Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Mecanismos moleculares y neuroquímicos del reloj circadiano en la retina de mamíferos: interacción con los núcleos supraquiasmáticos

de Zavalía, Nuria María Asunción

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
de Zavalía, Nuria María Asunción. (2010). Mecanismos moleculares y neuroquímicos del reloj circadiano en la retina de mamíferos: interacción con los núcleos supraquiasmáticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
de Zavalía, Nuria María Asunción. "Mecanismos moleculares y neuroquímicos del reloj circadiano en la retina de mamíferos: interacción con los núcleos supraquiasmáticos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Mecanismos Moleculares y Neuroquímicos del Reloj Circadiano en la Retina de Mamíferos: Interacción con los Núcleos Supraquiasmáticos

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor: Licenciada Nuria María Asunción de Zavalía

Directora de tesis: Prof. Dra. Ruth Estela Rosenstein

Consejera de estudios: Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Departamento de Bioquímica Humana, Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental. Facultad de Medicina. UBA.

Buenos Aires, 2010

Mecanismos Moleculares y Neuroquímicos del Reloj Circadiano en la Retina de Mamíferos: Interacción con los Núcleos Supraquiasmáticos

***Resumen*:** En este trabajo de Tesis se demostró, por primera vez, que la síntesis retiniana de prostaglandinas E2 y F2α en el hámster dorado varía circadianamente aún en condiciones de oscuridad constante y está regulada por un reloj circadiano local, independiente de los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), posiblemente localizado en la capa de células ganglionares. Asimismo, se demostró la existencia de variaciones diarias en los niveles nucleares (pero no citosólicos) de las proteínas reloj CLOCK y BMAL1 que persisten en condiciones constantes de iluminación ambiental, son independientes, al menos en parte, de la actividad del reloj hipotalámico y se expresan exclusivamente en las células ganglionares. Este conjunto de resultados indican un rol central para las células ganglionares de la retina en la actividad circadiana local. Dadas estas evidencias, se evaluaron las funciones no visuales en un modelo experimental de glaucoma. Para ello se desarrolló un modelo experimental de glaucoma a través de la administración semanal de condroitín sulfato (CS) en la cámara anterior del ojo de rata, que reproduce características centrales del glaucoma humano. Se demostró una disminución significativa en los niveles de melanopsina y en el número de células ganglionares que expresan este fotopigmento. Asimismo, se demostró una alteración significativa en el reflejo pupilar aferente, en la supresión fótica de la producción nocturna de melatonina pineal, en la inducción por luz de c-Fos en los NSQ y en los ritmos de actividad locomotora, luego de 10 semanas de tratamiento con CS. Estos resultados indican que el glaucoma induce alteraciones significativas en el sistema visual no formador de imágenes. En este contexto, se evaluó la fisiología circadiana en pacientes con glaucoma avanzado. Los resultados obtenidos demostraron que la eficiencia del sueño fue significativamente mayor en el grupo de pacientes control, en tanto que la cantidad de minutos de vigilia y la actividad durante el intervalo de sueño fueron mayores en el grupo de pacientes con glaucoma. Estos resultados, sugieren alteraciones circadianas, particularmente en la calidad de sueño, en pacientes con glaucoma avanzado.

Palabras claves: retina, ritmos circadianos, genes reloj, prostaglandinas, glaucoma, melanopsina, reflejo pupilar, melatonina.

Molecular and Neurochemical Mechanisms of the Circadian Clock in the Mammalian Retina: Interaction with Suprachiasmatic Nuclei

Summary: In this thesis work, for the first time, we have demonstrated the existence of daily variations in the retinal synthesis of prostaglandins E2 and F2α in the golden hamster, which persisted even under constant darkness conditions. These variations are regulated by a retinal circadian clock, independent from the suprachiasmatic nuclei (SCN) and presumably located in retinal ganglion cells. We have also demonstrated the existence of daily variations in nuclear (but not cytosolic) levels of CLOCK and BMAL1 proteins that persisted in constant ambient lighting conditions, partially depended on the activity of the primary circadian pacemaker and are expressed exclusively in retinal ganglion cells. These results indicate a central role for ganglion cells in the retinal circadian activity. Based on these evidences, we evaluated the non-image forming visual system in an experimental model of glaucoma. For this purpose, we developed an experimental model of glaucoma in rats, induced by weekly injections of chondroitin sulphate (CS) in the eye anterior chamber, which reproduces central features of human glaucoma. We demonstrated a significant decrease in the levels of melanopsin and in the number of retinal ganglion cells which express this photopigment. We have also shown significant alterations in the afferent pupillary light reflex, the photic suppression of nocturnal pineal melatonin content, in the light-induced expression of c-Fos in the SCN and in the locomotor activity rhythms, after 10 weeks of treatment with CS. These results indicate that glaucoma induces significant alterations in the non-image forming visual system. In this context, we evaluated the circadian physiology in patients with advanced glaucoma. The results showed that the sleep efficiency was significantly higher in the control group, while the wake minutes and activity during the sleep interval were higher in the group of patients with glaucoma. These results suggest circadian disorders, particularly in the sleep quality, in patients with advanced glaucoma.

***Key words*:** retina, circadian rhythms, clock genes, prostaglandins, glaucoma, melanopsina, pupillary light reflex, melatonin.

Agradecimientos

- A Ruth, porque sin su dirección la finalización de este trabajo no hubiera sido posible. Por ser una fuente de motivación y un ejemplo de dedicación. Por enseñarme a pensar, leer y escribir ciencia. Por todo lo aprendido y por querer lo mejor para mí. Gracias de corazón, por ser una verdadera maestra. Muchas, muchas gracias!
- A Diego Golombek, por todas sus sugerencias y consejos y principalmente por su invaluable ayuda con la cronobiología.
- A Mario Guido, por su ayuda en los comienzos y por sus consejos.
- A Inés, Moni y Dani, por su cariño y por enseñarme todo o casi todo lo que se de la parte técnica del laboratorio, por su buena onda, por su ayuda con la estadística y la bibliografía y sobre todo por las charlas y carcajadas.
- A los chicos del labo, Caro, Ceci, Pablo, Maga, Diego, Eze, Damián, Flor y Meli, por hacer del laboratorio un lugar de camaradería, alegre y distendido. Por todos los momentos compartidos, por la catarsis, por su buena compañía y por su amistad.
- A los "cronobiólogos" de Quilmes, Santi, Juan, Pato, Lau, Juliana, por sus consejos, por bancarse mis preguntas molestas y "caídas" en el labo en cualquier momento. Por su gran ayuda con "el Temps".
- A los chicos de Córdoba, Pau, Diego y Dani, por el intercambio de ideas, por sus sugerencias y ayuda con la discusión de los resultados.
- A Cora y cia., por siempre estar al lado para dar una mano, por el intercambio de drogas (legales).
- A Libertad, por cuidar los animales y por lograr que haya animales!
- A Ana Franchi y al CEFyBO, por darme una mano siempre que la necesité y por darme un lugar de trabajo.
- A Hernán Aldana por enseñarme histología, por todo su apoyo y por su excelente compañía y amistad.
- A mis viejos, por ser un ejemplo, por sus palabras de aliento y superación, por enseñarme que sin importar la edad siempre se pueden aprender cosas nuevas, por tener tanta confianza en mí y por quererme tanto. El ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.
- A Gra y Buli, por aceptarme en la familia y aceptar mis logros como si fueran suyos. Por querer lo mejor para mí y brindarme todo su apoyo.
- A Neli, por quererme como una madre y consentirme como una abuela, porque gracias a ella creo que soy una mejor persona y por estar siempre que la necesité.

- A mis hermanos (incluidos Angie, Ceci y Tomasito), por permitirme ser la única DOCTORA de la familia.
- A mis primas, Van y Sam; a mis primos, Emi y Diego y a mis tíos, Adri y Jorge, por todo su apoyo incondicional y sus palabras de aliento.
- A Quito, por ser el hermano “mayor” que nunca tuve…pero a veces tengo. Por sus consejos, por escucharme y lograr que siempre me sienta mejor, por tener siempre una respuesta que me deje conforme.
- A Ire, por su amistad sincera y leal, por considerar que sólo por hacer investigación soy una persona inteligente, por siempre ofrecerme su ayuda.
- A mis amigos: Lu, Die, Sil y Jime por todos los momentos compartidos durante estos años, por distraerme de mi trabajo y ayudarme a ser quien soy.
- A Nico, porque sin su ayuda no hubiera llegado al final, por su tranquilidad incluso en los momentos de más estrés, por querer ayudarme siempre, aunque sepa que no puede, por bancarse mis frustraciones y enojos irracionales, por su amor incondicional. Porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.
- Al CONICET y a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, por las becas que me otorgaron para la realización de este trabajo de doctorado.
- Al Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, por brindarme un ámbito propicio para realizar mi trabajo de Tesis.
- En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

ABREVIATURAS 1

INTRODUCCION 4

1. El ojo 4

1.1 Cámara anterior y humor acuoso 6

Producción y circulación del humor acuoso 7

La red trabecular 10

1.2. La retina 11

2. Los ritmos circadianos 16

3. El sistema circadiano 18

3.1. Mecanismos moleculares de oscilación del reloj 23

4. La retina como reloj circadiano autónomo 25

4.1. Nuevos fotorreceptores retinianos 29

4.2. Las prostaglandinas en la retina 34

5. El glaucoma 36

5.1. Modelos experimentales de glaucoma 38

OBJETIVOS 42

MATERIALES Y METODOS 43

1. Animales 40

1.1. Hámsteres 43

1.2. Ratas 43

2. Determinación de la liberación de PGs retinianas 44

3. Determinación de los niveles de COX-1, COX-2, CLOCK, BMAL-1, rodopsina, melanopsina y Thy-1 44

3.1. Preparación de las muestras para determinar niveles de COX-1 y COX-2 44

3.2. Preparación de las muestras para determinar nieles de CLOCK y BMAL1 45

3.3. Preparación de las muestras para determinar niveles de rodopsina, melanopsina y Thy-1 45

3.4. *Western blot* 46

4. Determinación de la localización de COX-1, COX-2, CLOCK, BMAL1 47

5. Lesión de los Núcleos supraquiasmáticos (NSQ) 48

6. Ritmos de actividad locomotora en hámsteres y ratas 48

7. Administración intracameral de condroitín sulfato (CS) 49

8. Determinación de la presión intraocular (PIO) 51

9. Estudios electrorretinográficos 52
10. Potenciales visuales evocados (VEPs) 53
11. Microscopía óptica y análisis de imágenes de la retina y nervio óptico de rata 54
11.1. Estudio histopatológico 54
11.2. Procesado de imágenes 54
11.3. Morfometría del nervio óptico 55
12. Inmunocitoquímica de melanopsina 56
13. Marcación retrógrada de CGRs que proyectan al Colículo Superior 56
14. Evaluación del reflejo pupilar (RP) 57
15. Determinación de la supresión fótica de la síntesis nocturna de melatonina pineal 58
16. Determinación de la inducción por luz del gen de expresión temprana c-fos en los NSQ 58
17. Determinación de los ritmos de actividad en pacientes con glaucoma 59
17.1. Reclutamiento de los participantes 59
17.2. Registro de la actividad en pacientes 60
18. Determinación del contenido de proteínas 61
19. Análisis estadístico 61
RESULTADOS 62
1. Estudio de la síntesis de PGs en la retina del hámster desde una perspectiva cronobiológica 62
2. Estudio de las variaciones circadianas de proteínas CLOCK y BMAL1 en la retina del hámster dorado 69
3. Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma en ratas 75
4. Estudio de funciones visuales no formadoras de imagen en el modelo de glaucoma experimental inducido por CS 84
5. Estudio del ritmo diario de actividad en pacientes con glaucoma 94
DISCUSIÓN 99
Parte II 109
Consecuencias conceptuales de los resultados 124
CONCLUSIONES 126
BIBLIOGRAFIA 128

A: amplitud

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AH: ácido hialurónico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de varianza

AO: ambos ojos

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNT: del inglés *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

ATP: adenosina trifosfato

AV: agudeza visual

b-HLH: Motivo hélice-lazo-hélice básico

BMAL1: del inglés *Brain and Muscle ARNT-Like protein 1*

BMC: biomicroscopía

BSA: albúmina de suero bovino

Ci: Curie

CCG: capa de células ganglionares

c-fos: oncogén FBJ osteosarcoma

CGRs: células ganglionares de la retina

CGRsif: células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles

CKIε: caseína kinasa I epsilon

CLOCK: del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*

CNE: capa nuclear externa

CNI: capa nuclear interna

COX: ciclooxigenasa

CPE: capa plexiforme externa

CPI: capa plexiforme interna

CRY: criptocromo

CS: condroitín sulfato

Cs: colículo superior

DBT: del inglés *doubletime*

D:D: oscuridad constante

dln: dentro de los límites normales

DM: defecto medio

DSM: desviación estándar modelo

DTT: ditiotreitol

dpm: desintegraciones por minuto

EE: error estándar

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

EGTA: ácido etilenglicol tetra-acético

EP: epitelio pigmentario

ERG: electrorretinograma

F: femenino

ϕ: fase

fln: fuera de los límites normales

GABA: ácido gama-aminobutírico

GAGs: glicosaminoglicanos

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etansulfónico

H_2O_2: peróxido de hidrogeno

^3H: trítio

HTA: hipertensión arterial.

Hz: herzio

IGL: intergeniculado lateral

L:D: luz – oscuridad

M: masculino

mCGRs: células ganglionares de la retina que expresan melanopsina

min: minutos

NHS: suero normal de caballo

N.O: nervio óptico

NSQ: núcleos supraquiasmáticos

OD: ojo derecho

OI: ojo izquierdo

PAS: en referencia a las proteínas PER, ARNT y SIM de *Drosophila*

PBS: buffer conteniendo 100 mM de fosfato diácido de sodio y 100 mM de NaCl pH 7,4

PBS-T: 0,4% Triton X-100 en PBS 0,01 M

PER: del inglés *period*

PF: pseudofaquia

PGs: prostaglandinas

PGE2: prostaglandina E2

PGF2α: prostaglandina F2α

PHG: prueba del hemicampo para glaucoma

PIO: presión intraocular

PKC: proteína quinasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVT: paraventricular del tálamo

QO: quiasma óptico

rd/rd: del inglés *rodless/rodless*

Rev-erbα: NR1D1, del inglés *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*

RIA: radioinmunoanálisis

Ror: del inglés *Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor*

RP: reflejo pupilar

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio

s: segundos

SE: segmentos externos

sem: semanas

SIM: del inglés *Single Minded*

S/P: sin particularidades

τ: período

TRH : tracto retinohipotalámico

VEPs: Potenciales visuales evocados

VGH: vía geniculo-hipotalámica

1. El ojo

En mamíferos, el ojo es el único órgano especializado en el procesamiento de la información visual. La córnea y el cristalino concentran la luz y enfocan la imagen sobre la retina que descifra y codifica los diferentes elementos que componen la imagen (intensidad de luz, color, forma y movimiento). De esta forma, la retina constituye la primera estación de relevo del procesamiento de la información fótica. Esta información se transmite en forma de impulsos nerviosos por fibras nerviosas que se originan en la retina y que constituyen los nervios ópticos. Los nervios ópticos se entrecruzan parcial o totalmente (dependiendo de la especie) en el quiasma óptico y se proyectan a través del tracto óptico a centros visuales del cerebro, que tras diversas etapas de procesamiento, darán origen a la imagen visual consciente. Otros centros del encéfalo reciben información fótica proveniente de la retina y la utilizan para realizar tareas reflejas como la adaptación del tamaño de la pupila a las condiciones de iluminación ambiental y la dirección de los ojos hacia blancos de interés. Asimismo, esta información llega a centros no visuales especializados en la regulación del comportamiento asociado a los ciclos día/noche.

