The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." Exp Eye Res **28**(1): 63-69.

Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci (2012). "Oxidative stress and antioxidant defense." World Allergy Organ J **5**(1): 9-19.

Birch, D. G., L. D. Bennett, J. L. Duncan, R. G. Weleber, M. E. Pennesi (2016). "Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants." Am J Ophthalmol **170**: 10-14.

Blanco, S., R. Hernández, G. Franchelli, M. M. Ramos-Álvarez, M. Peinado (2017). "Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage." Nitric Oxide **62**: 32-43.

- Bode, C., U. Wolfrum (2003). "Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice." Mol Vis **9**: 144-150.
- Bowes, C., T. Li, M. Danciger, L. C. Baxter, M. L. Applebury, D. B. Farber (1990). "Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase." Nature **347**(6294): 677-680.
- Bramall, A. N., A. F. Wright, S. G. Jacobson, R. R. McInnes (2010). "The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders." Annu Rev Neurosci **33**: 441-472.
- Brenner, D., T. W. Mak (2009). "Mitochondrial cell death effectors." Curr Opin Cell Biol **21**(6): 871-877.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne, A. Reichenbach (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Bruick, R. K., S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." Science **294**(5545): 1337-1340.
- Bunel, M., G. Chaudieu, C. Hamel, L. Lagoutte, G. Manes, N. Botherel, P. Brabet, P. Pilorge, C. Andre, P. Quignon (2019). "Natural models for retinitis pigmentosa: progressive retinal atrophy in dog breeds."
- Cai, X., S. M. Conley, Z. Nash, S. J. Fliesler, M. J. Cooper, M. I. Naash (2010). "Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa." Faseb j **24**(4): 1178-1191.
- Campochiaro, P. A., T. A. Mir (2018). "The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa." Prog Retin Eye Res **62**: 24-37.
- Campochiaro, P. A., R. W. Strauss, L. Lu, G. Hafiz, Y. Wolfson, S. M. Shah, R. Sophie, T. A. Mir, H. P. Scholl (2015). "Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa?" Antioxid Redox Signal **23**(7): 643-648.
- Cao, J. Y., S. J. Dixon (2016). "Mechanisms of ferroptosis." Cell Mol Life Sci **73**(11-12): 2195-2209.
- Carretero, A., Z. León, J. C. García-Cañaveras, A. Zaragoza, M. J. Gómez-Lechón, M. T. Donato, A. Lahoz (2014). "*In vitro*/*in vivo* screening of oxidative homeostasis and damage to DNA, protein, and lipids using UPLC/MS-MS." Anal Bioanal Chem **406**(22): 5465-5476.
- Carvalho-Silva, M., L. M. Gomes, M. L. Gomes, B. K. Ferreira, P. F. Schuck, G. C. Ferreira, F. Dal-Pizzol, J. de Oliveira, G. Scaini, E. L. Streck (2019). "Omega-3 fatty acid supplementation can prevent changes in mitochondrial energy metabolism and oxidative stress caused by chronic administration of L-tyrosine in the brain of rats." Metab Brain Dis **34**(4): 1207-1219.
- Cellini, M., R. Lodi, G. L. Possati, M. Sbrocca, D. Pelle, N. Giubilei (1997). "[Color Doppler ultrasonography in retinitis pigmentosa. Preliminary study]." J Fr Ophtalmol **20**(9): 659-663.
- Correia, S. C., P. I. Moreira (2010). "Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration?" J Neurochem **112**(1): 1-12.

Cottet, S., D. F. Schorderet (2009). "Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa." Curr Mol Med **9**(3): 375-383.

Cregan, S. P., A. Fortin, J. G. MacLaurin, S. M. Callaghan, F. Cecconi, S. W. Yu, T. M. Dawson, V. L. Dawson, D. S. Park, G. Kroemer, R. S. Slack (2002). "Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death." J Cell Biol **158**(3): 507-517.

Cuenca, N., L. Fernández-Sánchez, L. Campello, V. Maneu, P. De la Villa, P. Lax, I. Pinilla (2014). "Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases." Prog Retin Eye Res **43**: 17-75.

Cuffe, J. S., Z. C. Xu, A. V. Perkins (2017). "Biomarkers of oxidative stress in pregnancy complications." Biomark Med **11**(3): 295-306.

Cullen, S. P., C. M. Henry, C. J. Kearney, S. E. Logue, M. Feoktistova, G. A. Tynan, E. C. Lavelle, M. Leverkus, S. J. Martin (2013). "Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells." Mol Cell **49**(6): 1034-1048.

Cvenkel, B., A. N. Kopitar, A. Ihan (2010). "Inflammatory molecules in aqueous humour and on ocular surface and glaucoma surgery outcome." Mediators Inflamm **2010**: 939602.

Chadderton, N., S. Millington-Ward, A. Palfi, M. O'Reilly, G. Tuohy, M. M. Humphries, T. Li, P. Humphries, P. F. Kenna, G. J. Farrar (2009). "Improved retinal function in a mouse model of dominant retinitis pigmentosa following AAV-delivered gene therapy." Mol Ther **17**(4): 593-599.

Chan, H. H., H. I. Lam, K. Y. Choi, S. Z. Li, Y. Lakshmanan, W. Y. Yu, R. C. Chang, J. S. Lai, K. F. So (2019). "Delay of cone degeneration in retinitis pigmentosa using a 12-month treatment with Lycium barbarum supplement." J Ethnopharmacol **236**: 336-344.

Chang, B. (2016). Animal Models of Retinitis Pigmentosa (RP). Animal Models of Ophthalmic Diseases. C.-C. Chan. Cham, Springer International Publishing: 101-116.

Chemi, G., M. Brindisi, S. Brogi, N. Relitti, S. Butini, S. Gemma, G. Campiani (2019). "A light in the dark: state of the art and perspectives in optogenetics and optopharmacology for restoring vision." Future Med Chem **11**(5): 463-487.

Chen, L., H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao (2018). "Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs." Oncotarget **9**(6): 7204-7218.

Chen, R., C. Lee, X. Lin, C. Zhao, X. Li (2019). "Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications." Pharmacol Res **143**: 33-39.

Cheng, L., H. Yu, N. Yan, K. Lai, M. Xiang (2017). "Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Target Genes Contribute to Retinal Neuroprotection." Front Cell Neurosci **11**: 20.

Chiarugi, A., M. A. Moskowitz (2003). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders." J Neurochem **85**(2): 306-317.

Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford, F. K. Chan (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-1123.

Choudhury, S., Y. Bhootada, O. Gorbatyuk, M. Gorbatyuk (2013). "Caspase-7 ablation modulates UPR, reprograms TRAF2-JNK apoptosis and protects T17M rhodopsin mice from severe retinal degeneration." Cell Death Dis **4**: e528.

D'Arcy, M. S. (2019). "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy." Cell Biol Int **43**(6): 582-592.

Degterev, A., M. Boyce, J. Yuan (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**(53): 8543-8567.

Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz, J. Yuan (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." Nat Chem Biol **1**(2): 112-119.

Deister, C., C. E. Schmidt (2006). "Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth." J Neural Eng **3**(2): 172-179.

Dias, M. F., K. Joo, J. A. Kemp, S. L. Fialho, A. da Silva Cunha, Jr., S. J. Woo, Y. J. Kwon (2018). "Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives." Prog Retin Eye Res **63**: 107-131.

Diaz-Llopis, M., D. Salom, C. Garcia-de-Vicuna, M. Cordero-Coma, G. Ortega, N. Ortego, M. Suarez-de-Figueroa, M. J. Rio-Pardo, C. Fernandez-Cid, A. Fonollosa, R. Blanco, A. M. Garcia-Aparicio, J. M. Benitez-Del-Castillo, J. L. Olea, J. F. Arevalo (2012). "Treatment of refractory uveitis with adalimumab: a prospective multicenter study of 131 patients." Ophthalmology **119**(8): 1575-1581.

Donato, L., C. Scimone, G. Nicocia, R. D'Angelo (2019). "Role of oxidative stress in Retinitis pigmentosa: new involved pathways by an RNA-Seq analysis." **18**(1): 84-104.

Dubois, H., F. Sorgeloos (2019). "Nlrp3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection." **15**(4): e1007709.

Durrani, K., M. Ahmed, C. S. Foster (2007). "Adamantiades-Behcet disease: diagnosis and current concepts in management of ocular manifestations." Compr Ophthalmol Update **8**(4): 225-233.

Ebert, S., K. Weigelt, Y. Walczak, W. Drobnik, R. Mauerer, D. A. Hume, B. H. Weber, T. Langmann (2009). "Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration." J Neurochem **110**(6): 1863-1875.

Edwards, T. L., C. L. Cottrill, K. Xue, M. P. Simunovic, J. D. Ramsden, E. Zrenner, R. E. MacLaren (2018). "Assessment of the Electronic Retinal Implant Alpha AMS in Restoring Vision to Blind Patients with End-Stage Retinitis Pigmentosa." Ophthalmology **125**(3): 432-443.

El-Mlili, N., R. Rodrigo, B. Naghizadeh, O. Cauli, V. Felipe (2008). "Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II." J Neurochem **106**(3): 1440-1449.

Estornes, Y., M. A. Aguilera, C. Dubuisson, J. De Keyser, V. Goossens, K. Kersse, A. Samali, P. Vandenabeele, M. J. Bertrand (2015). "RIPK1 promotes death receptor-independent caspase-8-mediated apoptosis under unresolved ER stress conditions." Cell Death Dis **6**: e1798.

Eysteinnsson, T., S. H. Hardarson, D. Bragason, E. Stefansson (2014). "Retinal vessel oxygen saturation and vessel diameter in retinitis pigmentosa." *Acta Ophthalmol* **92**(5): 449-453.

Fernandez-Vega, B., A. Fernandez-Vega, C. M. Rangel, J. Nicieza, E. Villota-Deleu, J. A. Vega, R. M. Sanchez-Avila (2016). "Blockade of Tumor Necrosis Factor-Alpha: A Role for Adalimumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Refractory to Anti-Angiogenesis Therapy?" *Case Rep Ophthalmol* **7**(1): 154-162.

Ferreira, S. M., S. F. Lerner, R. Brunzini, P. A. Eelson, S. F. Llesuy (2004). "Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients." *Am J Ophthalmol* **137**(1): 62-69.

Fink, S. L., B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infect Immun* **73**(4): 1907-1916.

Fischer, U., R. U. Janicke, K. Schulze-Osthoff (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100.

Forooghian, F., R. Razavi, L. Timms (2007). "Hypoxia-inducible factor expression in human RPE cells." *Br J Ophthalmol* **91**(10): 1406-1410.

Foster, E., J. Bradley (2018). "Methodological considerations and future insights for 24-hour dietary recall assessment in children." *Nutr Res* **51**: 1-11.

Fricker, M., A. M. Tolkovsky, V. Borutaite, M. Coleman, G. C. Brown (2018). "Neuronal Cell Death." *Physiol Rev* **98**(2): 813-880.

Fuster García, C. (2020). Therapeutic approaches and development of genomic diagnostic tools for Usher syndrome.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden

Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." Cell Death Differ **25**(3): 486-541.

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.

Gao, F. J., J. K. Li, H. Chen, F. Y. Hu, S. H. Zhang, Y. H. Qi, P. Xu, D. D. Wang, L. S. Wang, Q. Chang, Y. J. Zhang, W. Liu, W. Li, M. Wang, F. Chen, G. Z. Xu, J. H. Wu (2019). "Genetic and clinical findings in a large cohort of Chinese patients with suspected retinitis pigmentosa." Ophthalmology.

Gao, J., J. Z. Cui, E. To, S. Cao, J. A. Matsubara (2018). "Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye." J Neuroinflammation **15**(1): 15.

Garces, K., T. Carmy, P. Illiano, R. Brambilla, A. S. Hackam (2020). "Increased Neuroprotective Microglia and Photoreceptor Survival in the Retina from a Peptide Inhibitor of Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88)."

Gargini, C., E. Terzibasi, F. Mazzoni, E. Strettoi (2007). "Retinal organization in the retinal degeneration 10 (*rd10*) mutant mouse: a morphological and ERG study." J Comp Neurol **500**(2): 222-238.

Genini, S., W. A. Beltran, G. D. Aguirre (2013). "Up-regulation of tumor necrosis factor superfamily genes in early phases of photoreceptor degeneration." PLoS One **8**(12): e85408.

Germain, F., C. Pérez-Rico, J. Vicente, P. de la Villa (2010). "Functional histology of the retina." Microscopy: Science, Technology, Applications and Education: 914-925.

Ghasemi Moravej, F., M. Vahabian, S. Soleimani Asl (2016). "Dimethylxylglycine may enhance the capacity of neural-like cells in treatment of Alzheimer disease." Cell Biol Int **40**(6): 619-620.

Gorbatyuk, M., V. Justilien, J. Liu, W. W. Hauswirth, A. S. Lewin (2007). "Suppression of mouse rhodopsin expression in vivo by AAV mediated siRNA delivery." Vision Res **47**(9): 1202-1208.

Goyal, A., A. Srivastava, R. Sihota, J. Kaur (2014). "Evaluation of oxidative stress markers in aqueous humor of primary open angle glaucoma and primary angle closure glaucoma patients." Curr Eye Res **39**(8): 823-829.

Grzesiak, M., Z. Gaj (2018). "Oxidative Stress in Women Treated with Atosiban for Impending Preterm Birth." **2018**: 3919106.

Guadagni, V., M. Biagioni, E. Novelli, P. Aretini, C. M. Mazzanti, E. Strettoi (2019). "Rescuing cones and daylight vision in retinitis pigmentosa mice." FASEB J: fj201900414R.

Gupta, N., K. E. Brown, A. H. Milam (2003). "Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration." Exp Eye Res **76**(4): 463-471.

Hachim, M. Y., B. A. Khalil, N. M. Elemam, A. A. Maghazachi (2020). "Pyroptosis: The missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk."

Haider, S., M. Knofler (2009). "Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium." Placenta **30**(2): 111-123.

Hall, J. E. (2016). Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica (13a. ed.). Barcelona, SPAIN, Elsevier Health Sciences Spain - T.

Hamam, R. N., A. W. Barikian, R. S. Antonios, M. R. Abdulaal, R. M. Alameddine, G. El Mollayess, A. M. Mansour (2016). "Intravitreal Adalimumab in Active Noninfectious Uveitis: A Pilot Study." Ocul Immunol Inflamm **24**(3): 319-326.

Han, Z., M. J. Banworth, R. Makkia, S. M. Conley, M. R. Al-Ubaidi, M. J. Cooper, M. I. Naash (2015). "Genomic DNA nanoparticles rescue rhodopsin-associated retinitis pigmentosa phenotype." Faseb j **29**(6): 2535-2544.

Harten, S. K., M. Ashcroft, P. H. Maxwell (2010). "Prolyl hydroxylase domain inhibitors: a route to HIF activation and neuroprotection." Antioxid Redox Signal **12**(4): 459-480.

Hartong, D. T., E. L. Berson, T. P. Dryja (2006). "Retinitis pigmentosa." Lancet **368**(9549): 1795-1809.

He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, X. Wang (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." Cell **137**(6): 1100-1111.

He, Z., B. V. Bui, A. J. Vingrys (2008). "Effect of Repeated IOP Challenge on Rat Retinal Function." Investigative Ophthalmology & Visual Science **49**(7): 3026-3034.

Helga Kolb, E. F., N. Ralph (2007). Webvision : the organization of the retina and visual system, [Bethesda, Md.] : National Library of Medicine : [National Center for Biotechnology Information], 2007.

Hernandez-Rabaza, V., R. Lopez-Pedrajas, I. Almansa (2019). "Progesterone, Lipoic Acid, and Sulforaphane as Promising Antioxidants for Retinal Diseases: A Review." Antioxidants (Basel) **8**(3).

Hernández-Rabaza, V., R. López-Pedrajas, I. Almansa (2019). "Progesterone, Lipoic Acid, and Sulforaphane as Promising Antioxidants for Retinal Diseases: A Review." Antioxidants (Basel) **8**(3).