La pared del globo ocular está constituida por tres capas, que de afuera hacia adentro son: 1) la túnica externa-fibrosa o esclerocorneal: formada por la esclera, el limbo esclerocorneal y la córnea; 2) la túnica media-vascular, úvea o tracto uveal: formada por la coroides, el tejido conectivo y músculos del cuerpo ciliar y el tejido conectivo y músculos del iris; y 3) la túnica interna-nerviosa o retina: formada por la porción de la retina fotosensible y el epitelio pigmentario, la porción de la retina no fotosensible y el epitelio pigmentario, el epitelio del cuerpo ciliar y el epitelio del iris (Figura 1). El interior del ojo está ocupado por una materia transparente y de consistencia gelatinosa, denominada humor vítreo.

La túnica externa es una capa gruesa, fibrosa y resistente que protege las delicadas estructuras internas del ojo, y junto con la presión del humor acuoso contribuye a mantener la forma y

turgencia del globo ocular. En la mayor parte del globo ocular es opaca y se denomina esclera, donde se insertan los músculos que mueven el ojo. En la salida del nervio óptico, la esclera se reduce a una membrana fenestrada, la lámina cribosa. En su parte anterior, se diferencia en una estructura transparente denominada córnea. La córnea, al igual que la esclera, está esencialmente formada por colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) y agua, pero se diferencia de ella en su porcentaje de hidratación, que es menor que en la esclera, y en la disposición ordenada de fibras de colágeno (disposición hexagonal), que permiten disminuir la dispersión de la luz. De este modo, la córnea no sólo cumple una función de protección sino que además, permite la entrada de luz al ojo con escasa distorsión. La zona de transición entre la córnea y la esclera se denomina limbo esclerocorneal.

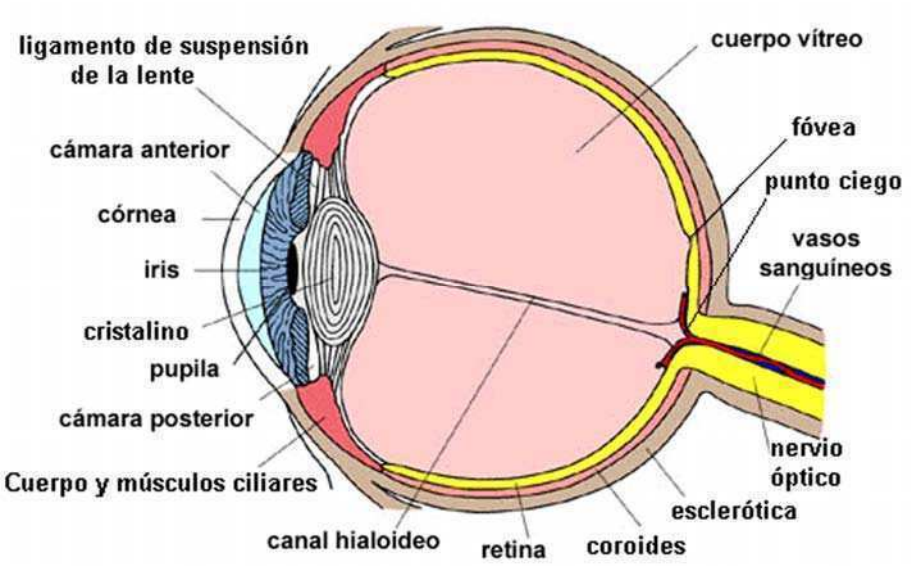

Figura 1. Representación esquemática de las principales estructuras oculares.

La úvea, una membrana vascular localizada entre la esclera y la retina, es una estructura frágil y pigmentada, formada principalmente por vasos y con alto contenido de melanina. Es la responsable de la nutrición y el mantenimiento de la retina y la esclera y de la producción de humor acuoso, que nutre la córnea y el cristalino, ambos avasculares (revisado por Kanski, 2005). Posee tres regiones diferentes: 1) la coroides, porción más vascularizada de la úvea,

situada por fuera de la retina; 2) el cuerpo ciliar, un engrosamiento que se extiende desde la periferia del iris hasta el comienzo de la retina, justo por detrás de la unión esclerocorneal, responsable de la producción de humor acuoso y de la suspensión del cristalino; y 3) el iris, que se ubica por encima de la superficie anterior del cristalino y que contiene los músculos dilatador y constrictor y varía en su color de acuerdo al contenido de melanina. En el centro, el iris define un espacio circular llamado pupila, que regula la entrada de luz al ojo, como el diafragma de una cámara fotográfica (Figura 1).

La retina es la capa más externa y es la porción del ojo sensible a la luz. Se extiende superficialmente sobre la coroides hasta la *ora serrata*, donde presenta un borde festoneado; luego se extiende como una delgada prolongación formando las porciones ciliar e irídea de la retina. La retina se encuentra firmemente unida en la papila óptica, donde se continúa con el nervio, y en la *ora serrata*, donde se une a la coroides. Las complejas redes nerviosas que codifican la información visual envían impulsos al cerebro a través del nervio óptico.

En el tercio anterior del ojo y suspendido por los músculos ciliares se encuentra el cristalino, una lente biconvexa y elástica. Su curvatura aumenta o disminuye por medio de las contracciones de estos músculos. El aumento o disminución de su curvatura es lo que permite acomodar la visión a diferentes distancias. La cara posterior del cristalino divide al ojo en un segmento anterior que lo contiene y que contiene el humor acuoso, y un segmento posterior, formado por una matriz extracelular transparente y gelatinosa, denominada humor vítreo o cuerpo vítreo. La córnea y el cristalino son los medios refractivos del ojo que permiten que la luz incida en la retina.

1.1. Cámara anterior y humor acuoso

Una correcta función visual requiere, al menos, de dos requisitos esenciales: que el globo ocular mantenga una forma constante, y que exista un trayecto transparente y sin alteraciones

desde la superficie corneal hasta la retina. Como se mencionó anteriormente, no existe una perfusión vascular directa de la córnea y el cristalino, sino que la circulación normal del humor acuoso, a través de las cámaras anterior y posterior, es responsable de la forma del globo ocular, de la claridad óptica y del metabolismo corneal y lenticular.

La cámara anterior es un área delimitada en forma anterior por la superficie posterior de la córnea, en su parte posterior por la superficie anterior del iris, y a nivel pupilar por la cara anterior del cristalino (Figura 2). En la periferia, la unión de la córnea con el iris determina un ángulo denominado seno-camerular, que contiene el trabeculado y se relaciona estrechamente con la raíz del iris y el cuerpo ciliar. Los tipos celulares que ocupan este espacio incluyen el endotelio trabecular y corneal, así como melanocitos y fibroblastos de la capa anterior del iris y del cuerpo ciliar. La cámara anterior contiene el humor acuoso, un líquido cristalino que en humanos tiene una densidad de 1,0034 a 1,0036 mg/ml, un índice de refracción de 1,3336 y un volumen de 0,25 ml. Su composición varía desde su formación en los procesos ciliares hasta su filtrado por el trabeculado. La composición del humor acuoso contiene una baja concentración de proteínas, altos niveles de ascorbato y difiere del plasma por la presencia de una barrera mecánica (Kolker y col., 1981; Sears, 1985), epitelial/endotelial (barrera sangre-humor acuoso) y por el transporte activo de varias sustancias orgánicas e inorgánicas desde el epitelio ciliar (revisado por Sampaolesi, 1991).

Producción y circulación del humor acuoso

El humor acuoso se produce en el cuerpo ciliar. El ajustado balance entre la producción y la eliminación de este fluido es responsable de mantener la forma del ojo y la presión intraocular (PIO). La formación de humor acuoso depende de la combinación entre una fuerza hidrostática y un gradiente de presión osmótica generado por el epitelio ciliar. Este último provoca la difusión de agua a través de un gradiente de concentración, debido a un

transporte activo de electrolitos y moléculas pequeñas a través de dos capas de epitelio (pigmentada y no pigmentada).

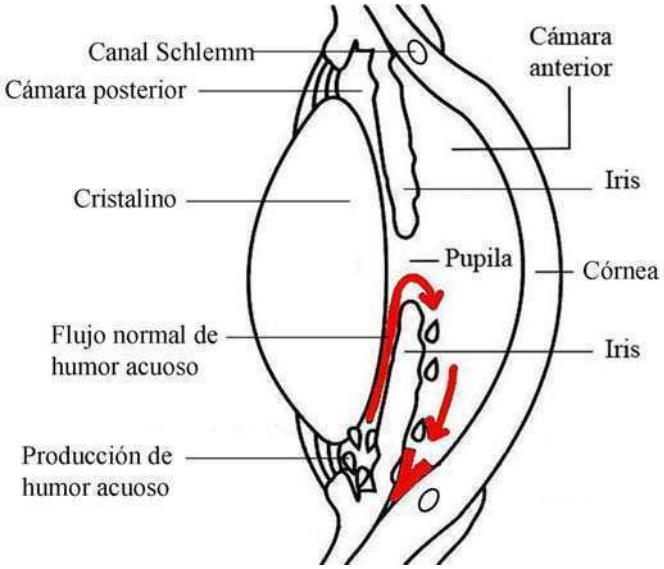

Figura 2. Representación esquemática del segmento anterior del ojo y de la circulación del humor acuoso.

El transporte activo se produce en las células no pigmentadas y el gradiente generado se mantiene debido a los complejos de unión que existen entre las células (*zónula occludens*) que restringen el pasaje de sustancias y forman una barrera sangre-humor acuoso (Vegge, 1971; Smith y Rudt, 1973; Raviola, 1974; 1977. La formación de humor acuoso ocurre por tres mecanismos: difusión, ultrafiltración y secreción activa. De estos tres mecanismos, la secreción activa es la responsable en mayor medida de la composición química y el volumen del humor acuoso (Macknight y col., 2000). La producción de humor acuoso en ratas es aproximadamente 0,350 μl/min y su tasa de recambio es de 2,23 % por minuto (Mermoud y col., 1996), y en humanos, es cercano a 2,5 μl/min, y alrededor del 1 % de este fluido es reemplazado por minuto (Stamper, 1992).

Diversos mecanismos colinérgicos y adrenérgicos desempeñan un papel relevante en la formación y drenaje de humor acuoso, tanto en la fisiología normal como en la terapia del glaucoma. El estímulo parasimpático, además de contraer la pupila (miosis), contrae el

músculo ciliar, que tracciona el trabeculado y aumenta la salida de humor acuoso, disminuyendo la PIO. A nivel simpático, el efecto es paradojal. El uso de algunos agonistas adrenérgicos aumenta la salida de humor acuoso actuando sobre el trabeculado; sin embargo el uso de β-bloqueantes tópicos también disminuye la PIO, reduciendo la formación de humor acuoso a nivel del cuerpo ciliar. Alteraciones moderadas de la presión sanguínea sistémica y del flujo sanguíneo del proceso ciliar no afectan significativamente la formación del humor acuoso.

La circulación del humor acuoso está determinada por el gradiente de presión entre la cámara posterior y la anterior y por las diferencias de temperatura entre el iris (mayor temperatura) y la córnea. El humor acuoso entra a la cámara posterior desde el proceso ciliar a través de un gradiente hidrostático y osmótico. Luego, fluye alrededor del cristalino, y a través de la pupila se dirige hacia la cámara anterior. Por último, abandona el ojo por flujo pasivo en el ángulo de la cámara anterior por dos vías: 1) la vía trabecular, a través de la cual primero ingresa al trabeculado, pasa al lumen del canal de Schlemm y luego a las venas epiesclerales, desde donde llega a la circulación venosa general y 2) la vía uveoescleral, a través de la cual desde la raíz del iris alcanza la malla escleral, luego pasa por la cara anterior del músculo ciliar y abandona el ojo a través de los vasos esclerales (Figura 3). En humanos, la vía trabecular drena el 80% del total del flujo de humor acuoso y el 20 % restante lo hace por la vía uveoescleral. En varias especies de monos se ha demostrado que la vía trabecular drena entre un 45 a un 70 % del total del humor acuoso (Bill, 1977). En ojos de pacientes de edades avanzadas y con tumores en el segmento posterior, se ha descripto un drenaje de entre el 5 al 20 % del total del fluido por vía uveoescleral (Bill y Phillips, 1971). Estudios más recientes demuestran que en ratones esta vía drena un porcentaje muy similar al de humanos (Aihara y col., 2003).

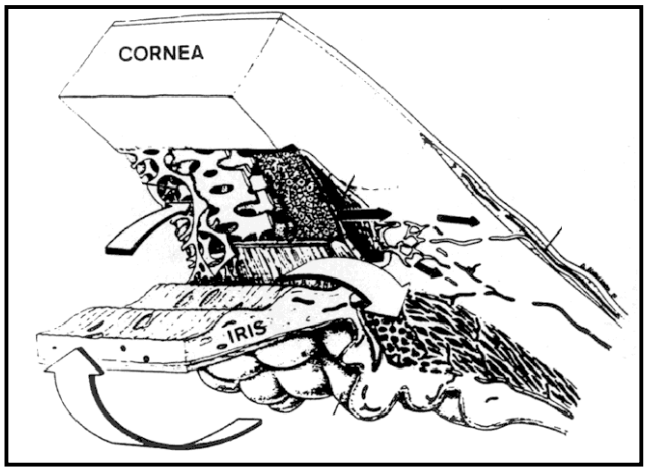

Figura 3. Representación esquemática de las vías de salida del humor acuoso

La red trabecular

Justo por encima del espolón escleral se encuentra el trabeculado. La porción anterior-uveal está formada por fibras que se continúan con la inserción del iris. La porción posterior esclerocorneal consiste en un empaquetado de fibras densas que se extienden desde la córnea hasta el espolón escleral. Esta estructura está constituida por una red entrelazada de finos haces de tejido conectivo con espacios intermedios de hasta 70 micrones. Las trabéculas están formadas por un corazón de colágeno y fibras elásticas, rodeadas por más fibras elásticas y una zona cortical, que consiste en colágeno parcialmente polimerizado y la membrana basal de las células endoteliales trabeculares más externas.