Holmquist-Mengelbier, L., E. Fredlund, T. Lofstedt, R. Noguera, S. Navarro, H. Nilsson, A. Pietras, J. Vallon-Christersson, A. Borg, K. Gradin, L. Poellinger, S. Pahlman (2006). "Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype." Cancer Cell **10**(5): 413-423.

- Hong, S. J., T. M. Dawson, V. L. Dawson (2004). "Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling." Trends Pharmacol Sci **25**(5): 259-264.
- Hoppe, G., T. J. Lee, S. Yoon, M. Yu, N. S. Peachey, M. Rayborn, M. J. Zutel, G. Trichonas, J. Au, J. E. Sears (2014). "Inducing a visceral organ to protect a peripheral capillary bed: stabilizing hepatic HIF-1 α prevents oxygen-induced retinopathy." Am J Pathol **184**(6): 1890-1899.
- Hoppe, G., S. Yoon, B. Gopalan, A. R. Savage, R. Brown, K. Case, A. VasANJI, E. R. Chan, R. B. Silver, J. E. Sears (2016). "Comparative systems pharmacology of HIF stabilization in the prevention of retinopathy of prematurity." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(18): E2516-2525.
- Huang, Z., T. Zhou, X. Sun, Y. Zheng, B. Cheng, M. Li, X. Liu, C. He (2018). "Necroptosis in microglia contributes to neuroinflammation and retinal degeneration through TLR4 activation." Cell Death Differ **25**(1): 180-189.
- Hughes, E. H., F. C. Schlichtenbrede, C. C. Murphy, C. Broderick, N. van Rooijen, R. R. Ali, A. D. Dick (2004). "Minocycline delays photoreceptor death in the rds mouse through a microglia-independent mechanism." Exp Eye Res **78**(6): 1077-1084.
- Hughes, J. M., A. J. Groot, P. van der Groep, R. Sersansie, M. Vooijs, P. J. van Diest, C. J. Van Noorden, R. O. Schlingemann, I. Klaassen (2010). "Active HIF-1 in the normal human retina." J Histochem Cytochem **58**(3): 247-254.
- Hwang, N., M. Y. Kwon, J. B. Cha, S. W. Chung, J. M. Woo (2016). "Tunicamycin-induced Endoplasmic Reticulum Stress Upregulates the Expression of Pentraxin 3 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Korean J Ophthalmol **30**(6): 468-478.
- Ishizu, M., Y. Murakami, K. Fujiwara, J. Funatsu, S. Shimokawa, S. Nakatake, T. Tachibana, T. Hisatomi, Y. Koyanagi, M. Akiyama, Y. Momozawa, T. Ishibashi, K. H. Sonoda, Y. Ikeda (2019). "Relationships Between Serum Antioxidant and Oxidant Statuses and Visual Function in Retinitis Pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **60**(13): 4462-4468.
- Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, W. G. Kaelin, Jr. (2001). "HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing." Science **292**(5516): 464-468.
- Iyalomhe, O., S. Swierczek, N. Enwerem, Y. Chen, M. O. Adedeji, J. Allard, O. Ntekim, S. Johnson, K. Hughes, P. Kurian, T. O. Obisesan (2017). "The Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Mild Cognitive Impairment." Cell Mol Neurobiol **37**(6): 969-977.
- Japiassu, R. M., O. F. Brasil, A. L. Cunha, E. C. de Souza (2008). "Regression of vasoproliferative tumor with systemic infliximab." Ophthalmic Surg Lasers Imaging **39**(4): 348-349.
- Jayakody, S. A., A. Gonzalez-Cordero, R. R. Ali, R. A. Pearson (2015). "Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement." Prog Retin Eye Res **46**: 31-66.
- Jeong, J. K., M. H. Moon, Y. G. Park, J. H. Lee, Y. J. Lee, J. W. Seol, S. Y. Park (2013). "Gingerol-induced hypoxia-inducible factor 1 α inhibits human prion peptide-mediated neurotoxicity." Phytother Res **27**(8): 1185-1192.

Jiao, H., R. Natoli, K. Valter, J. M. Provis, M. Rutar (2015). "Spatiotemporal Cadence of Macrophage Polarisation in a Model of Light-Induced Retinal Degeneration." PLoS One **10**(12): e0143952.

Jiao, K., A. Sahaboglu, E. Zrenner, M. Ueffing, P. A. Ekstrom, F. Paquet-Durand (2016). "Efficacy of PARP inhibition in Pde6a mutant mouse models for retinitis pigmentosa depends on the quality and composition of individual human mutations." Cell Death Discov **2**: 16040.

Jimenez, N. (2015). "El Inflamasoma: Mecanismos de Activación." Revista de Investigaciones Clínicas **56**.

Jomary, C., M. J. Neal, S. E. Jones (2001). "Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage." Mol Cell Neurosci **18**(4): 335-346.

Jones, M. K., B. Lu, S. Girman, S. Wang (2017). "Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases." Prog Retin Eye Res **58**: 1-27.

Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson, G. G. Poirier (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." Cancer Res **53**(17): 3976-3985.

Kauppinen, A., J. J. Paterno, J. Blasiak, A. Salminen, K. Kaarniranta (2016). "Inflammation and its role in age-related macular degeneration." Cell Mol Life Sci **73**(9): 1765-1786.

Kaur, H., S. Chauhan, R. Sandhir (2011). "Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease." Neurochem Res **36**(8): 1435-1443.

Kaur, J., S. Mencl, A. Sahaboglu, P. Farinelli, T. van Veen, E. Zrenner, P. Ekstrom, F. Paquet-Durand, B. Arango-Gonzalez (2011). "Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats." PLoS One **6**(7): e22181.

Ke, Q., M. Costa (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." Mol Pharmacol **70**(5): 1469-1480.

Khan, M., H. Khan, I. Singh, A. K. Singh (2017). "Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury." Neural Regen Res **12**(5): 696-701.

Kim, C. R., J. H. Kim, H. L. Park, C. K. Park (2017). "Ischemia Reperfusion Injury Triggers TNFalpha Induced-Necroptosis in Rat Retina." Curr Eye Res **42**(5): 771-779.

Kolomeyer, A. M., M. A. Zarbin (2014). "Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases." Surv Ophthalmol **59**(2): 134-165.

Komeima, K., B. S. Rogers, P. A. Campochiaro (2007). "Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa." J Cell Physiol **213**(3): 809-815.

Komeima, K., B. S. Rogers, L. Lu, P. A. Campochiaro (2006). "Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11300-11305.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky,

G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kruk, J., K. Kubasik-Kladna, H. Y. Aboul-Enein (2015). "The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity." Mini Rev Med Chem **16**(3): 241-257.

Lakshmi, S. V., S. M. Naushad, C. A. Reddy, K. Saumya, D. S. Rao, S. Kotamraju, V. K. Kutala (2013). "Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective." Mol Cell Biochem **374**(1-2): 203-211.

LaMattina, K. C., D. A. Goldstein (2017). "Adalimumab for the treatment of uveitis." Expert Rev Clin Immunol **13**(3): 181-188.

Lamba, D. A., A. McUsic, R. K. Hirata, P.-R. Wang, D. Russell, T. A. Reh (2010). "Generation, Purification and Transplantation of Photoreceptors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells." PLOS ONE **5**(1): e8763.

Lang, M., A. Harris (2019). "Vascular dysfunction in retinitis pigmentosa." **97**(7): 660-664.

Langmann, T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." J Leukoc Biol **81**(6): 1345-1351.

LaVail, M. M., M. T. Matthes, D. Yasumura, R. H. Steinberg (1997). "Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse." Exp Eye Res **65**(1): 45-50.

Lawlor, K. E., N. Khan, A. Mildenhall, M. Gerlic, B. A. Croker, A. A. D'Cruz, C. Hall, S. Kaur Spall, H. Anderton, S. L. Masters, M. Rashidi, I. P. Wicks, W. S. Alexander, Y. Mitsuuchi, C. A. Benetatos, S. M. Condon, W. W. Wong, J. Silke, D. L. Vaux, J. E. Vince (2015). "RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL." Nat Commun **6**: 6282.

Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, W. C. Earnshaw (1994). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**(6495): 346-347.

Leal, I., F. B. Rodrigues, D. C. Sousa, V. C. Romao, G. S. Duarte, E. Carreno, A. D. Dick, C. Marques-Neves, J. Costa, J. E. Fonseca (2018). "Efficacy and safety of intravitreal anti-tumour necrosis factor drugs in adults with non-infectious uveitis - a systematic review." Acta Ophthalmol **96**(6): e665-e675.

Lee, S. Y., S. Usui, A. B. Zafar, B. C. Oveson, Y. J. Jo, L. Lu, S. Masoudi, P. A. Campochiaro (2011). "N-Acetylcysteine promotes long-term survival of cones in a model of retinitis pigmentosa." J Cell Physiol **226**(7): 1843-1849.

Leonard, K. C., D. Petrin, S. G. Coupland, A. N. Baker, B. C. Leonard, E. C. LaCasse, W. W. Hauswirth, R. G. Korneluk, C. Tsilfidis (2007). "XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa." PLoS One **2**(3): e314.

Li, J., F. Cao, H. L. Yin, Z. J. Huang, Z. T. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang (2020). "Ferroptosis: past, present and future." Cell Death Dis **11**(2): 88.

Li, T., M. A. Sandberg, B. S. Pawlyk, B. Rosner, K. C. Hayes, T. P. Dryja, E. L. Berson (1998). "Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and

proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11933-11938.

Li, Y., Y.-T. Tsai, C.-W. Hsu, D. Erol, J. Yang, W.-H. Wu, R. J. Davis, D. Egli, S. H. Tsang (2012). "Long-term Safety and Efficacy of Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPS) Grafts in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa." Molecular Medicine **18**(9): 1312-1319.

Limberaki, E., P. Eleftheriou, E. Vagdatli, V. Kostoglou, C. Petrou (2012). "Serum antioxidant status among young, middle-aged and elderly people before and after antioxidant rich diet." Hippokratia **16**(2): 118-123.

Lindahl, T., M. S. Satoh, G. G. Poirier, A. Klungland (1995). "Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks." Trends Biochem Sci **20**(10): 405-411.

Linsenmeier, R. A., L. Padnick-Silver (2000). "Metabolic dependence of photoreceptors on the choroid in the normal and detached retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(10): 3117-3123.

Lohr, H. R., K. Kuntchithapautham, A. K. Sharma, B. Rohrer (2006). "Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death." Exp Eye Res **83**(2): 380-389.

Lupien, C., M. Brenner, S. L. Guerin, C. Salette (2004). "Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Muller cells." Exp Eye Res **79**(3): 423-429.

Ma, C., F. Cheng, X. Wang, C. Zhai, W. Yue, Y. Lian, Q. Wang (2016). "Erythropoietin Pathway: A Potential Target for the Treatment of Depression." Int J Mol Sci **17**(5).

Ma, Y., R. Kawasaki, L. P. Dobson, J. B. Ruddle, L. S. Kearns, T. Y. Wong, D. A. Mackey (2012). "Quantitative analysis of retinal vessel attenuation in eyes with retinitis pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(7): 4306-4314.

Maeda, A., M. Mandai, M. Takahashi (2019). "Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases." Annu Rev Genomics Hum Genet.

Mahon, P. C., K. Hirota, G. L. Semenza (2001). "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity." Genes Dev **15**(20): 2675-2686.

Malik, A., T. D. Kanneganti (2017). "Inflammasome activation and assembly at a glance." **130**(23): 3955-3963.

Mandai, M., M. Fujii, T. Hashiguchi, G. A. Sunagawa, S.-i. Ito, J. Sun, J. Kaneko, J. Sho, C. Yamada, M. Takahashi (2017). "iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice." Stem Cell Reports **8**(1): 69-83.

Mañon Rossi, W., G. Garrido, A. J. Núñez Sellés (2016). "Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante." Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research **4**(2): 62-83.

Margolin, N., S. A. Raybuck, K. P. Wilson, W. Chen, T. Fox, Y. Gu, D. J. Livingston (1997). "Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases." J Biol Chem **272**(11): 7223-7228.

Martínez-Fernández de la Cámara, C. (2015). "Papel del estrés oxidativo y la inflamación en la retinosis pigmentaria. Efecto de la inhibición del TNFA en la progresión de la degeneración retiniana."

Martinez-Fernandez de la Camara, C., A. M. Hernandez-Pinto, L. Olivares-Gonzalez, C. Cuevas-Martin, M. Sanchez-Arago, D. Hervas, D. Salom, J. M. Cuezva, E. J. de la Rosa, J. M. Millan, R. Rodrigo (2015). "Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration." Sci Rep **5**: 11764.

Martinez-Fernandez de la Camara, C., L. Olivares-Gonzalez, D. Hervas, D. Salom, J. M. Millan, R. Rodrigo (2014). "Infliximab reduces Zaprinast-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina." J Neuroinflammation **11**: 172.

Martínez-Fernández de la Cámara, C., D. Salom, M. D. Sequedo, D. Hervás, C. Marín-Lambíes, E. Aller, T. Jaijo, M. Díaz-Llopis, J. M. Millán, R. Rodrigo (2013). "Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa." PLoS One **8**(9): e74223.

Martinez-Fernandez de la Camara, C., M. D. Sequedo, U. Gomez-Pinedo, T. Jaijo, E. Aller, P. Garcia-Tarraga, J. M. Garcia-Verdugo, J. M. Millan, R. Rodrigo (2013). "Phosphodiesterase inhibition induces retinal degeneration, oxidative stress and inflammation in cone-enriched cultures of porcine retina." Exp Eye Res **111**: 122-133.

Masland, R. H. (2012). "The neuronal organization of the retina." Neuron **76**(2): 266-280.

Massengill, M. T., C. M. Ahmed, A. S. Lewin, C. J. Idefonso (2018). Neuroinflammation in Retinitis Pigmentosa, Diabetic Retinopathy, and Age-Related Macular Degeneration: A Minireview, Cham, Springer International Publishing.

Matsuura, T., H. Kaneko (2020). "Diacron reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential tests for patients with age-related macular degeneration." **20**(1): 56.

Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, P. J. Ratcliffe (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-275.

McLaughlin, M. E., M. A. Sandberg, E. L. Berson, T. P. Dryja (1993). "Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa." Nat Genet **4**(2): 130-134.

Mendez-Vilas, A., J. Díaz (2010). Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, Formatex.

Merin, S., E. Auerbach (1976). "Retinitis pigmentosa." Surv Ophthalmol **20**(5): 303-346.

Micheau, O., J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.

Millington-Ward, S., N. Chadderton, M. O'Reilly, A. Palfi, T. Goldmann, C. Kilty, M. Humphries, U. Wolfrum, J. Bennett, P. Humphries, P. F. Kenna, G. J. Farrar (2011). "Suppression and replacement gene therapy for autosomal dominant disease in a murine model of dominant retinitis pigmentosa." Mol Ther **19**(4): 642-649.

Mirshahi, A., R. Hoehn, K. Lorenz, C. Kramann, H. Baatz (2012). "Anti-tumor necrosis factor alpha for retinal diseases: current knowledge and future concepts." *J Ophthalmic Vis Res* **7**(1): 39-44.

Moore, K. L. a. (2018). *Clinically oriented anatomy*. Philadelphia :, Wolters Kluwer.

Moriwaki, K., F. K. Chan (2017). "The Inflammatory Signal Adaptor RIPK3: Functions Beyond Necroptosis." *Int Rev Cell Mol Biol* **328**: 253-275.

Mou, Y., J. Wang, J. Wu, D. He, C. Zhang, C. Duan, B. Li (2019). "Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer." *J Hematol Oncol* **12**(1): 34.

Mowat, F. M., U. F. Luhmann, A. J. Smith, C. Lange, Y. Duran, S. Harten, D. Shukla, P. H. Maxwell, R. R. Ali, J. W. Bainbridge (2010). "HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia." *PLoS One* **5**(6): e11103.

Mrejen, S., I. Audo, S. Bonnel, J. A. Sahel (2017). "Retinitis Pigmentosa and Other Dystrophies." *Dev Ophthalmol* **58**: 191-201.

Murakami, Y., Y. Ikeda, S. Nakatake, K. Fujiwara, T. Tachibana, N. Yoshida, S. Notomi, T. Hisatomi, S. Yoshida, T. Ishibashi, K. H. Sonoda (2018). "C-Reactive protein and progression of vision loss in retinitis pigmentosa." *Acta Ophthalmol* **96**(2): e174-e179.

Murakami, Y., H. Matsumoto, M. Roh, J. Suzuki, T. Hisatomi, Y. Ikeda, J. W. Miller, D. G. Vavvas (2012). "Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell death in a mouse model of inherited degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(36): 14598-14603.

Murakami, Y., N. Yoshida, Y. Ikeda, S. Nakatake, K. Fujiwara, S. Notomi, T. Nabeshima, S. Nakao, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi (2015). "Relationship between aqueous flare and visual function in retinitis pigmentosa." *Am J Ophthalmol* **159**(5): 958-963.e951.

Murray, P. I., R. Hoekzema, M. A. van Haren, F. D. de Hon, A. Kijlstra (1990). "Aqueous humor interleukin-6 levels in uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**(5): 917-920.

Naessens, S., L. Ruyschaert, S. Lefever, F. Coppieters, E. De Baere (2019). "Antisense Oligonucleotide-Based Downregulation of the G56R Pathogenic Variant Causing NR2E3-Associated Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Genes (Basel)* **10**(5).

Nair, A. B., S. Jacob (2016). "A simple practice guide for dose conversion between animals and human." *J Basic Clin Pharm* **7**(2): 27-31.

Nakajima, H., H. Nagaso, N. Kakui, M. Ishikawa, T. Hiranuma, S. Hoshiko (2004). "Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells." *J Biol Chem* **279**(41): 42774-42786.

Nakatake, S., Y. Murakami, Y. Ikeda, N. Morioka, T. Tachibana, K. Fujiwara, N. Yoshida, S. Notomi, T. Hisatomi, S. Yoshida, T. Ishibashi, Y. Nakabeppu, K. H. Sonoda (2016). "MUTYH promotes oxidative microglial activation and inherited retinal degeneration." *JCI Insight* **1**(15): e87781.

Noailles, A., L. Fernandez-Sanchez, P. Lax, N. Cuenca (2014). "Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects." *J Neuroinflammation* **11**: 186.

Noailles, A., V. Maneu, L. Campello, P. Lax, N. Cuenca (2018). "Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy." *Cell Death Dis* **9**(3): 350.

O'Reilly, M., A. Palfi, N. Chadderton, S. Millington-Ward, M. Ader, T. Cronin, T. Tuohy, A. Auricchio, M. Hildinger, A. Tivnan, N. McNally, M. M. Humphries, A. S. Kiang, P. Humphries, P. F. Kenna, G. J. Farrar (2007). "RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo." *Am J Hum Genet* **81**(1): 127-135.

Ogle, M. E., X. Gu, A. R. Espinera, L. Wei (2012). "Inhibition of prolyl hydroxylases by dimethylloxaloylglycine after stroke reduces ischemic brain injury and requires hypoxia inducible factor-1alpha." *Neurobiol Dis* **45**(2): 733-742.

Olivares-Gonzalez, L., C. Martinez-Fernandez de la Camara, D. Hervas, J. M. Millan, R. Rodrigo (2018). "HIF-1alpha stabilization reduces retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa." *Faseb j* **32**(5): 2438-2451.

Ortega, R., A. López-Sobaler, P. Andrés, A. Requejo, A. Aparicio, L. Molinero (2019). "DIAL Programa para Evaluación de Dietas y cálculos de Alimentación." *Departamento de Nutrición (UCM) y Alceingeniería, S.A. Madrid, España.*

Otani, A., M. I. Dorrell, K. Kinder, S. K. Moreno, S. Nusinowitz, E. Banin, J. Heckenlively, M. Friedlander (2004). "Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells." *J Clin Invest* **114**(6): 765-774.

Oveson, B. C., T. Iwase, S. F. Hackett, S. Y. Lee, S. Usui, T. W. Sedlak, S. H. Snyder, P. A. Campochiaro, J. U. Sung (2011). "Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration." *J Neurochem* **116**(1): 144-153.

Ozaki, H., A. Y. Yu, N. Della, K. Ozaki, J. D. Luna, H. Yamada, S. F. Hackett, N. Okamoto, D. J. Zack, G. L. Semenza, P. A. Campochiaro (1999). "Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(1): 182-189.

Padnick-Silver, L., J. J. Kang Derwent, E. Giuliano, K. Narfstrom, R. A. Linsenmeier (2006). "Retinal oxygenation and oxygen metabolism in Abyssinian cats with a hereditary retinal degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(8): 3683-3689.

Pajovic, S., Z. S. Saicic, M. B. Spasic, V. M. Petrovic, J. V. Martinovic (1996). "Effect of progesterone and estradiol benzoate on superoxide dismutase activity in the brain of male rats." *Experientia* **52**(3): 221-224.

Panayiotidis, M. I., S. P. Stabler, R. H. Allen, A. Pappa, C. W. White (2009). "Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells." *Mutat Res* **674**(1-2): 23-30.

Pang, J. J., X. Dai, S. E. Boye, I. Barone, S. L. Boye, S. Mao, D. Everhart, A. Dinculescu, L. Liu, Y. Umino, B. Lei, B. Chang, R. Barlow, E. Strettoi, W. W. Hauswirth (2011). "Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the *rd10* mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa." *Mol Ther* **19**(2): 234-242.

Paquet-Durand, F., D. Sanges, J. McCall, J. Silva, T. van Veen, V. Marigo, P. Ekstrom (2010). "Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors." J Neurochem **115**(4): 930-940.

Paquet-Durand, F., J. Silva, T. Talukdar, L. E. Johnson, S. Azadi, T. van Veen, M. Ueffing, S. M. Hauck, P. A. Ekstrom (2007). "Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse." J Neurosci **27**(38): 10311-10319.

Parameswaran, N., S. Patial (2010). "Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20**(2): 87-103.

Park, S. S., G. Bauer, M. Abedi, S. Pontow, A. Panorgias, R. Jonnal, R. J. Zawadzki, J. S. Werner, J. Nolta (2014). "Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings." Invest Ophthalmol Vis Sci **56**(1): 81-89.

Pasparakis, M., P. Vandenabeele (2015). "Necroptosis and its role in inflammation." Nature **517**(7534): 311-320.

Peng, B., J. Xiao, K. Wang, K. F. So, G. L. Tipoe, B. Lin (2014). "Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa." J Neurosci **34**(24): 8139-8150.

Peng, J.-J., W.-T. Song, F. Yao, X. Zhang, J. Peng, X.-J. Luo, X.-B. Xia (2020). "Involvement of regulated necrosis in blinding diseases: Focus on necroptosis and ferroptosis." Experimental Eye Research **191**: 107922.

Pensado, A., F. J. Diaz-Corrales, B. De la Cerda, L. Valdés-Sánchez, A. A. Del Boz, D. Rodriguez-Martinez, A. B. García-Delgado, B. Seijo, S. S. Bhattacharya, A. Sanchez (2016). "Span poly-L-arginine nanoparticles are efficient non-viral vectors for PRPF31 gene delivery: An approach of gene therapy to treat retinitis pigmentosa." Nanomedicine **12**(8): 2251-2260.

Petrs-Silva, H., R. Linden (2014). "Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa." Clin Ophthalmol **8**: 127-136.

Piano, I., V. D'Antongiovanni, L. Testai, V. Calderone, C. Gargini (2019). "A Nutraceutical Strategy to Slowing Down the Progression of Cone Death in an Animal Model of Retinitis Pigmentosa." Front Neurosci **13**: 461.

Pittler, S. J., W. Baehr (1991). "Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8322-8326.

Polykratis, A., N. Hermance, M. Zelic, J. Roderick, C. Kim, T. M. Van, T. H. Lee, F. K. M. Chan, M. Pasparakis, M. A. Kelliher (2014). "Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo." J Immunol **193**(4): 1539-1543.