El canal de Schlemm se localiza en la parte inferior del trabeculado. Las células endoteliales en esta capa están íntimamente asociadas entre sí y a la membrana basal mediante complejos de unión. Estas células secretan el material de la membrana basal, precursores de colágeno (prolina e hidroxiprolina), fibras elásticas y glicosaminoglicanos (GAGs). Las células endoteliales del trabeculado tienen actividad fagocítica y la capacidad de migrar a través de los haces trabeculares (Rohen y Van der Zypen, 1968). Por lo tanto, la función del endotelio no es sólo mantener la integridad estructural de las trabéculas, sino también contribuye a

mantener la función de filtración del área, especialmente cuando concentraciones anormales de alguna sustancia impiden la salida del humor acuoso.

Como ya se mencionó, la principal vía de salida del humor acuoso es el trabeculado que está ubicado en el ángulo iridocorneal. La apariencia clínica de esta estructura permite inferir la facilidad de salida del humor acuoso. Los ángulos cerrados o estrechos y aquellos con depósitos patológicos tendrán una disminución en el drenaje, con el consiguiente aumento de la PIO.

Evidencias anátomo-fisiológicas indican que el sitio primario de resistencia al flujo acuoso reside en la red trabecular, la porción profunda de la red esclerocorneal y la membrana basal yuxtacanalicular cercana al canal de Schlemm (Tamm y col., 2004). Una intensa tinción histoquímica en varias capas del trabeculado humano indica la presencia de cantidades sustanciales de ácido hialurónico (AH) y condroitín sulfato (CS) en las vías de salida del humor acuoso y el análisis cuantitativo demuestra que el AH y el CS son los GAGs más abundante en el trabeculado humano (Acott y col., 1985; Lerner y col., 1997). Se ha descripto que la hipertensión ocular en ratas de laboratorio inducida por la administración de esclerosantes suaves se correlaciona con una deposición anormal de componentes de la matriz extracelular a nivel de la cabeza del nervio óptico en forma análoga a lo observado en ojos glaucomatosos humanos y de primates no humanos (Morrison y col., 1990).

1.2. La retina

La retina codifica el mundo visual, transformando los estímulos luminosos en impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. En la corteza, las señales son interpretadas y configuran la percepción visual: una sensación subjetiva de la forma, el color, la profundidad, el movimiento de los objetos y el espacio que nos rodea. La retina es una lámina fina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo, que constituye una prolongación del sistema

nervioso central.

La retina es un tejido constituido por varias capas que contiene diferentes tipos celulares. La retina de mamíferos está constituida por seis tipos celulares principales (Dowling, 1979), que se conectan a través de sinapsis: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares (ON u OFF subdivididas en 3 a 5 subtipos cada una), ganglionares (15 subtipos), horizontales (2 subtipos), amácrinas (29 subtipos) y las células de Müller, el principal tipo de célula glial de la retina (Figura 4). Las principales capas de la retina desde la más externa a la más interna del ojo son: 1) el epitelio pigmentario (EP), 2) la capa de segmentos externos (SE) de los fotorreceptores, 3) la capa nuclear externa (CNE), que contiene los cuerpos celulares de los conos y los bastones, 4) la capa plexiforme externa (CPE), donde hacen sinapsis los axones de los fotorreceptores con las dendritas de las células horizontales y bipolares, 5) la capa nuclear interna (CNI), que contiene los núcleos de las células horizontales, amácrinas y bipolares, 6) la capa plexiforme interna (CPI), donde hacen sinapsis las células bipolares y amácrinas con las células ganglionares, y finalmente, 7) la capa de células ganglionares (CCG), que contiene células ganglionares y amácrinas desplazadas (Figura 4).

El epitelio pigmentario (EP) está compuesto por una capa de células diferenciadas que contienen un pigmento negro llamado melanina. La melanina absorbe la luz que no es capturada por la retina, evitando que ésta se refleje en la parte posterior del ojo (Hubel, 1988) y vuelva a la retina, lo que degradaría la imagen visual.

Los fotorreceptores de los vertebrados son células únicas en forma y función. Existen dos tipos de células fotorreceptoras: los conos y los bastones. Sus segmentos externos son la porción sensible a la luz, y su morfología le da nombre a cada uno de ellos. Contienen el pigmento visual así como los demás componentes de la cascada de fototransducción en la que participan diversos mensajeros, enzimas y canales iónicos.

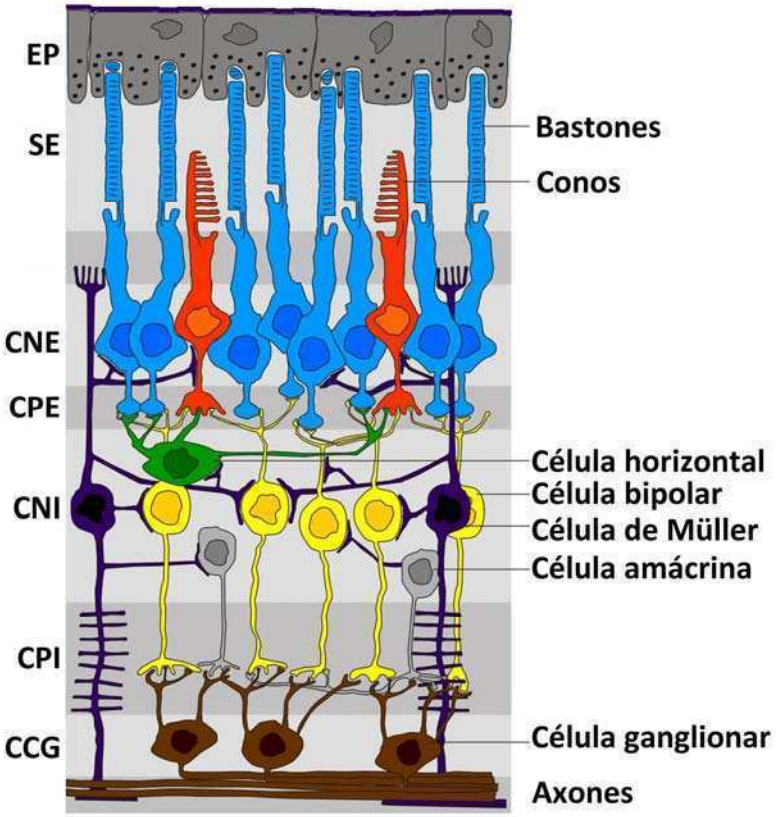

Figura 4. Representación esquemática de la retina con la disposición de los distintos tipos celulares en las distintas capas. EP: el epitelio pigmentario, SE: capa de segmentos externos de los fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares.

El segmento externo de los bastones está formado por discos membranosos apilados en forma ordenada. Estos discos son estructuras saculares donde las paredes, de doble membrana, quedan separadas por el espacio intradiscal. En las membranas se encuentra el pigmento visual: rodopsina en los bastones y conopsinas en los conos. En los conos, el segmento externo está constituido por numerosos pliegues de membrana apilados, que se abren al medio extracelular. En ambos tipos de fotorreceptores, los segmentos externos se encuentran unidos a los segmentos internos a través de un tallo estrecho o cilio. El cuerpo celular de los fotorreceptores contiene al núcleo. En la mayoría de las especies de mamíferos, los bastones son aproximadamente 20 veces más numerosos que los conos (Masland, 2001a), aunque la

cantidad de ambos tipos celulares varía marcadamente sobre la superficie de la retina. En el centro de la retina humana y de primates (área denominada fóvea), donde la agudeza visual es máxima, se observan sólo conos (Figura 5).

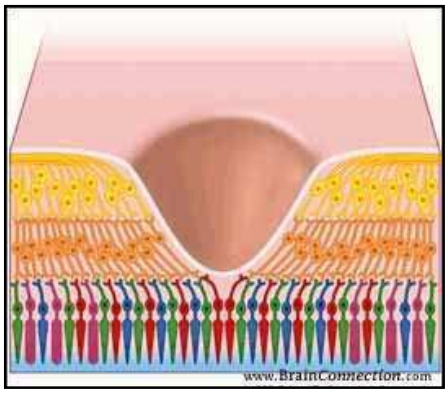

Figura 5. Representación esquemática de la fóvea

Los fotorreceptores se encuentran en la capa de la retina más cercana al fondo del globo ocular y más alejada de la córnea y de la entrada de luz. Por consiguiente, ésta debe atravesar las otras capas antes de alcanzar la capa de fotorreceptores, salvo en la fóvea, donde la luz incide directamente. Por lo tanto, la posición de la retina se encuentra "invertida" respecto a la entrada de la luz (Figura 6). Las células bipolares reciben *input* directo de los fotorreceptores y hacen sinapsis con las CGRs. Son más numerosas que las células horizontales y amácrinas, y dominan la capa media de la retina. Existen distintos tipos de células bipolares que pueden estar conectadas exclusivamente a bastones o a conos. Las células horizontales conectan los fotorreceptores con las bipolares, y las células amácrinas establecen conexiones sinápticas, paralelas a la superficie retiniana, entre neuronas bipolares y ganglionares. Por último, las células ganglionares se ubican en la capa retiniana más cercana al centro del globo ocular, sus axones forman el nervio óptico y proyectan fuera del ojo, a través del disco óptico o papila. En base a las conexiones anatómicas y funcionales entre los distintos tipos celulares retinianos, se considera que la información fluye a través de

la retina siguiendo dos vías: un camino directo, desde los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las ganglionares; y uno indirecto, en el que las células horizontales se interponen entre los fotorreceptores y las células bipolares, y las amácrinas entre las bipolares y las ganglionares. La vía directa de transmisión de información es altamente específica; la vía indirecta, en cambio, es más difusa. Este plan general de conexiones retinianas, fundamentalmente a nivel de la vía directa, varía dramáticamente entre la fóvea y las zonas periféricas. En la fóvea o las zonas adyacentes, un fotorreceptor (cono) se conecta con una única célula bipolar y ésta a su vez con una única célula ganglionar. Esta relación entre fotorreceptores, células bipolares y ganglionares, es cada vez más convergente hacia la periferia. La ventaja de este sistema es la alta densidad de muestreo que permite una gran resolución espacial (Masland, 2001b; revisado por Kandel, 2001).

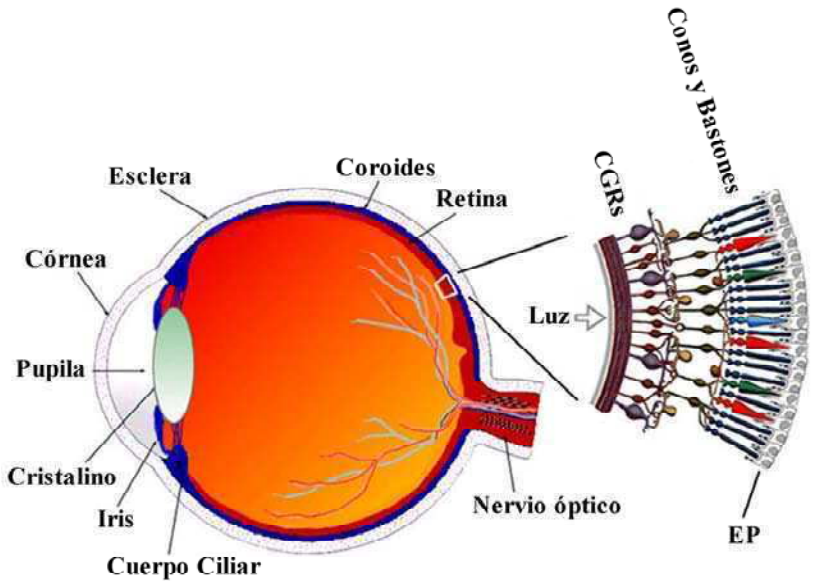

Figura 6. Esquema del ojo de vertebrados con una porción de retina ampliada donde se aprecia su disposición y organización. CGRs: células ganglionares de la retina, EP: epitelio pigmentario.

El principal neurotransmisor excitatorio de la retina, el glutamato, es el transmisor responsable de la vía directa de la información visual. El glutamato es liberado desde los fotorreceptores a células bipolares y horizontales y desde las células bipolares a ganglionares

y amácrinas. En oscuridad, el glutamato es liberado en forma tónica por los fotorreceptores a la brecha sináptica y su liberación se interrumpe con la exposición del fotorreceptor a luz. El glutamato induce la despolarización de las células bipolares OFF y la hiperpolarización de las bipolares ON. Estas células a su vez, liberan glutamato en las sinapsis con las células ganglionares. Un conjunto variado de señales liberadas por células horizontales y amácrinas, que incluyen al ácido γ-aminobutírico (GABA), la glicina y la dopamina, modulan esta vía directa.

2. Los ritmos circadianos

Un ritmo describe un conjunto de eventos que se suceden de una manera ordenada y periódica. Muchos fenómenos naturales son cíclicos, como la alternancia entre el día y la noche, el ciclo lunar, las estaciones del año, etc. Los ritmos biológicos son fenómenos universales que ocurren en todos los niveles de organización: desde el nivel molecular hasta niveles sociales, pasando por ritmos a nivel del organismo *in toto*. Una enorme variedad de funciones fisiológicas, bioquímicas y comportamentales son periódicas. Los ritmos biológicos también ocurren en todos los organismos estudiados, ya sean procariotas o eucariotas.

La ritmicidad con que ocurren ciertos eventos en la naturaleza permite a los organismos anticiparse a ellos, adaptarse adecuadamente a su nicho ecológico y por consiguiente, lograr un máximo aprovechamiento de los recursos. La migración de aves o el cambio de pelaje en ciertos animales son algunos ejemplos que demuestran la naturaleza predictiva que permite a los individuos anticiparse a los cambios ambientales. También existe predicción en eventos diarios: nuestro organismo comienza a ponerse en alerta minutos (o incluso horas) antes de que suene el despertador, y el gallo anuncia el comienzo del día sin necesidad de conocer por el servicio meteorológico la hora en la que sale el sol. La ritmicidad parece ser tan importante

en la coordinación con el medio ambiente, como en la regulación y coordinación interna de los procesos metabólicos.

Para caracterizar un ritmo se pueden definir una serie de parámetros: τ (período), A (amplitud) y ϕ (fase). El período es el intervalo de tiempo entre dos sucesos idénticos, o sea, la duración de un ciclo; la amplitud es la distancia entre el valor medio de la variable y el máximo valor que alcanza dicha variable a lo largo del período; y por último, la fase indica en qué momento del ciclo temporal está situada la variable en estudio (Figura 7). En general, la fase está referida a otra función periódica que puede ser externa (hora del día, etc.) o bien interna (otro ritmo biológico).