Punzo, C., K. Kornacker, C. L. Cepko (2009). "Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa." Nat Neurosci **12**(1): 44-52.

Purnyn, H. (2013). "The Mammalian Retina: Structure and Blood Supply." Neurophysiology **45**(3): 266-276.

- Qiu, X., M. Zhuang, Z. Lu, Z. Liu, D. Cheng, C. Zhu, J. Liu (2019). "RIPK1 suppresses apoptosis mediated by TNF and caspase-3 in intervertebral discs." J Transl Med **17**(1): 135.
- Rajala, A., Y. Wang, Y. Zhu, M. Ranjo-Bishop, J. X. Ma, C. Mao, R. V. Rajala (2014). "Nanoparticle-assisted targeted delivery of eye-specific genes to eyes significantly improves the vision of blind mice in vivo." Nano Lett **14**(9): 5257-5263.
- Ramirez-Lamelas, D. T., S. Benlloch-Navarro, R. Lopez-Pedrajas, R. Gimeno-Hernandez, T. Olivar, D. Silvestre, M. Miranda (2018). "Lipoic Acid and Progesterone Alone or in Combination Ameliorate Retinal Degeneration in an Experimental Model of Hereditary Retinal Degeneration." Front Pharmacol **9**: 469.
- Rana, T., P. Kotla, R. Fullard, M. Gorbatyuk (2017). "TNFa knockdown in the retina promotes cone survival in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis **1863**(1): 92-102.
- Rayapudi, S., S. G. Schwartz, X. Wang, P. Chavis (2013). "Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa." Cochrane Database Syst Rev **12**(12): Cd008428.
- Ren, H., N. Y. Liu, X. F. Song, Y. S. Ma, X. Y. Zhai (2011). "A novel specific application of pyruvate protects the mouse retina against white light damage: differential stabilization of HIF-1alpha and HIF-2alpha." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(6): 3112-3118.
- RetNet. "Retinal Information Network." from <https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>.
- Rivera, J. C., P. Sapienza, J. S. Joyal, F. Duhamel, Z. Shao, N. Sitaras, E. Picard, E. Zhou, P. Lachapelle, S. Chemtob (2011). "Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis." Neonatology **100**(4): 343-353.
- Robinson, N., R. Ganesan, C. Hegedus, K. Kovacs, T. A. Kufer, L. Virag (2019). "Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos." Redox Biol **26**: 101239.
- Roche, S. L., A. M. Ruiz-Lopez, J. N. Moloney, A. M. Byrne, T. G. Cotter (2018). "Microglial-induced Muller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa." **66**(2): 295-310.
- Rodriguez-Vargas, J. M., M. J. Ruiz-Magana, C. Ruiz-Ruiz, J. Majuelos-Melguizo, A. Peralta-Leal, M. I. Rodriguez, J. A. Munoz-Gamez, M. R. de Almodovar, E. Siles, A. L. Rivas, M. Jaattela, F. J. Oliver (2012). "ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy." Cell Res **22**(7): 1181-1198.
- Rojo, A. I., G. McBean, M. Cindric, J. Egea, M. G. Lopez, P. Rada, N. Zarkovic, A. Cuadrado (2014). "Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance." Antioxid Redox Signal **21**(12): 1766-1801.
- Román, J., M. Izquierdo (2012). "Capacidad antioxidante de la dieta española; rueda de los alimentos antioxidantes." Sociedad española de dietética y ciencias de la alimentación.
- Rouleau, M., A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, G. G. Poirier (2010). "PARP inhibition: PARP1 and beyond." Nat Rev Cancer **10**(4): 293-301.

Roy, A., A. Jana, K. Yatish, M. B. Freidt, Y. K. Fung, J. A. Martinson, K. Pahan (2008). "Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases." Free Radic Biol Med **45**(5): 686-699.

Russell, S., J. Bennett, J. A. Wellman, D. C. Chung, Z. F. Yu, A. Tillman, J. Wittes, J. Pappas, O. Elci, S. McCague, D. Cross, K. A. Marshall, J. Walshire, T. L. Kehoe, H. Reichert, M. Davis, L. Raffini, L. A. George, F. P. Hudson, L. Dingfield, X. Zhu, J. A. Haller, E. H. Sohn, V. B. Mahajan, W. Pfeifer, M. Weckmann, C. Johnson, D. Gewaily, A. Drack, E. Stone, K. Wachtel, F. Simonelli, B. P. Leroy, J. F. Wright, K. A. High, A. M. Maguire (2017). "Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial." Lancet **390**(10097): 849-860.

Ryou, M. G., D. C. Flaherty, B. Hoxha, J. Sun, H. Gurji, S. Rodriguez, G. Bell, A. H. Olivencia-Yurvati, R. T. Mallet (2009). "Pyruvate-fortified cardioplegia evokes myocardial erythropoietin signaling in swine undergoing cardiopulmonary bypass." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(5): H1914-1922.

Ryou, M. G., R. Liu, M. Ren, J. Sun, R. T. Mallet, S. H. Yang (2012). "Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway." Stroke **43**(4): 1101-1107.

Sahaboglu, A., M. Barth, E. Secer, E. M. Amo, A. Urtti, Y. Arsenijevic, E. Zrenner, F. Paquet-Durand (2016). "Olaparib significantly delays photoreceptor loss in a model for hereditary retinal degeneration." Sci Rep **6**: 39537.

Salom, D., M. Diaz-Llopis, S. García-Delpech, P. Udaondo, M. Sancho-Tello, F. J. Romero (2008). "Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor in retinitis pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(8): 3499-3502.

Salvador Castell, G., L. Serra-Majem, L. Ribas-Barba (2015). "What and how much do we eat? 24-hour dietary recall method." Nutr Hosp **31 Suppl 3**: 46-48.

Sanchez-Vallejo, V., S. Benlloch-Navarro, R. Lopez-Pedrajas, F. J. Romero, M. Miranda (2015). "Neuroprotective actions of progesterone in an in vivo model of retinitis pigmentosa." Pharmacol Res **99**: 276-288.

Sanges, D., A. Comitato, R. Tammaro, V. Marigo (2006). "Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17366-17371.

Sanz, M. M., L. E. Johnson, S. Ahuja, P. A. Ekstrom, J. Romero, T. van Veen (2007). "Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration." Neuroscience **145**(3): 1120-1129.

Sasahara, M., A. Otani, A. Oishi, H. Kojima, Y. Yodoi, T. Kameda, H. Nakamura, N. Yoshimura (2008). "Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration." Am J Pathol **172**(6): 1693-1703.

Sato, K., S. Li, W. C. Gordon, J. He, G. I. Liou, J. M. Hill, G. H. Travis, N. G. Bazan, M. Jin (2013). "Receptor interacting protein kinase-mediated necrosis contributes to cone and rod photoreceptor degeneration in the retina lacking interphotoreceptor retinoid-binding protein." J Neurosci **33**(44): 17458-17468.

Saxena, S., V. K. Khanna, A. B. Pant, C. H. Meyer, V. K. Singh (2011). "Elevated tumor necrosis factor in serum is associated with increased retinal ischemia in proliferative eales' disease." Pathobiology **78**(5): 261-265.

Scortegagna, M., K. Ding, Y. Oktay, A. Gaur, F. Thurmond, L. J. Yan, B. T. Marck, A. M. Matsumoto, J. M. Shelton, J. A. Richardson, M. J. Bennett, J. A. Garcia (2003). "Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice." Nat Genet **35**(4): 331-340.

Scott, P. A., H. J. Kaplan, M. A. McCall (2015). "Prenatal Exposure to Curcumin Protects Rod Photoreceptors in a Transgenic Pro23His Swine Model of Retinitis Pigmentosa." Transl Vis Sci Technol **4**(5): 5.

Schlegel, J., I. Peters, S. Orrenius, D. K. Miller, N. A. Thornberry, T. T. Yamin, D. W. Nicholson (1996). "CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis." J Biol Chem **271**(4): 1841-1844.

Schulz, M., H. Dotzlaw (2014). "Ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: serum levels of TNF-alpha and Its soluble receptors during the course of therapy with etanercept and infliximab." **2014**: 675108.

Schwartz, S. D., C. D. Regillo, B. L. Lam, D. Elliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J. P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spirn, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore, R. Lanza (2015). "Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies." Lancet **385**(9967): 509-516.

Sears, J. E., G. Hoppe, Q. Ebrahim, B. Anand-Apte (2008). "Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19898-19903.

Seddon, J. M., S. George, B. Rosner, N. Rifai (2005). "Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers." Arch Ophthalmol **123**(6): 774-782.

Semenza, G. L. (2004). "Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level." Physiology (Bethesda) **19**: 176-182.

Shao, A., J. N. Hathcock (2006). "Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene." Regul Toxicol Pharmacol **45**(3): 289-298.

Sheets, K. G., B. Jun, Y. Zhou, M. Zhu, N. A. Petasis, W. C. Gordon, N. G. Bazan (2013). "Microglial ramification and redistribution concomitant with the attenuation of choroidal neovascularization by neuroprotectin D1." Mol Vis **19**: 1747-1759.

Shen, H. M., P. Codogno (2012). "Autophagy is a survival force via suppression of necrotic cell death." Exp Cell Res **318**(11): 1304-1308.

Shen, J., X. Yang, A. Dong, R. M. Petters, Y. W. Peng, F. Wong, P. A. Campochiaro (2005). "Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa." J Cell Physiol **203**(3): 457-464.

Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Exp Physiol **82**(2): 291-295.

Silverthorn, D. (2019). Fisiología Humana. Un enfoque integrado.

Simunovic, M. P., W. Shen, J. Y. Lin, D. A. Protti, L. Lisowski, M. C. Gillies (2019). "Optogenetic approaches to vision restoration." Exp Eye Res **178**: 15-26.

Siqueira, R. C., A. Messias, K. Messias, R. S. Arcieri, M. A. Ruiz, N. F. Souza, L. C. Martins, R. Jorge (2015). "Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell -clinical trial)." Stem Cell Res Ther **6**: 29.

Siqueira, R. C., A. Messias, J. C. Voltarelli, I. U. Scott, R. Jorge (2011). "Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial." Retina **31**(6): 1207-1214.

Sosna, J., S. Voigt, S. Mathieu, A. Lange, L. Thon, P. Davarnia, T. Herdegen, A. Linkermann, A. Rittger, F. K. Chan, D. Kabelitz, S. Schutze, D. Adam (2014). "TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death." Cell Mol Life Sci **71**(2): 331-348.

Souied, E., J. Pulido, G. Staurengi (2017). "Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration." N Engl J Med **377**(8): 792.

Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, B. Seed (1995). "RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death." Cell **81**(4): 513-523.

Stein, D. G., D. W. Wright, A. L. Kellermann (2008). "Does progesterone have neuroprotective properties?" Ann Emerg Med **51**(2): 164-172.

Stoica, B. A., D. J. Loane, Z. Zhao, S. V. Kabadi, M. Hanscom, K. R. Byrnes, A. I. Faden (2014). "PARP-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury." J Neurotrauma **31**(8): 758-772.

Stone, J., J. Maslim, K. Valter-Kocsi, K. Mervin, F. Bowers, Y. Chu, N. Barnett, J. Provis, G. Lewis, S. K. Fisher, S. Bisti, C. Gargini, L. Cervetto, S. Merin, J. Peer (1999). "Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina." Prog Retin Eye Res **18**(6): 689-735.

Syeda, S., A. K. Patel, T. Lee, A. S. Hackam (2015). "Reduced photoreceptor death and improved retinal function during retinal degeneration in mice lacking innate immunity adaptor protein MyD88." Exp Neurol **267**: 1-12.

Tang, D., R. Kang, T. V. Berghe, P. Vandenabeele (2019). "The molecular machinery of regulated cell death." **29**(5): 347-364.

Ten Berge, J. C., Z. Fazil, I. van den Born, R. C. W. Wolfs, M. W. J. Schreurs, W. A. Dik, A. Rothova (2019). "Intraocular cytokine profile and autoimmune reactions in retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma and cataract." **97**(2): 185-192.

Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen, V. M. Dixit (1995). "Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase." Cell **81**(5): 801-809.

Thomson, L. R., Y. Toyoda, A. Langner, F. C. Delori, K. M. Garnett, N. Craft, C. R. Nichols, K. M. Cheng, C. K. Dorey (2002). "Elevated retinal zeaxanthin and prevention of light-induced

photoreceptor cell death in quail." Investigative Ophthalmology and Visual Science **43**(11): 3538-3549.

Thuy le, T. T., T. T. V. Thuy, H. Hai, N. Kawada (2017). Chapter 16 - Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Hepatic Fibrosis. Liver Pathophysiology. P. Muriel. Boston, Academic Press: 213-224.

Ting, A. T., M. J. M. Bertrand (2016). "More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling." Trends Immunol **37**(8): 535-545.

Todorova, M. G., C. Turksever, A. Schotzau, D. F. Schorderet, C. Valmaggia (2016). "Metabolic and functional changes in retinitis pigmentosa: comparing retinal vessel oximetry to full-field electroretinography, electrooculogram and multifocal electroretinography." Acta Ophthalmol **94**(3): e231-241.

Tortora, G. J., B. Derrickson (2018). Principios de anatomía y fisiología, 15 edición. Madrid etc., Médica Panamericana.

Totsuka, K., T. Ueta, T. Uchida, M. F. Roggia, S. Nakagawa, D. G. Vavvas, M. Honjo, M. Aihara (2019). "Oxidative stress induces ferroptotic cell death in retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **181**: 316-324.

Travis, G. H., M. Golczak, A. R. Moise, K. Palczewski (2007). "Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 469-512.

Trichonas, G., T. J. Lee, G. Hoppe, J. Au, J. E. Sears (2013). "Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy in the rat 50/10 model." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(7): 4919-4926.

Trinidad Rodríguez, I., J. Fernández Ballart, G. Cucó Pastor, E. Biarnés Jordà, V. Arija Val (2008). "Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez." Nutrición Hospitalaria **23**: 242-252.

Tucker, B. A., I.-H. Park, S. D. Qi, H. J. Klassen, C. Jiang, J. Yao, S. Redenti, G. Q. Daley, M. J. Young (2011). "Transplantation of Adult Mouse iPS Cell-Derived Photoreceptor Precursors Restores Retinal Structure and Function in Degenerative Mice." PLOS ONE **6**(4): e18992.

Turksever, C., C. Valmaggia, S. Orgul, D. F. Schorderet, J. Flammer, M. G. Todorova (2014). "Retinal vessel oxygen saturation and its correlation with structural changes in retinitis pigmentosa." Acta Ophthalmol **92**(5): 454-460.

Turner, C. M., N. Arulkumaran, M. Singer, R. J. Unwin, F. W. Tam (2014). "Is the inflammasome a potential therapeutic target in renal disease?" BMC Nephrol **15**: 21.

Ueda-Consolvo, T., C. Fuchizawa, M. Otsuka, T. Nakagawa, A. Hayashi (2015). "Analysis of retinal vessels in eyes with retinitis pigmentosa by retinal oximeter." Acta Ophthalmol **93**(6): e446-450.

Uren, P. J., J. T. Lee, M. M. Doroudchi, A. D. Smith, A. Horsager (2014). "A profile of transcriptomic changes in the *rd10* mouse model of retinitis pigmentosa." Mol Vis **20**: 1612-1628.

Usui, S., K. Komeima, S. Y. Lee, Y. J. Jo, S. Ueno, B. S. Rogers, Z. Wu, J. Shen, L. Lu, B. C. Oveson, P. S. Rabinovitch, P. A. Campochiaro (2009). "Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa." Mol Ther **17**(5): 778-786.

Vadlapatla, R. K., A. D. Vadlapudi, A. K. Mitra (2013). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases." Curr Drug Targets **14**(8): 919-935.

Van Herreweghe, F., N. Festjens, W. Declercq, P. Vandenamee (2010). "Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question." Cell Mol Life Sci **67**(10): 1567-1579.

Vandenamee, P., W. Declercq, F. Van Herreweghe, T. Vandenberghe (2010). "The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis." Sci Signal **3**(115): re4.