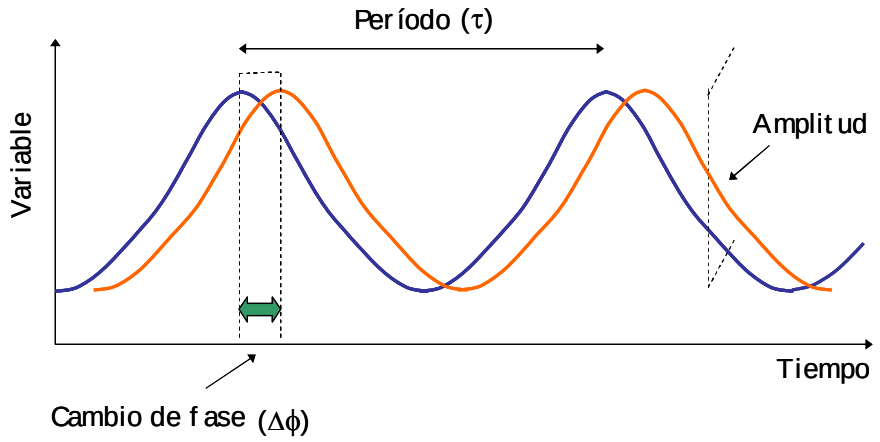

Figura 7. Esquema de una variación rítmica**.** Se indican los tres parámetros más relevantes de toda oscilación: el período (o su inversa, la frecuencia), la amplitud y la fase.

Los ritmos biológicos abarcan un amplio rango de períodos, y pueden clasificarse de acuerdo a ellos (Tabla I). La mayoría de los procesos conductuales y fisiológicos (temperatura, actividad, sueño-vigilia, secreción de hormonas, etc.) oscila con un período cercano a las 24 horas. Estos ritmos se denominan circadianos (del latín *circa*, cerca de y *dies*, día). Por ejemplo, en los humanos existe una diferencia diaria de más de 1ºC en la temperatura corporal entre el punto más alto (que ocurre a la tarde) y el más bajo (que ocurre durante la madrugada). Se denominan ritmos ultradianos a aquellos que tienen un período menor a 24

horas, como por ejemplo el ritmo cardíaco, cuyo período es de aproximadamente 1 segundo. Los ritmos con período mayor a 24 horas se llaman infradianos, y ejemplo de ellos son el ciclo menstrual y el ciclo de hibernación. Los ritmos circadianos son los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, y se encuentran en todos los niveles de organización de un individuo.

Tabla I. Frecuencia de los ritmos biológicos.

TIPO DE RITMO	PERIODO	EJEMPLOS
ULTRADIANO	0,1 seg.	Electroencefalograma
	1 seg.	Ritmo cardíaco
	6 seg.	Ritmo respiratorio
	60 min.	Secreciones pulsátiles de hormonales
	90 min.	Alternancia de estados de sueño
CIRCADIANO	24 horas	Actividad – Reposo Temperatura corporal
INFRADIANO	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

3. <u>El sistema circadiano.</u>

En ausencia de cambios ambientales definidos, es decir en condiciones constantes en las que no hay indicios externos del paso del tiempo, se dice que el organismo está en libre curso o *free running*. Bajo estas condiciones, el organismo expresa ritmos circadianos con un período cercano, pero no exactamente igual, al experimentado antes del aislamiento. Esto indica la existencia de un reloj endógeno, denominado reloj circadiano, cuya periodicidad es de aproximadamente 24 horas. Los animales diurnos como el hombre tienen un período circadiano de más de 24 horas, mientras que ciertos animales nocturnos como el ratón

presentan generalmente un período circadiano de menos de 24 horas (Pittendrigh, 1981 a y b; Aschoff, 1960).

El hecho de que los seres humanos tengamos un reloj interno cuyo período es de aproximadamente 25 horas y que los ritmos internos y conductuales oscilen con un período de 24 horas exactas se debe a un mecanismo que sincroniza nuestro tiempo interno con el tiempo externo. De este modo, los factores ambientales actúan como sincronizadores (usualmente llamados *Zeitgebers* por la palabra alemana que significa "dador de tiempo") forzando la periodicidad del reloj circadiano a adoptar la de 24 horas del ambiente. Desde el punto de vista conductual, el aspecto más importante del tiempo local es la alternancia del ciclo luz-oscuridad. Es por ello que el sincronizador ambiental más poderoso, tanto para los animales como para las plantas, es el ciclo de luz-oscuridad, al que se suman, en los mamíferos superiores, distintos factores sociales (Aschoff y col., 1975). Las principales propiedades de los ritmos circadianos fueron originalmente definidas por Colin Pittendrigh en 1960. Algunas de ellas son: 1) los ritmos circadianos son ubicuos, 2) los ritmos circadianos son endógenos, 3) los ritmos circadianos son oscilaciones auto-sostenidas, 4) los ritmos circadianos son innatos, 5) los ritmos circadianos se encuentran en todos los niveles de organización de un organismo, 6) el período endógeno (τ) es diferente en distintas especies, 7) τ es prácticamente independiente de la temperatura, es decir que compensa sus variaciones ($Q_{10} \cong 1$), y 8) los ritmos circadianos se sincronizan por periodicidades ambientales de período T, siendo la más importante el ciclo luz-oscuridad (Pittendrigh, 1960).

El sistema circadiano se caracteriza por tres componentes principales (Figura 8): 1) una vía de entrada del *Zeitgeber* o agente sincronizador (componente exógeno); 2) un oscilador, formado por estructuras marcapasos que generan la señal circadiana (reloj biológico, componente endógeno); y 3) vías eferentes desde los marcapasos a los sistemas efectores (ritmos biológicos), así como las relaciones entre ellos: la sincronización entre el componente

exógeno y el endógeno y el acoplamiento entre el reloj y los ritmos (Moore, 1983; Moore y Card, 1985; Meijer y Rietveld, 1989; Morin, 1994; Morin y Allen, 2006).

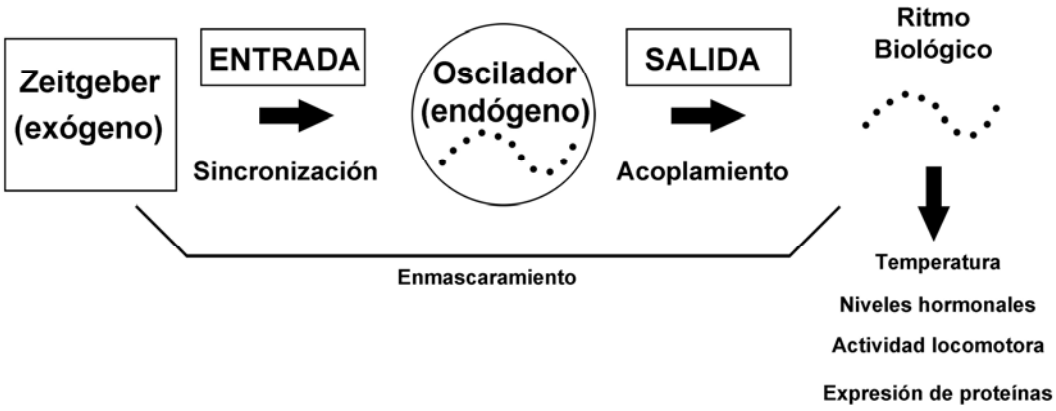

Figura 8. Componentes principales del sistema circadiano.

Sin embargo, debe destacarse que este esquema lineal resulta una simplificación de lo que ocurre en la naturaleza, dado que los diversos componentes del sistema interactúan entre sí en ambas direcciones. Los ritmos son capaces de "retroalimentar" la actividad del reloj, un fenómeno que probablemente permite "poner en hora" más finamente al oscilador. El hecho de que existan osciladores autónomos a nivel de la entrada sensorial (por ejemplo, en la retina) y que éstos interactúen con el oscilador central ofrece un nivel adicional de complejidad en la regulación del sistema circadiano. Como ya se mencionó, el principal *Zeitgeber* (o agente sincronizador) en mamíferos es el ciclo luz-oscuridad. Existe, sin embargo, la posibilidad de que bajo determinadas condiciones, el *Zeitgeber* no sincronice al reloj sino que afecte directamente a la salida del mismo (los ritmos), fenómeno conocido como enmascaramiento (Mrosovsky, 1999). Por ejemplo, el encendido de las luces durante la noche afecta directamente la actividad locomotora de animales nocturnos, a veces sin llegar a sincronizar el reloj. El enmascaramiento complementa al control del reloj como una forma de "ayudar" a los animales a especializarse ya sea en un nicho diurno o nocturno (Aschoff y Von Goetz, 1988).

Si bien el reloj puede ser sincronizado por un gran número de estímulos como la temperatura, los hábitos sociales, la conducta reproductiva, la actividad, los olores, etc, la luz es percibida por el sistema circadiano a través de un sistema fotorreceptor especializado. Este sistema fue originalmente descripto en vertebrados no mamíferos, como peces, anfibios, reptiles y aves, en los que existen células fotorreceptoras circadianas localizadas en distintos lugares del cerebro, que responden directamente a la luz que penetra a través del cráneo (Menaker, 2003). En mamíferos, los fotorreceptores circadianos pertenecen a la familia de las opsinas, y se encuentran localizados en un grupo de células ganglionares en la retina. Como se mencionará en detalle más adelante, la principal opsina involucrada en la sincronización fótica es la melanopsina. Tanto las células ganglionares que contienen melanopsina como los fotorreceptores tradicionales (conos y bastones) contribuyen a la sincronización fótica (Berson y col., 2002; Hattar y col., 2003; Panda y col., 2003). La luz se transmite desde la retina hasta el reloj central a través de una vía monosináptica específica llamada tracto retinohipotalámico (TRH).

El componente principal del reloj biológico en mamíferos son los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), dos grupos de neuronas que se encuentran localizadas en la base del tercer ventrículo, sobre el quiasma óptico, en la parte anterior del hipotálamo (Figura 9). Los NSQ están compuestos por una población heterogénea de células, incluyendo múltiples clases de neuronas peptidérgicas y astrocitos (Abrahamson y Moore, 2001). Estos núcleos poseen alrededor de 20.000 neuronas y 8.000 astrocitos en roedores, compactados en un volumen de aproximadamente 1 mm^3 (Guldner, 1983; Klein y col., 1991). Aun en condiciones aisladas, los NSQ continúan activos en forma rítmica (Newman y Hospod, 1986; Colwell, 2000). La lesión o ablación de los NSQ provoca la desaparición de los ritmos circadianos de secreción hormonal, actividad locomotora y bebida, entre otros. De hecho, transplantes de tejido hipotalámico conteniendo NSQ en animales con sus NSQ lesionados, restauran los ritmos

circadianos de estos últimos, induciendo la ritmicidad del donante en el receptor (Ralph y Lehman, 1991).

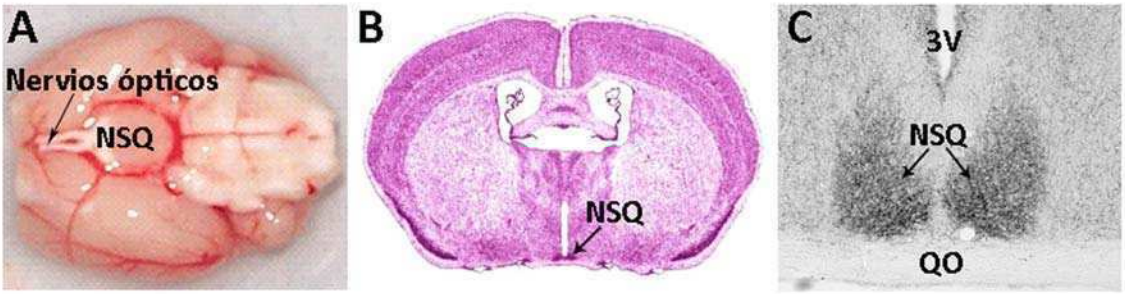

Figura 9. Localización de los NSQ. (A) Vista ventral de un cerebro de hámster. Los nervios ópticos se cruzan formando una región llamada quiasma óptico (QO). Los NSQ se encuentran ubicados en el hipotálamo, justo encima del quiasma óptico. (B) Sección coronal de un cerebro de hámster conteniendo a los NSQ. (C) Tinción inmunocitoquímica para neuropéptido Y (NPY) en hámster, se observa marca positiva en los NSQ. Tomado de Muscat y Morin, 2006. Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo, QO: quiasma óptico; NSQ: núcleos supraquiasmáticos.

Los NSQ se comunican con el resto del organismo a través de proyecciones nerviosas y secreciones humorales, tanto para las vías de entrada como para las de salida. Las principales aferencias provienen de la retina. La información desde la retina sigue dos vías, una directa a través del TRH y una vía colateral que pasa por la hojuela intergeniculada lateral del tálamo (IGL) y luego inerva la zona ventrolateral de los NSQ. A esta segunda vía se la conoce como vía genículo-hipotalámica (VGH). Además, existen aferencias desde el rafe, tanto del núcleo dorsal como del medial y del núcleo paraventricular del tálamo (PVT) (Krout y col., 2002; Moga y Moore, 1997). Muchos de los núcleos hipotalámicos inervados por los NSQ establecen en realidad circuitos bidireccionales, inervando ellos mismos a los NSQ en forma recíproca (Krout y col., 2002). De todas las vías aferentes, la mejor caracterizada es la del TRH. Esta vía se origina en CGRs que contienen opsinas, y capacidad fotorreceptora intrínseca (Beaulé y col., 2003; Berson y col., 2002; Hattar y col., 2002; Morin y col., 2003; Provencio y col., 2002).

3.1 Mecanismos moleculares de oscilación del reloj.

Con el avance de la biología molecular se ha logrado obtener gran cantidad de información respecto a las bases moleculares del reloj circadiano. El reloj molecular está compuesto por tres sistemas de expresión genética acoplados: 1) un conjunto de elementos positivos, 2) un conjunto de elementos negativos y 3) un sistema de genes controlados por el reloj que participan en la regulación de los ritmos celulares. Los elementos positivos y negativos están formados por los llamados "genes reloj" y sus productos proteicos generan un patrón de oscilación mediante su expresión cíclica. Esta oscilación se encuentra fuertemente regulada, tanto a nivel transcripcional como traduccional y post-traduccional (Dunlap, 1999; Okamura y col., 2002). El sistema básico de oscilación consta de un ciclo de retroalimentación negativa en el que los componentes positivos promueven la síntesis de los componentes negativos que, al acumularse, reprimen su propia síntesis. Los componentes positivos principales son dos proteínas de la familia PAS (en referencia a las proteínas PER, ARNT y SIM de *Drosophila*): CLOCK (del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput)* y BMAL1 (del inglés *Brain and Muscle ARNT-Like protein 1*). Los miembros de la familia PAS poseen un dominio b-HLH (del inglés *basic-Helix-Loop-Helix*) y la capacidad de activación transcripcional. PAS es un dominio de dimerización que permite la unión a otras proteínas con dominio PAS y el dominio b-HLH permite la unión al ADN. La presencia del dominio PAS es una característica muy conservada en los genes reloj, desde hongos a mamíferos, y su combinación con el dominio b-HLH es frecuente en estos factores de transcripción, que incluyen a muchos de los componentes positivos de los osciladores circadianos (Reppert y Weaver, 1997). El heterodímero formado por CLOCK y BMAL1 se une a una región del ADN llamada *E-box* (cuya secuencia es CACGTG) y regula positivamente la transcripción génica (Muñoz y col., 2002). El gen *period* (*per*) fue el primer gen reloj aislado en *Drosophila* (Konopa y Benzer, 1971; Smith y Konopka, 1981; Bargiello y Young, 1984;

Zehring y col., 1984) y constituye uno de los elementos negativos. En mamíferos, existen tres genes *per*, denominados *per1*, *per2* y *per3*. Las proteínas PER1 y PER2; junto con los productos proteicos de los genes criptocromo (*Cry)*, CRY1 y CRY2, funcionan como elementos negativos del reloj. PER y CRY se unen formando heterodímeros que regulan negativamente su propia transcripción y la del complejo CLOCK-BMAL1 (Yoshimura y col., 2000; Iuvone y col., 2005; Kohsaka y Bass, 2007; Takahashi y col., 2001, 2008; Tosini y col., 2008; Figura 10). Durante este ciclo de retroalimentación negativa, varias de las proteínas reloj sufren modificaciones post-transcripcionales, principalmente fosforilación y ubiquitinización (Lee y col., 2001; Miyazaki y col., 2001; 2004; Harms y col., 2004). La fosforilación de proteínas reloj fue caracterizada originalmente en *Drosophila*, donde la proteína DBT (del inglés *doubletime*) cataliza la fosforilación de PER y promueve su ubiquitinización y degradación (Cyran y col., 2005). El homólogo de DBT en mamíferos es la enzima caseína kinasa I epsilon (CKIε). Al igual que en *Drosophila*, la fosforilación de las proteínas PER (PER1 y PER2) por CKIε promueve su ubiquitinización y degradación a través del proteosoma. Sin embargo, si PER está unida a CRY formando un heterodímero, la fosforilación por CKIε conduce a la entrada y acumulación de PER-CRY en el núcleo (Knippschild y col., 2005; Figura 10). Más recientemente se ha descripto un nuevo componente del reloj molecular llamado *Rev-Erbα*, un receptor nuclear cuya transcripción es activada por el dímero CLOCK-BMAL1. A su vez, la proteína REV-ERB es capaz de reprimir la síntesis de *Bmal1* actuando sobre los elementos de respuesta a *Rev-Erb*/Ror (del inglés *Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*) presentes en el promotor de este gen (Preitner y col., 2002; Ueda y col., 2002). Esta interacción entre los ciclos de retroalimentación negativa y positiva a nivel de los NSQ hace que los componentes positivos se expresen en antifase con respecto a los componentes negativos, lo que se ve reflejado en un ritmo circadiano con máximos durante el día para *Cry, Per1, 2* y *3* y máximos durante la

noche para *Bmal1*, en tanto que en mamíferos, la expresión de *Clock* es constitutiva o presenta oscilaciones circadianas de muy baja amplitud.

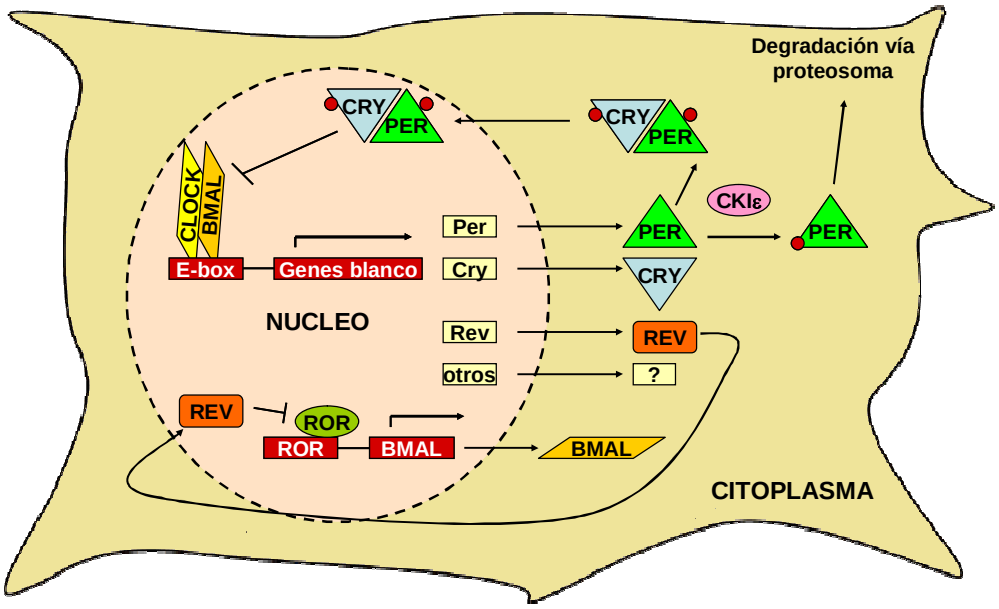

Figura 10. Esquema del mecanismo molecular de oscilación del reloj en mamíferos. Consiste principalmente en los elementos negativos PER (PER1 y PER2) y CRY (CRY1 y CRY2) que inhiben la transcripción de los llamados elementos positivos, CLOCK y BMAL. Estos últimos regulan a su vez, a través de su unión a las regiones E-box, la expresión tanto de genes circadianos como la de otros genes regulados por el reloj (llamados CCG, del inglés *Circadian Controlled Genes*). La expresión de BMAL es además regulada por REV-Erbα a través de ROR. Las proteínas PER son reguladas de manera post-traduccional a través de su fosforilación por CKIε. Modificado de Knippschild y col., 2005.

4. La retina como reloj circadiano autónomo

La transición entre la oscuridad y la luz es probablemente una de los acontecimientos más importantes en la vida cotidiana de un organismo. La intensidad luminosa a mediodía de un día soleado difiere en hasta doce órdenes de magnitud respecto a la medianoche. La capacidad del sistema visual para medir contrastes sobre un *background* que cambia en este rango de intensidades, es el resultado de un conjunto complejo de mecanismos bioquímicos y neurofisiológicos. Muchos de estos cambios ocurren agudamente en respuesta a la iluminación ambiental; sin embargo se ha demostrado que algunas respuestas adaptativas retinianas son reguladas por osciladores circadianos endógenos. Estos osciladores actúan

como relojes que inducen cambios en el sistema visual en función de la hora del día, tomando ventaja de la predictibilidad de los cambios diarios en el ambiente fótico. Como ya se mencionó, midiendo el tiempo, más que la intensidad luminosa, un reloj puede inducir respuestas adaptativas con anticipación a los cambios en la iluminación ambiental que ocurren al atardecer o al anochecer. Es indudablemente ventajoso, por ejemplo, que la transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias para períodos de oscuridad se inicie durante la tarde, de manera tal que los niveles de esta proteína alcancen valores máximos durante la noche. De hecho, diversas funciones oculares (niveles de ARNm que codifican para los fotopigmentos de conos y bastones, niveles de PKC, fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, sensibilidad visual, entre otros (Tabla II) varían circadianamente, en algunos casos aún en condiciones de iluminación constante y aún luego de la lesión de los NSQ o la transección del nervio óptico (para una revisión ver Cahill y Besharse, 1995; Tosini y Fukuhara, 2002). En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que en la retina de hámster determinadas variables oscilan en respuesta al estímulo fótico (sistema nitrérgico, actividad de hemo-oxigenasa, niveles de GMPc) en tanto que otras, son regulados por osciladores circadianos (sistemas GABAérgico y dopaminérgico retinianos) (Jaliffa y col., 2000, 2001; Sáenz y col., 2002; Sacca y col., 2003). Por otra parte, evidencias obtenidas por nuestro y otros grupos parecen indicar que la síntesis de melatonina en la retina del hámster está regulada tanto por el ciclo de luz-oscuridad como por un reloj circadiano local (Faillace y col., 1994; Tosini y Menaker, 1996).

La primera demostración experimental respecto a la existencia de un reloj circadiano autónomo en la retina de vertebrados se obtuvo en *Xenopus leavis* (Besharse y Iuvone, 1983).Varios años más tarde, se demostró la presencia de un reloj circadiano en la retina de mamíferos (particularmente en el hámster), con la capacidad de regular la síntesis circadiana de melatonina aún en oscuridad constante y en condiciones aisladas (Tosini y Menaker,

1996).

Tabla II. Algunos ejemplos de ritmos circadianos retinianos

Funciones retinianas	Sensibilidad visual y respuestas electrorretinográficas (Bassi y Powers, 1987) Dominancia de bastones-conos (Manglapus y col., 1999)
Mecanismos de señales de transducción	Niveles de AMPc en fotorreceptores y células ganglionares (Garbarino-Pico y col., 2004) Ras, B-Raf, ERK, y vías de señales de pCREB en fotorreceptores (Ko y col., 2004) Afinidad de canales catiónicos por GMPc (Ko y col., 2001)
Mecanismos de transcripción	ARNm de Transducina (Brann y Cohen, 1987) ARNm de Iodopsina (Pierce y Besharse, 1985) ARNm de Melanopsina (Chaurasia y col., 2005) ARNm de Nocturnina (Green y Besharse, 1996)
Procesos estructurales	Formación de espínulas en la sinapsis cono-célula horizontal (Wagner y col., 1992) Movimiento retinomotor de los conos (Welsh y Osborne, 1937)
Funciones metabólicas y neuroquímicas	pH extracelular y metabolismo energético (Dmitriev y Mangel, 2001) Metabolismo de fosfolípidos en los fotorreceptores y células ganglionares (Guido y col., 2001) Biosíntesis de melatonina en los fotorreceptores (Tosini y Menaker, 1996) Actividad dopaminérgica (Jaliffa y col., 2000) y GABAérgica (Jaliffa y col., 2001)

Posteriormente, estos resultados se extendieron a otras especies como la rata y el ratón (Tosini y col., 1998). El hámster mutante *tau*, cuyo período de oscilación circadiana es significativamente más corto que el de animales normales (como resultado de una alteración en la CKIε (Lowrey y col., 2000), presenta también un período corto en cuanto a la secreción retiniana de melatonina (Tosini y Menaker, 1996) y al ritmo de fagocitosis de los discos del segmento externo de los fotorreceptores (Grace y col., 1996). Estos resultados constituyen una evidencia sólida en favor de que el oscilador retiniano exhibe mecanismos

moleculares similares a los del reloj central. En este sentido, se ha demostrado la expresión de genes reloj en la retina de diferentes especies de vertebrados. En la retina de rata se demostró que la expresión del ARNm de *Per1, Clock y Bmal1* es baja en los fotorreceptores y más abundante en la retina interna (Namihira y col., 1999 y 2001). En la retina de ratón, se han obtenido resultados contradictorios. Inicialmente, se describió la presencia y la colocalización de ARNm de *Per1, Clock y Bmal1* en los fotorreceptores y en la retina interna (Gekakis y col., 1998). Diversos trabajos han demostrado la presencia (Yujnovsky y col. 2006, Dinet y col., 2007a y b) o ausencia (Witkovsky y col., 2003; Storch y col., 2007) de expresión de transcriptos de *Per1* en los fotorreceptores. Sin embargo, Ruan y col. (2006) han demostrado la expresión coordinada de los seis genes reloj (*Per 1 y 2, Cry 1 y 2, Clock y Bmal1*) en células horizontales, bipolares, y amácrinas, con una proporción más baja en los conos y bastones y una mayor proporción en las neuronas amácrinas dopaminérgicas. Además, estos autores han demostrado la persistencia por más de 25 días de los ritmos de expresión de genes reloj en retinas de ratón aisladas, en los que se observa degeneración de los fotorreceptores (Ruan y col., 2006). Por el contrario, Tosini y col. (2007) demostraron la expresión de ritmos circadianos robustos de bioluminiscencia en la capa de fotorreceptores aislada a partir de retinas de ratas que expresan el gen reportero luciferasa asociado a *Per1* (*Per:luc*).

Una de las señales más paradigmáticas del sistema circadiano es la melatonina. Se han descripto ritmos circadianos en los niveles de melatonina (o de las enzimas involucradas en su síntesis) en la retina de diferentes especies de vertebrados incluyendo diversos roedores. En todos los casos analizados, se observó que tanto en la glándula pineal como en la retina, la síntesis de melatonina es alta durante la noche y baja durante el día (Pang y col., 1980; Yu y col., 1981; Lucas y Foster, 1997; Sakamoto y Ishida 1998a, 1998b; Pozdeyev y Lavrikova 2000; Fukuhara y col., 2001). Dado que los ritmos retinianos en diversas especies se han

asociado estrechamente con la capacidad de sintetizar melatonina y teniendo en cuenta el conjunto de evidencias que señalan a los fotorreceptores como el sitio más probable para este proceso biosintético (Niki y col., 1998), el conjunto de evidencias previas ha llevado a postular a este tipo celular como el sustrato anatómico más probable para la localización celular del reloj retiniano. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos demostrado por primera vez, la capacidad de las células ganglionares de la retina de pollo de sintetizar melatonina, aún en condiciones aisladas (Garbarino-Pico y col., 2004). Asimismo, como se detallará más adelante, se ha demostrado la expresión de un nuevo fotopigmento, la melanopsina, exclusivamente en un grupo de células ganglionares que proyectan a los NSQ (Berson y col., 2002). Este conjunto de evidencias parece indicar que las CGRs podrían tener la capacidad de oscilar en forma autónoma y responder a la luz en forma independiente de los fotorreceptores clásicos.

Si bien el mecanismo del procesado de la información luminosa involucrado en la formación de la imagen consciente ha sido claramente establecido, la información disponible respecto a fenómenos moleculares intrínsecos a la generación de ritmos biológicos locales, e incluso sobre los tipos celulares retinianos directamente involucrados, es notablemente escasa. En todo caso, la información retiniana ambiental en mamíferos es crítica para la sincronización y los cambios de fase de los ritmos circadianos generados por el marcapasos hipotalámico. Por lo tanto, el estudio de la actividad rítmica retiniana, ya sea auto-sostenida o como eferencia de la información procedente de los NSQ es esencial para la comprensión de la génesis y fisiología de la actividad circadiana.