Vanlangenakker, N., T. Vandenberghe, P. Vandenamee (2012). "Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview." Cell Death Differ **19**(1): 75-86.

Vasireddy, V., V. R. Chavali, V. T. Joseph, R. Kadam, J. H. Lin, J. A. Jamison, U. B. Kompella, G. B. Reddy, R. Ayyagari (2011). "Rescue of photoreceptor degeneration by curcumin in transgenic rats with P23H rhodopsin mutation." PLoS One **6**(6): e21193.

Vilhardt, F. (2005). "Microglia: phagocyte and glia cell." Int J Biochem Cell Biol **37**(1): 17-21.

Viringipurampeer, I. A., A. E. Bashar, C. Y. Gregory-Evans, O. L. Moritz, K. Gregory-Evans (2013). "Targeting inflammation in emerging therapies for genetic retinal disease." Int J Inflamm **2013**: 581751.

Viringipurampeer, I. A., C. Y. Gregory-Evans, A. L. Metcalfe, E. Bashar, O. L. Moritz, K. Gregory-Evans (2019). "Cell Death Pathways in Mutant Rhodopsin Rat Models Identifies Genotype-Specific Targets Controlling Retinal Degeneration." **56**(3): 1637-1652.

Viringipurampeer, I. A., A. L. Metcalfe, A. E. Bashar, O. Sivak, A. Yanai, Z. Mohammadi, O. L. Moritz, C. Y. Gregory-Evans, K. Gregory-Evans (2016). "NLRP3 inflammasome activation drives bystander cone photoreceptor cell death in a P23H rhodopsin model of retinal degeneration." Hum Mol Genet **25**(8): 1501-1516.

Wakakura, M., W. S. Foulds (1989). "Response of cultured Muller cells to heat shock--an immunocytochemical study of heat shock and intermediate filament proteins in response to temperature elevation." Exp Eye Res **48**(3): 337-350.

Wang, K., J. Xiao, B. Peng, F. Xing, K.-F. So, G. L. Tipoe, B. Lin (2014a). "Retinal structure and function preservation by polysaccharides of wolfberry in a mouse model of retinal degeneration." Scientific Reports **4**: 7601.

Wang, K., J. Xiao, B. Peng, F. Xing, K. F. So, G. L. Tipoe, B. Lin (2014b). "Retinal structure and function preservation by polysaccharides of wolfberry in a mouse model of retinal degeneration." Sci Rep **4**: 7601.

Wang, Z. Q., L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff, E. F. Wagner (1997). "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis." Genes Dev **11**(18): 2347-2358.

Wegner, A., S. Benson, L. Rebernik, I. Spreitzer, M. Jager, M. Schedlowski, S. Elsenbruch, H. Engler (2017). "Sex differences in the pro-inflammatory cytokine response to endotoxin unfold in vivo but not ex vivo in healthy humans." Innate Immun **23**(5): 432-439.

Wegner, K. W., D. Saleh, A. Degterev (2017). "Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis." Trends Pharmacol Sci **38**(3): 202-225.

Wei, Y., H. Hong, X. Zhang, W. Lai, Y. Wang, K. Chu, J. Brown, G. Hong, L. Chen (2017). "Salidroside Inhibits Inflammation Through PI3K/Akt/HIF Signaling After Focal Cerebral Ischemia in Rats." Inflammation **40**(4): 1297-1309.

Wu, L., J. F. Arevalo, E. Hernandez-Bogantes, C. V. Regatieri, J. A. Roca, M. E. Farah (2013). "Intravitreal tumor necrosis factor-alpha inhibitors for neovascular age-related macular degeneration suboptimally responsive to antivasular endothelial growth factor agents: a pilot study from the Pan American Collaborative Retina Study Group." J Ocul Pharmacol Ther **29**(3): 366-371.

Wu, L., E. Hernandez-Bogantes, J. A. Roca, J. F. Arevalo, K. Barraza, A. F. Lasave (2011). "intravitreal tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of refractory diabetic macular edema: a pilot study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group." Retina **31**(2): 298-303.

Xiong, W., A. E. MacColl Garfinkel, Y. Li, L. I. Benowitz, C. L. Cepko (2015). "NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage." J Clin Invest **125**(4): 1433-1445.

Xu, J., H. Wang, S. J. Won, J. Basu, D. Kapfhamer, R. A. Swanson (2016). "Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1." Glia **64**(11): 1869-1878.

Yang, H., Y. Fu, X. Liu, P. K. Shahi, T. A. Mavlyutov, J. Li, A. Yao, S. Z. Guo, B. R. Pattnaik, L. W. Guo (2017). "Role of the sigma-1 receptor chaperone in rod and cone photoreceptor degenerations in a mouse model of retinitis pigmentosa." Mol Neurodegener **12**(1): 68.

Yerramothu, P., A. K. Vijay, M. D. P. Willcox (2018). "Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome therapy." Eye (Lond) **32**(3): 491-505.

Yoshida, N., Y. Ikeda, S. Notomi, K. Ishikawa, Y. Murakami, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi (2013a). "Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa." Ophthalmology **120**(1): 100-105.

Yoshida, N., Y. Ikeda, S. Notomi, K. Ishikawa, Y. Murakami, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi (2013b). "Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa." Ophthalmology **120**(1): e5-12.

Yu, D. Y., S. Cringle, K. Valter, N. Walsh, D. Lee, J. Stone (2004). "Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 2013-2019.

Yu, D. Y., S. J. Cringle (2005). "Retinal degeneration and local oxygen metabolism." Exp Eye Res **80**(6): 745-751.

Yu, D. Y., S. J. Cringle, E. N. Su, P. K. Yu (2000). "Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(12): 3999-4006.

Yu, M., W. Yan, C. Beight (2018). "Lutein and Zeaxanthin Isomers Reduce Photoreceptor Degeneration in the Pde6b (*rd10*) Mouse Model of Retinitis Pigmentosa." Biomed Res Int **2018**: 4374087.

Yu, S. W., S. A. Andrabi, H. Wang, N. S. Kim, G. G. Poirier, T. M. Dawson, V. L. Dawson (2006). "Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18314-18319.

Zeng, H. Y., X. A. Zhu, C. Zhang, L. P. Yang, L. M. Wu, M. O. Tso (2005). "Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(8): 2992-2999.

Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong, J. Han (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-336.

Zhang, L., X. Cui, R. Jauregui, K. S. Park, S. Justus, Y. T. Tsai, J. K. Duong, C. W. Hsu, W. H. Wu, C. L. Xu, C. S. Lin, S. H. Tsang (2018). "Genetic Rescue Reverses Microglial Activation in Preclinical Models of Retinitis Pigmentosa." Mol Ther **26**(8): 1953-1964.

Zhang, Q. (2016). "Retinitis Pigmentosa: Progress and Perspective." Asia Pac J Ophthalmol (Phila) **5**(4): 265-271.

Zhang, X., U. Shahani, J. Reilly, X. Shu (2019). "Disease mechanisms and neuroprotection by tauroursodeoxycholic acid in Rprg knockout mice."

Zhao, L., M. K. Zabel, X. Wang, W. Ma, P. Shah, R. N. Fariss, H. Qian, C. N. Parkhurst, W. B. Gan, W. T. Wong (2015). "Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration." EMBO Mol Med **7**(9): 1179-1197.

Zhao, Y., K. Feng (2019). "Vitamins and Mineral Supplements for Retinitis Pigmentosa." **2019**: 8524607.

Zhou, L., W. Wang, Y. Liu, J. Fernandez de Castro, T. Ezashi, B. P. Telugu, R. M. Roberts, H. J. Kaplan, D. C. Dean (2011). "Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina." Stem Cells **29**(6): 972-980.

Zhou, R., R. R. Caspi (2010). "Ocular immune privilege." F1000 Biol Rep **2**.

Zong, Y., L. Lin, C. Yi, X. Huang, Y. Fu, Y. Dong, X. Qian, Y. Li, Q. Gao (2016). "Retinal vessel oxygen saturation and vessel diameter in retinitis pigmentosa at various ages." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **254**(2): 243-252.