4.1 Nuevos fotorreceptores retinianos

Aunque la primera definición de "ojo" en el Diccionario de La Real Academia Española es simplemente "el órgano de la visión" (en el hombre y los animales), en la última década se ha

descripto una nueva función para el ojo: incluso en ausencia de visión formal, el ojo puede actuar como un sensor de luz ambiental, similar al diafragma de una cámara fotográfica. Diversas funciones reguladas por la luz, incluyendo la sincronización de los relojes circadianos, la supresión de actividad por luz, la supresión fótica de la síntesis pineal de melatonina y la respuesta de la pupila a la luz se mantienen en animales que son ciegos como resultado de mutaciones que causan una degeneración completa o casi completa de los fotorreceptores clásicos, los conos y bastones. En humanos, se han descripto casos de sujetos que carecen de percepción consciente de la luz y, sin embargo, retienen la capacidad de generar respuestas circadianas a la luz (Czeisler y col., 1995). Aunque es bien sabido que los ojos son necesarios para la regulación mediada por luz del sistema circadiano (la extirpación bilateral de los ojos suprime la sincronización (Nelson y Zucker, 1981), los bastones y los conos no parecen ser estrictamente necesarios para la regulación fótica circadiana. En este contexto, se ha identificado a los fotorreceptores involucrados en la sincronización de los ritmos biológicos en mamíferos entre la población de CGRs. De hecho, la ablación genética de los fotorreceptores clásicos no afecta la respuesta fótica del sistema circadiano a los cambios de fase (Foster y col., 1991; Freedman y col., 1999; Lucas y col., 1999). La implicancia clara de que el ojo de los mamíferos contiene un fotorreceptor diferente de los fotorreceptores clásicos para medir la intensidad de la luz ambiente proviene de descripciones en ratón y en humanos de respuestas a irradiancias cuyo espectro de sensibilidad no coincide con la de los fotorreceptores retinianos clásicos (Yoshimura y Ebihara, 1996; Brainard y col., 2001; Thapan y col., 2001). En los últimos años, la descripción de CGRs intrínsecamente fotosensibles (CGRsif) ha dado a la fototransducción no visual una base anatómica. Varias líneas de evidencia señalan que las CGRsif son capaces de transducir información sobre las condiciones de luz ambiental a centros cerebrales implicados en la detección de luz ambiental (como los NSQ), y de participar en funciones que incluyen la sincronización del reloj

circadiano y el reflejo pupilar (RP) (Berson y col., 2002; Hattar y col., 2002; Provencio y col., 2002). Un análisis detallado ha revelado la existencia de una red heterogénea de CGRsif con amplios campos receptivos que detectan la intensidad de luz ambiental con un máximo de absorción en el rango del color azul del espectro, alrededor de los 480 nm (Berson y col., 2002; Dacey y col., 2005). Las CGRsif parecen contribuir también a la supresión fótica de la liberación nocturna de melatonina pineal. La síntesis pineal de melatonina oscila circadianamente con valores máximos durante la fase nocturna, en tanto que la luz durante la noche disminuye muy significativamente los altos niveles nocturnos de melatonina plasmática a través de una vía que involucra al TRH (Moore, 1996). La supresión fótica de melatonina persiste en ratones sin conos y bastones y en algunas personas ciegas (Hannibal y col., 2004; Wee y Van Gelder, 2004). Se ha propuesto a la melanopsina y los Cry como candidatos a fotopigmentos para la fototransducción de la retina interna (Guler y col., 2008; Hankins y col., 2008). Un análisis de ratones que no expresan melanopsina o Cry indica que los fotorreceptores de la retina interna y externa (conos y bastones) contribuyen a las respuestas fóticas no visuales, y que tanto la melanopsina como los Cry desempeñan un rol clave en este proceso. Los Cry son proteínas unidas a flavina y pterina, estrechamente relacionado con fotoliasas de ADN que funcionan como fotopigmentos sensibles a la luz azul en *Drosophila*. Sin embargo, aún es controversial si los homólogos en mamíferos conservan la capacidad de fotorrecepción (Green, 2004). La presencia de Cry en la retina interna de roedores sugiere que estos fotopigmentos podrían estar involucrados en la sincronización circadiana (Miyamoto y Sancar, 1998). Si bien aún no ha sido completamente elucidada una respuesta bioquímica a la luz para los Cry de mamíferos (Green, 2004), lo que genera dudas respecto a su capacidad de fotorrecepción, se ha descripto que los Cry humanos y de *Drosophila* pueden ser activados por luz a través de la fotorreducción de flavina (Hoang y col., 2008). El análisis fisiológico de la sincronización circadiana y la capacidad de respuesta

de la pupila a la luz en ratones que carecen de estas proteínas conduce a tres conclusiones centrales (Van Gelder y col., 2003): 1) los fotorreceptores retinianos internos y externos son capaces de proporcionar información parcialmente redundante a la retina interna, 2) la melanopsina es necesaria para la fototransducción de la retina interna en ausencia de conos y bastones, y 3) los Cry podrían contribuir a la amplitud de la fototransducción de la retina interna, pero no parecen ser estrictamente necesarios. Sin embargo, se demostró que la pérdida de Cry en la retina de ratones disminuye significativamente la señalización fótica a los NSQ, y reduce notablemente el RP (Thompson y col., 2003). Estos resultados sugieren un modelo en el que tanto los fotopigmentos clásicos como los fotopigmentos de la retina interna son suficientes para la detección no visual de la luz (Wee y Van Gelder, 2004). La expresión ectópica de melanopsina restaura la función visual en ratones con degeneración retiniana (Lin y col., 2008). Diversos estudios demuestran que las CGRsif que contienen melanopsina desempeñan un papel central en la sincronización circadiana, la regulación del período circadiano en respuesta a luz constante, el RP, la fotoinhibición aguda de la actividad nocturna, y la regulación fótica de la biosíntesis de melatonina pineal. Muchos de los déficits en estas funciones son sutiles o no evidentes en ratones nulos para melanopsina (Lucas y col., 2003; Mrosovsky y Hattar, 2003; Panda y col., 2002; Ruby y col., 2002). Sólo después de que estos ratones se cruzan con ratones que carecen de bastones y conos funcionales se observan fenotipos extremos (Hattar y col., 2003; Panda y col., 2003). Ratones transgénicos que carecen de fotorreceptores funcionales (Barnard y col., 2004; Freedman y col., 1999) o ratones homocigotas para un alelo que provoca degeneración de la retina (Foster y col., 1991) son capaces de regular la actividad locomotora circadiana por luz de manera similar a los controles. En ratones nulos para melanopsina, esta capacidad de cambiar la fase de los ritmos circadianos en respuesta a pulsos de luz se atenúa (Panda y col., 2002; Ruby y col., 2002), mientras que ratones que carecen de bastones y conos funcionales y nulos para melanopsina

son completamente incapaces de generar cambios de fase inducidos por luz (Hattar y col., 2003; Panda y col., 2003). Análogamente, aunque los ratones *rodless/rodless* (rd/rd) muestran una pérdida de registro de 1,5 unidades en la sensibilidad del RP consensual, la respuesta máxima se puede lograr a irradiancias muy altas (≥ 1014 fotones seg^{-1} cm^{-2}), mientras que ratones nulos para melanopsina no muestran disminución de la sensibilidad, a pesar de que presentan una disminución de alrededor del 10% en la amplitud de la respuesta a las irradiancias más altas analizadas (Panda y col., 2003). Estos resultados sugieren que los fotorreceptores visuales complementan las funciones de la melanopsina en la regulación de las respuestas no visuales.

La posibilidad de que la melanopsina desempeñe un rol en las funciones visuales es aún controversial. Las dendritas de las CGRsif reciben información de células amácrinas y bipolares, lo que provee una base anatómica a través de la cual las CGRsif podrían regular vías visuales (Belenky y col., 2003). Por otra parte, la melanopsina ha sido involucrada en la regulación de la vía visual de los conos humanos en respuesta a la exposición a luz a largo plazo (Hankins y Lucas, 2002). En primates se demostró que las CGRs que expresan melanopsina (mCGRs), combinan con conos y bastones mecanismos que permiten codificar la irradiación en el rango de todo el sistema visual (Dacey y col., 2005). Por último, en ratones nulos para melanopsina se describió la pérdida del control circadiano sobre ciertos parámetros de la vía visual de los conos (Barnard y col., 2006), lo que podría sugerir la participación de los fotorreceptores de la retina interna en la optimización de las vías visuales clásicas de acuerdo a la hora del día. Estos resultados indican que los futuros modelos del procesado visual retiniano deberán considerar las posibles contribuciones del sistema de fotorreceptores que contienen melanopsina.

Además de su proyección directa a los NSQ, estas células también proyectan al núcleo geniculado lateral y al núcleo pretectal olivar, regiones cerebrales implicadas en la

modulación de los ritmos circadianos y el RP (Hattar y col., 2002). Se ha demostrado que células que expresan melanopsina también proyectan a la zona ventral y subparaventricular del núcleo ventrolateral preóptico, regiones del cerebro involucradas en la regulación del sueño y del ritmo circadiano locomotor (Gooley y col., 2003; Morin y col., 2003). Además de los estudios en mamíferos, recientemente se ha demostrado por primera vez la persistencia de fotosensibilidad de la retina interna en un modelo de vertebrados no mamíferos de ceguera, los pollos GUCY1 * (Valdez y col., 2009). Estos animales sufren una retinopatía muy severa, similar a la Amaurosis Congénita de Leber humana con pérdida de bastones y conos funcionales. No obstante, respuestas a la luz como el RP y la sincronización del ritmo diario de alimentación persisten en estos animales. En conjunto, estos resultados apoyan sólidamente la idea de que fotorreceptores retinianos internos participan en la regulación de diversas funciones no visuales como la sincronización fótica de los ritmos de actividad, el RP, el sueño y la supresión de la síntesis nocturna de melatonina pineal a través de una vía no-visual que conecta las CGRsif con los NSQ y el núcleo paraventricular pretectal, entre otras áreas.

4.2. Las prostaglandinas en la retina

Las prostaglandinas (PGs) son derivados lipídicos del ácido araquidónico biológicamente activos pertenecientes a la familia de eicosanoides, junto con los leucotrienos y tromboxanos. Las PGs se sintetizan en forma ubicua y participan en la regulación de una amplia variedad de sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el sistema inmune. A través de mecanismos parácrinos o autócrinos, las PGs regulan la actividad del sistema nervioso autónomo, la algesia y la fiebre, así como la comunicación entre células gliales y neuronas, entre muchos otros procesos (Friedman y col., 1978; Bilak y col., 2004). La PGE2 es un potente vasodilatador, pirógeno e inmunomodulador, y aumenta

la permeabilidad vascular. En el ojo, la PGE2 causa miosis, vasodilatación, alteración de la barrera hemato-ocular y, dependiendo de la dosis, aumenta o disminuye la PIO (Bhattacherjee y Hammond, 1975; Bhattacherjee y Paterson, 1990; Wirostko y col., 1978; Eakins y Bhattacherjee, 1977; Stjernschantz y col. 1989; Bito, 1989; Alm y Villumsen, 1989). La PGF2α reduce la PIO, posiblemente al aumentar el flujo de salida uveoescleral (Alm y Villumsen, 1989).

La síntesis de PGs a partir de ácido araquidónico es catalizada por ciclooxigenasas (COX). Al presente, se han descripto dos isoenzimas microsomales (COX-1 y COX-2) que difieren en su estructura y mecanismos de regulación. La COX-1 es constitutiva, ubicua, y responsable de la síntesis de PGs que participan en el control de la homeostasis celular. La COX-2 es prácticamente indetectable en condiciones basales pero es inducida por una amplia gama de estímulos, sobre todo por estrés oxidativo e inflamación (Morita, 2002). Sin embargo, otros estudios indican que ambas isoenzimas podrían ser expresadas de forma constitutiva, en particular en el sistema nervioso central (Maihöfner y col., 2000).

La retina de mamíferos contiene cantidades relativamente grandes de ácido araquidónico esterificado con fosfolípidos de membrana. La liberación de ácido araquidónico se produce en la retina en distintas condiciones experimentales, por ejemplo, por anoxia, despolarización en presencia de altas concentraciones de K^+ (Birkle y Bazán, 1984a), y exposición a la luz (Dentchev y col., 2007). La actividad de COX está presente en la retina (revisado por Bazán, 1989), y se ha demostrado que la retina humana y bovina pueden sintetizar prostaglandinas E2, F2α, I2, D2 y tromboxano A2 a partir de ^{14}C-ácido araquidónico (Birkle y Bazán, 1984b Kulkarni, 1991). Sin embargo, la información disponible acerca de estos autacoides a nivel retiniano es todavía fragmentaria y con mayor orientación farmacológica que fisiológica. En ese sentido, se ha demostrado la participación de las PGs en el edema macular cistoideo (Tennant, 1978; Milch y Yannuzzi, 1987) y la retinopatía diabética (Du y col., 2004). En

condiciones fisiológicas, las PGs locales pueden actuar como moduladores de las respuestas sinápticas, regulando la liberación de dopamina (al-Zadjali y col., 1994) y aspartato (LeDay y col., 2004), así como la respuesta electrorretinográfica (Siminoff y Bito, 1981; 1982).

Más recientemente, se ha demostrado que la PGE2 induce la expresión del ARNm de *Per1* y la oscilación subsiguiente de genes reloj en células de fibroblastos NIH3T3 (Nakahata y col., 2006), y que administrada por vía intraperitoneal, la PGE2 induce un cambio de fase en la expresión de *Per1* en hígado, riñón y corazón de ratón (Tsuchiya y col., 2005). En la retina, las PGs participan en la inducción de los movimientos de los conos y el epitelio pigmentario inducidos por la oscuridad, mientras que inhibidores de COX disminuyen la elongación de los conos y la agregación de pigmentos en la retina de peces (Cavallaro y Burnside, 1988). Estos resultados sugieren la participación de las PGs en la fisiología circadiana retiniana, así como en el procesamiento de la información fótica local. En este contexto, uno de los objetivos del presente trabajo fue analizar la biosíntesis de PGs en la retina de hámster desde una perspectiva cronobiológica.

5. El glaucoma

El glaucoma se conoce desde la antigüedad; su nombre deriva del griego *Glaukos* que significa verde pálido, el color con el que los griegos describían los ojos de los ancianos ciegos, y el color que, efectivamente, toman las pupilas de los enfermos con glaucoma avanzado.

El glaucoma define a un grupo de desórdenes visuales que constituye una de las principales causas de ceguera irreversible en los países desarrollados. Es una disfunción ocular de alta prevalencia, caracterizada por diversas manifestaciones clínicas e histopatológicas que incluyen una pérdida progresiva de las funciones visuales, que se acompaña de la muerte de CGRs y la atrofia progresiva de la cabeza del nervio óptico. Una complejidad adicional del

glaucoma es que su curso es prácticamente asintomático hasta etapas avanzadas de pérdida visual, debido a que la enfermedad afecta en primera instancia el campo visual periférico y sólo en las últimas etapas compromete la visión central. Una vez ocurrida la pérdida de la función visual, ésta es irreversible.

El común denominador de todas las formas de glaucoma es la neuropatía óptica característica, que se asocia con varios factores de riesgo, entre los cuales el más importante es el aumento de la PIO (Van Buskirk y col., 1978; Van Buskirk y Cioffi, 1992). De hecho, la farmacología disponible para el tratamiento de esta disfunción está orientada esencialmente hacia el control de la PIO. Sin embargo, ya en 1857, Albrecht Von Graefe describió el glaucoma de presión normal en pacientes que desarrollaban esta misma neuropatía con PIO por debajo del límite establecido (Lozano-Elizondo, 2010). Actualmente se estima que este tipo de glaucoma tiene una incidencia en la población del 0,6 % (Bonomi y col., 1998). Por otro lado, también se han observado pacientes con hipertensión ocular que no desarrollan la neuropatía.

Existen distintas formas de clasificar los glaucomas. Según su etiología, se dividen en primarios (sin causa aparente) o secundarios a otras patologías como diabetes, miopía y uveítis (Daubs y Crick, 1981; Richler y col., 1982; Klein y col., 1994), entre otras. De acuerdo a la apariencia del ángulo de la cámara anterior, pueden ser glaucomas de ángulo abierto o cerrado. Por último, según su evolución pueden cursar en forma aguda o crónica. El glaucoma crónico de ángulo abierto es la forma más frecuente (60 -70 %) (Choong y col., 2003). Se ha postulado la influencia de un factor hereditario (Shin y col., 1977; Uhm y col., 1992), así como de un componente etario (Quigley y col., 1994; Leske y col., 1995) y racial (David y col., 1978; Tielsch y col., 1991; 1994). En un ojo glaucomatoso, la resistencia a la salida del humor acuoso está incrementada, causando una elevación de la PIO. En el glaucoma primario de ángulo abierto, el mecanismo preciso de este aumento de la resistencia

es aún elusivo, aunque muy probablemente esté asociado a alteraciones a nivel del trabeculado y/o el canal de Schlemm (Cernea, 1993).

El diagnóstico clínico del glaucoma se fundamenta en tres alteraciones oculares: el aumento de la PIO, la alteración concéntrica del campo visual y la excavación de la papila debida a la pérdida de axones del nervio óptico. Si bien, como ya se mencionara, la disminución farmacológica de la PIO es por ahora la terapia de elección, en muchos casos se ha observado que la pérdida visual persiste luego de su restauración a valores normales. A pesar de la gran variedad de fármacos disponibles (agonistas o antagonistas adrenérgicos, agonistas colinérgicos o inhibidores de la colinesterasa, entre otros) aún existe controversia en la terapia médica del glaucoma. En el inicio de la enfermedad, el tratamiento frecuente es la administración tópica u oral de alguno de estos fármacos. Cuando el daño en el nervio o en el campo visual progresa a pesar de la terapia farmacológica (uso de 2 drogas: máximo tratamiento tópico) (Edmunds y col., 1999) o no se logra un adecuado control de la hipertensión, se recurre a una trabeculoplastía láser o a una intervención quirúrgica.

5.1. Modelos experimentales de glaucoma

Desde hace varias décadas, la comunidad científica internacional reconoce el uso de modelos animales como una herramienta útil para el estudio de la patología humana. La similitud de un proceso patológico en animales de experimentación, aún con diferencias respecto al humano, contribuye significativamente a la comprensión de un proceso en su contraparte humana. A pesar de múltiples intentos, el desarrollo de modelos para el estudio del glaucoma todavía no ha alcanzado consenso en un modelo que reproduzca completamente la enfermedad en animales de laboratorio y sea reproducible. Los modelos experimentales de glaucoma previamente descriptos, son generalmente inducidos por el impedimento de la salida de humor acuoso. En este sentido, las estrategias más frecuentemente utilizadas son: 1)

la inyección de solución salina hipertónica en las venas acuosas (Morrison y col., 1997), 2) la cauterización u oclusión de 2 ó 3 de las venas epiesclerales (Shareef y col., 1995), 3) el bloqueo del flujo acuoso por fotocoagulación luego de la inyección de tinta china en la cámara anterior del ojo (Ueda y col., 1998), y 4) líneas de animales donde la patología se produce por alteraciones genéticas (Anderson y col., 2002). Ninguno de estos modelos es ideal, y en muchos casos requieren de equipos especializados y del aprendizaje de técnicas de difícil manejo, los animales desarrollan glaucoma en forma relativamente tardía y requiere un compromiso de tiempo significativo para la experimentación, o presentan una cinética de elevación de la PIO significativamente diferente a la de los humanos.

Si bien se ha sugerido una relación causal entre la alteración del metabolismo de GAGs trabeculares y el glaucoma, no se disponía de un modelo animal que permitiera evaluar esta hipótesis. Como ya se mencionó, los tipos predominantes de GAGs en el trabeculado son el AH y el CS. Trabajos pioneros de Barany y Scotchbrook (1954) demostraron que el tratamiento de ojos de gato con hialuronidasa testicular bovina disminuye la resistencia al filtrado en el ángulo, a casi la mitad de su valor inicial. Desde entonces, se ha dedicado considerable atención a los mucopolisacáridos sensibles a hialuronidasa en el sistema de salida del flujo. En este sentido, se ha demostrado que la hialuronidasa testicular incrementa el flujo de humor acuoso en ojos de perros (Van Buskirk y Brett, 1978) aunque la evidencia sugiere un efecto menor en ojos humanos (Hayasaka y Sears, 1978). Asimismo, se demostró una correlación entre la remoción del AH y una disminución en el flujo de humor acuoso en ojos de conejo (Kneper y col., 1984) perro (Van Buskirk y Brett, 1978) y vaca (Barany y Scotchbrook, 1954), pero no en ojos de primates (Hubbard y col., 1997). Por lo tanto, estas evidencias sugieren que en algunas especies, existe una barrera de GAGs que disminuye la salida del humor acuoso y que es sensible a la hialuronidasa testicular. En primates, la evidencia de la presencia de una barrera de GAGs es poco concluyente (Hubbard y col.,

1997, Sawaguchi y col., 1992). En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que la brimonidina, un hipotensor ocular de uso frecuente, aumenta significativamente la actividad de hialuronidasa en el trabeculado del conejo, y hemos postulado que el efecto hipotensor de este fármaco podría estar, al menos en parte, asociado a la capacidad de aumentar el *clearance* de GAGs (Benozzi y col., 2000). Si una disminución en el contenido de GAGs trabeculares disminuye la PIO, parece posible que el aumento en el contenido de AH o CS trabecular induzca el efecto opuesto. Varios estudios histológicos de microscopía óptica y electrónica, así como estudios inmunohistoquímicos describieron una excesiva acumulación de materiales de la matriz extracelular en los trabeculados de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (Fine y col., 1981; Rohen, 1983; Johnson, 2006). Resultados similares se obtuvieron en un modelo de glaucoma cortisónico experimental en conejos (François y col., 1984).

Se dispone de considerable cantidad de evidencias a partir del uso de agentes viscoelásticos en la práctica oftalmológica, que avalan el vínculo entre los GAGs y la PIO. Estos agentes contienen AH y CS y se han convertido en una herramienta esencial en la cirugía del segmento anterior para generar espacio y reducir el trauma y la pérdida de células endoteliales. Estos agentes son responsables de causar o exacerbar en forma transitoria, y a veces significativa, una elevación post-quirúrgica de la PIO (Jurgens y col., 1997). Se ha demostrado que la inyección de sustancias viscoelásticas conteniendo AH aumenta la PIO en conejos (Harooni y col., 2000). El análisis bioquímico de los distintos GAGs en el glaucoma demostró una disminución en el contenido de AH y un aumento en el contenido de CS en el trabeculado (Knepper y col., 1996). Se obtuvieron resultados similares en un modelo de hipertensión ocular inducido por dexametasona en conejos (Knepper y col., 1985) y en primates (DeSantis y col., 1990). Estos resultados sugieren que el CS podría participar en la regulación del flujo de humor acuoso y que la acumulación de CS en el trabeculado podría

cumplir un rol significativo en el glaucoma de ángulo abierto. De hecho, se ha demostrado que una mayor cantidad de CS en el tejido conectivo juxtacanalicular en el glaucoma tiene un mayor impacto sobre el flujo de humor acuoso que la concentración trabecular de HA (Knepper y col., 2005). Basado en este conjunto de evidencias, en trabajos previos de nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de glaucoma a través de la administración semanal de AH en la cámara anterior del ojo. Si bien este modelo reproduce aspectos centrales del glaucoma humano, su utilización ha debido ser abandonada porque la empresa fabricante de este reactivo (Sigma) ha interrumpido en forma definitiva su producción. Hemos realizado múltiples intentos para reemplazar este producto con reactivos similares de ésta u otras empresas, pero no hemos logrado reproducir los resultados originales obtenidos con el tipo de AH con el que se realizaron estos experimentos. Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue el desarrollo de un modelo experimental de glaucoma a través de la administración intracameral de otro GAG, el CS, con el objetivo particular de analizar la influencia del glaucoma sobre la función del sistema circadiano.

Sobre la base de las consideraciones mencionadas en la Introducción, los objetivos centrales de este trabajo de Tesis fueron:

1- Analizar la biosíntesis de PGs en la retina de hámster desde una perspectiva cronobiológica.

2- Examinar la existencia de un ritmo circadiano en los niveles de las proteínas reloj CLOCK y BMAL1, así como la localización intrarretiniana de estas proteínas en la retina de hámster.

3- Desarrollar un modelo experimental de glaucoma en ratas, a través de inyecciones intracamerales de condroitín sulfato.

4- Examinar el efecto del glaucoma experimental sobre las funciones visuales no formadoras de imagen.

5- Analizar el ritmo de actividad en pacientes con glaucoma.

1. Animales

1.1. Hámsteres

Se utilizaron hámsteres dorados macho (*Mesocricetus auratus*, peso promedio: 120 ± 20 g), provenientes de una colonia de *Charles River Breeding Laboratories* (Wilmington, MA, USA) y obtenidos de un comerciante local. Los animales se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*, en un ambiente controlado de temperatura (21 ± 2ºC) y humedad. El fotoperíodo del bioterio fue de 14 h de luz - 10 h de oscuridad (L:D, prendido de las luces a las 6 a.m.). En algunos experimentos, los animales se mantuvieron en oscuridad constante (D:D) por 48 h antes del sacrificio. En algunos casos, los animales se sacrificaron a las 4:00 h, 8:00 h, 12:00 h, 16:00 h, 20:00 h y 24:00 h. El período circadiano promedio para nuestros hámsteres es de 24,1 h, por lo tanto en condiciones constantes, los tiempos circadianos cambiarían como máximo 6-12 minutos. Por lo tanto, asumimos que los tiempos circadianos fueron aproximadamente iguales a los horarios del *Zeitgeber* previos. En aquellos casos en los que los animales se sacrificaron en condiciones de oscuridad, los animales se sacrificaron bajo luz roja tenue (< 1 lux) y las incubaciones se realizaron en oscuridad. Luego del sacrificio, se enuclearon los ojos y se extrajeron y procesaron las retinas como se describe a continuación para cada ensayo.

1.2. Ratas

Se utilizaron ratas *Wistar* macho (peso promedio: 250 ± 50 g) mantenidas con agua y comida *ad libitum*, en un ambiente controlado de temperatura (21 ± 2ºC) y humedad. El bioterio fue iluminado con luz fluorescente, que se apagaba y prendía automáticamente cada 12 horas, (luz de 7 a.m. a 7 p.m.).

En todos los procedimientos de manipulación y sacrificio de animales se siguieron estrictamente los Estatutos para el Uso de Animales en Oftalmología e Investigación Visual de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

2. Determinación de la liberación de PGs retinianas

Retinas individuales se incubaron en 150 µl de solución Krebs-Ringer bicarbonato a 37°C durante 1 h en una atmósfera 95% O_2-5 % CO_2. Al final del período de incubación, las retinas se removieron y se utilizaron muestras de los medios de incubación para la determinación de los niveles de PGE2 y PGF2α por radioinmunoensayo (RIA), como se describió previamente (Ribeiro y col., 2003). Para ello, alícuotas (100 µl para PGE2 y 20 µl para PGF2α) de los medios de incubación se pre-incubaron con un antisuero específico (dilución 1:20 para los anticuerpos anti-PGE2 y anti-PGF2α) durante 45 minutos a 4°C. Luego, se agregó [^{3}H]-PGE2 o [^{3}H]-PGF2α (20.000 dpm, actividad específica 160 y 169.7 Ci/mmol, respectivamente, pureza mayor a 97%, New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA), y las muestras se incubaron durante 1 h a 4°C. Los niveles de PGs se obtuvieron a partir de una curva estándar, con un límite de sensibilidad del ensayo de 1 pg. La inyección intraperitoneal de indometacina (10 mg/kg), 3 h antes del sacrificio, provocó una reducción significativa en la liberación retiniana de PGE2 y PGF2α (~ 85%).

3. Determinación de los niveles de COX-1, COX-2, CLOCK, BMAL-1, rodopsina, melanopsina y Thy-1.

3.1. Preparación de las muestras para determinar niveles de COX-1 y COX-2

Las retinas se homogeneizaron en 200 µl de *buffer* (10 mM de HEPES; pH 7,9, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0,5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 40 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de pepstatina A, 0,5 µg/ml de

aprotinina y se añadió Tritón a una concentración de 0,5% (v/v). Después de 15 min a 4°C, los homogenatos se agitaron suavemente durante 15 s y se centrifugaron a 8.000 g durante 15 min. Una alícuota de los sobrenadantes se utilizó para determinar la concentración de proteínas. El resto de los sobrenadantes se utilizó para determinar los niveles de COX-1 y COX-2 por *Western blot.*

3.2. Preparación de las muestras para determinar niveles de CLOCK y BMAL-1

Las retinas se homogeneizaron en 100 µl de *buffer* de homogeneización similar al ya descripto. Después de 15 min a 4°C, los homogenatos se agitaron suavemente durante 5 s y se centrifugaron a 16.000 g durante 30 s. Los sobrenadantes se utilizaron como la fracción citosólica. Los precipitados se resuspendieron en 90 µl de *buffer* (20 mM de HEPES; pH 7,9, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 25% de glicerol, 0,4M de NaCl, 1 mM de DTT, 0,5 mM PMSF, 40 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de pepstatina A y 0,5 µg/ml de aprotinina). Se agitaron las muestras durante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 16.000 g durante 5 min y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron como la fracción nuclear. Alícuotas de ambas fracciones se utilizaron para determinar la concentración de proteínas y el resto se utilizó para determinar los niveles de CLOCK y BMAL-1 en la porción citosólica y nuclear por *Western blot.*

3.3. Preparación de las muestras para determinar niveles de rodopsina, melanopsina y Thy- 1

Las retinas se homogeneizaron en 100 µl de *buffer* de homogeneización similar al ya descripto. Después de 15 min a 4°C, los homogenatos se agitaron suavemente durante 5 s y se centrifugaron a 900 g durante 10 min y se procedió como ya se describió en **3.1**.

3.4 *Western blot*

Las proteínas (100 µg/muestra) se separaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno durante 60 min a 15 V en un sistema Bio-Rad Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en polvo descremada en *buffer* Tris (pH 7,4) conteniendo 0,1% de Tween 20 durante 60 min a temperatura ambiente. Para determinar los niveles de COX-1 y COX-2, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo anti-COX-1 o anti-COX-2 en una dilución 1:500 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Para determinar los niveles de CLOCK y BMAL-1, las membranas se incubaron durante 72 h a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo anti-CLOCK o anti-BMAL-1 en una dilución 1:1000 y 1:500, respectivamente (Affinity Bioreagent, Rockford, IL, USA). Para determinar los niveles de rodopsina y melanopsina, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-rodopsina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o anti-melanopsina (Affinity Bioreagent, Rockford, IL, USA) en una dilución 1:1000. Para la determinación de los niveles de Thy-1 se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Thy-1 en una dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Las membranas se lavaron con *buffer* Tris (pH 7,4) conteniendo 0,1% de Tween 20 y se incubaron durante 1 h con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (Western Blotting Analysis System; Amersham Biosciences, Buenos Aires, Argentina) y se determinaron los niveles de β-actina como control interno de carga. Las membranas se escanearon y la intensidad de las bandas se determinó utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda,

USA). Los valores se expresaron como unidades arbitrarias de los niveles de COX, CLOCK, BMAL-1, rodopsina, melanopsina o Thy-1/niveles de β-actina.

4. Determinación de la localización de COX-1, COX-2, CLOCK y BMAL-1

La localización de COX-1, COX-2, CLOCK y BMAL-1 se determinó por inmunocitoquímica. Para ello, se enuclearon los ojos, e inmediatamente se sumergieron durante 24 h en un fijador conteniendo formaldehído al 4% en *buffer* PBS (100 mM de fosfato de sodio y 100 mM de NaCl, pH 7,2). Se extrajeron la córnea y el cristalino y el segmento posterior se deshidrató y se incluyó en parafina. Se realizaron secciones con micrótomo de un espesor de 5 µm a lo largo del meridiano vertical que pasa por la cabeza del nervio óptico. La recuperación antigénica se realizó por calentamiento (90°C) durante 30 min en secciones sin teñir inmersas en *buffer* citrato (pH 6,3) y la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución 0,3% de H_2O_2 en metanol durante 20 min. A continuación, las secciones se pre-incubaron con suero normal de caballo durante 1 h (NHS). Para la detección de COX-1 y COX-2, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los mismos anticuerpos utilizados para los experimentos de *Western blot* en una dilución 1:500. Para la detección de CLOCK y BMAL-1, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los mismos anticuerpos utilizados para los experimentos de *Western blot* en una dilución de 1:1000. Se realizó una tinción con estreptavidina-biotina marcada utilizando el sistema LSAB2® HRP Dakocytomation, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Algunas secciones no se trataron con los anticuerpos primarios para confirmar la especificidad de la inmunorreactividad. Se capturaron digitalmente imágenes microscópicas con un microscopio Nikon Eclipse E400 (iluminación: lámpara halógena de 6-V, 20 W, equipado con una fuente de luz estabilizada) a través de una cámara Nikon Coolpix S10.

5. Lesión de los núcleos supraquiasmáticos (NSQ)

Los animales se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (150 mg/kg) y clorhidrato de xilazina (2 mg/kg) administrados por vía intraperitoneal y se colocaron en un aparato estereotáxico. Las lesiones electrolíticas de los NSQ se realizaron con las siguientes coordenadas (de bregma): +0,6 mm rostral, -8,2 mm ventral y 0,0 en la línea media (con la barra interauricular estereotáxica fijada a -2,0 mm). Se aplicó corriente continua (2,5 mA) durante 40 s. En los animales con operación simulada, el procedimiento fue similar, pero no se aplicó corriente. Después de la cirugía, los animales se mantuvieron entre 7 y 10 días en D:D. La lesión de los NSQ se verificó por la pérdida del ritmo circadiano de actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante, así como por la histología *post-mortem* del cerebro de secciones coronales con tinción de Kluver-Barrera.

6. Ritmos de actividad locomotora en hámsteres y ratas

Los animales se mantuvieron individualmente en jaulas y se monitoreó la actividad locomotora diaria con sensores infrarrojos ubicados sobre cada jaula. El sensor infrarrojo funciona mediante la emisión de pulsos de luz infrarroja midiendo la distancia a los objetos por el tiempo que tarda en llegar la señal reflejada. Cada vez que cambia la distancia, el sensor abre o cierra un interruptor. Todos los sensores se probaron para garantizar la uniformidad de la respuesta. Las muestras se tomaron cada 5 minutos y se almacenaron para su posterior análisis.

Para el estudio de los ritmos de actividad de hámsteres, el día en que se realizó la lesión de los NSQ se los retiró de la jaula, se realizó la cirugía y luego se los mantuvo en la jaula en condiciones de oscuridad constante. La actividad registrada se analizó usando un software para la adquisición de datos (ElTemps, Barcelona, España) y se realizó un actograma y un

periodograma para cada animal para verificar la presencia o pérdida de ritmicidad locomotora.

Para analizar los ritmos de actividad locomotora de ratas, los animales se mantuvieron en un ciclo L:D de 24 h (encendido de las luces a las 7.00 h, apagado de las luces a las 19.00 h) durante 15 días. Luego se realizó un cambio de fase del ciclo L:D de 6 h (retraso de fase: encendido de las luces a las 13.00 h, apagado de las luces la 1.00 h; adelanto de fase: encendido de las luces a la 1.00 h, apagado de las luces a las 13.00 h) y se calculó el tiempo de resincronización. La actividad registrada se analizó usando el mismo software que en el caso de los hámsteres. Se construyó un actograma y un gráfico en forma de onda con la actividad promedio de cada animal, y se determinó el inicio de la actividad locomotora (respecto del apagado de las luces) como los primeros 6 bloques de actividad (registrada cada 5 minutos) que superan el valor de la media de la gráfica. Además, se analizó el porcentaje de actividad locomotora en las fases de luz y oscuridad. El actograma o *double plot* es un gráfico que representa los valores de una variable (actividad, temperatura, etc.) a lo largo de en un ciclo temporal. En el eje X se representa la variable a lo largo de cada ciclo (en este caso un día) y en el eje Y ciclos sucesivos. Se grafican los datos de cada ciclo repetidos en dos columnas (*double plot*), una al lado de la otra, con el fin de visualizar mejor los componentes rítmicos no sincronizados. Las líneas negras representan la medida de la variable en estudio, en este caso actividad locomotora. A mayor altitud, mayor actividad. Donde no hay líneas, no hay actividad, es decir, el animal está en reposo. La barra que se encuentra arriba del actograma indica la fase de luz (barra blanca) y la fase de oscuridad (barra negra).

7. Administración intracameral de condroitín sulfato (CS)

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de hidrocloruro de ketamina (50 mg/kg), e hidrocloruro de xylazina (0,5 mg/kg). Con agujas 30-G, se inyectaron 20 µl de CS (10 - 40%) en solución salina en un ojo, y en el ojo contralateral, el mismo volumen de

solución fisiológica. Para ello, los ojos se enfocaron bajo un microscopio quirúrgico Colden, con luz coaxial. Se movió la aguja a través del limbo corneoescleral hacia la cámara anterior con el bisel hacia abajo. Cuando la punta del bisel alcanzó la cámara anterior, el líquido progresivamente incrementó la profundidad de la cámara, separando la aguja del iris y evitando el contacto con el cristalino (Figura 11). Las aplicaciones se realizaron lentamente, usando la fuerza necesaria para vaciar el contenido de la jeringa de tuberculina (ajustada a 20 µl). Las inyecciones se aplicaron en el limbo corneoescleral, comenzando en la hora 12 y cambiando el sitio de la inyección de hora en hora para evitar la formación de *pannus*. Se rotó el animal para lograr mejor acceso al limbo. Las inyecciones se realizaron luego de aplicar una gota de hidrocloruro de proparacaína al 0,5% en cada ojo. Se excluyeron los animales que desarrollaron cataratas o *pthisis bulbi*, cuya incidencia no superó el 5% del total de animales utilizados. Además, casi todos los animales desarrollaron un edema corneal localizado en el sitio de la inyección que no duró más de 24 h. Durante el tiempo en el que los animales estuvieron anestesiados, se les colocó gel sobre los ojos para evitar queratitis. No se observaron diferencias en la incidencia de estas complicaciones oculares entre los grupos inyectados con vehículo o con CS. En algunos experimentos, los animales se inyectaron bilateralmente con solución salina o CS. Para la evaluación del reflejo pupilar, los animales se inyectaron semanalmente en un ojo con solución salina o CS, y los ojos contralaterales se mantuvieron intactos.

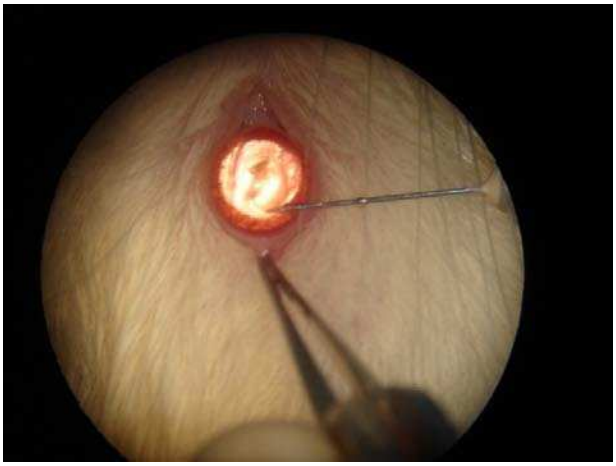

Figura 11. Inyección de AH en la cámara anterior de rata

8. Determinación de la presión intraocular (PIO)

La PIO se determinó mediante un TonoPen XL (Figura 12) (Mentor, Norwell, MA) en ratas conscientes según la técnica descripta por Moore y col. (1995). Los animales se envolvieron suavemente con una toalla, sin provocar estasis venosa ni efectos valsalva, y mientras un operador lo mantenía firme, otro realizaba la determinación. Se obtuvieron cinco lecturas de cada ojo, omitiendo las que se registraban cuando el aparato no estaba en contacto firme con la córnea. La variación entre lecturas resultó menor al 10 %. Los promedios de estas lecturas se registraron como la PIO de un ojo y un día determinados. La PIO de cada animal se promedió con las del resto de los animales del mismo grupo y el valor promedio resultante se registró como la PIO media del grupo ± error estándar (EE). No se observaron diferencias significativas entre el ojo derecho y el ojo izquierdo en animales intactos o inyectados con vehículo. Las mediciones de la PIO se hicieron a la misma hora cada día o semana (entre las 11.00 h y las 12.00 h), para evitar las variaciones diarias en este parámetro.

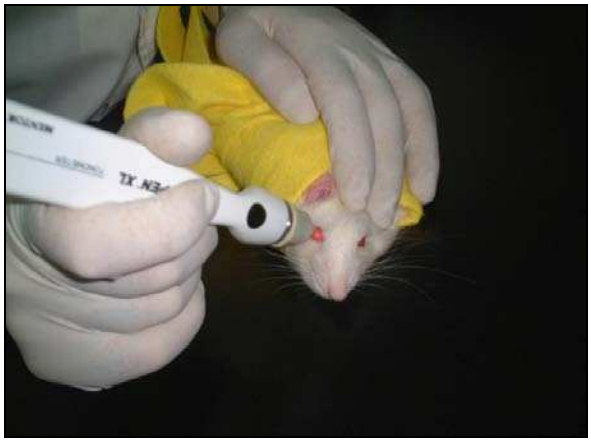

Figura 12. Determinación de la PIO en ratas

9. Estudios electrorretinográficos

En animales tratados con CS o solución salina, se registraron electrorretinogramas (ERGs) escotópicos en ambos ojos, luego de tres días de la última inyección. Los animales se anestesiaron como ya se describió. Para el registro del ERG, los animales se adaptaron a la oscuridad durante 6 horas. Luego, se administró una gota de proparacaína al 0,5% como anestésico tópico y lágrimas artificiales para maximizar la conductibilidad entre el electrodo y la córnea. Se apoyó un electrodo de oro sobre la córnea, como referencia se utilizó un electrodo de tipo aguja localizado en la oreja ipsilateral, y el electrodo de tierra se colocó en la porción media de la cola del animal (Figura 13). Los electrodos se colocaron bajo luz roja tenue (1 lux) de 15W de intensidad, que no modificó la adaptación a la oscuridad y se apagó durante el registro. Los registros se realizaron en forma simultánea en ambos ojos. Se utilizó un fotoestimulador de leds tipo *flash* de 9 candelas s/m^2 de intensidad, 0,2 Hz de frecuencia a una distancia de 20 cm del animal, en ambiente de total oscuridad. Para la amplificación y el registro de la señal se utilizó un equipo AKONIC BIO-PC (Akonic BIO-PC, Akonic, Argentina). La señal se registró con una ganancia de 100 µV, sin atenuación, con filtros de ruido (50 Hz) y filtros de alta frecuencia (1000 Hz) y baja frecuencia (1,5 Hz) para optimizar el registro. Se aplicaron 10 estímulos por estudio y se tomó el promedio de los registros. Se

determinaron las amplitudes y latencias de las ondas a y b para cada ojo. La onda a se determinó desde la línea isoeléctrica hasta la primera deflexión y la onda b, desde esta deflexión hasta el pico de la onda b.

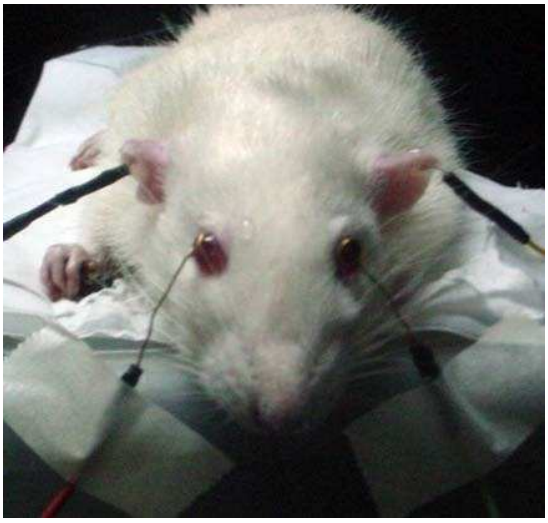

Figura 13. Disposición de electrodos para el registro de ERG

10. Potenciales visuales evocados (VEPs)

Para el registro de los potenciales visuales evocados escotópicos (VEPs), se colocaron quirúrgicamente dos electrodos de acero inoxidable 4 mm lateral a la cisura interhemisférica y 5,6 mm por detrás de bregma (electrodo activo). Se colocaron electrodos de referencia en posición 2 mm lateral a la línea media y 2 mm antes de bregma, y un electrodo de tierra en la cola. Ambos electrodos se aislaron y fijaron con acrílico dental y la piel se suturó con nylon 5/0. Cinco días después de la implantación de los electrodos, los VEPs se evaluaron de la siguiente manera: después de 6 h de adaptación a la oscuridad, las ratas se anestesiaron, las pupilas se dilataron y la córnea se irrigó de forma intermitente como se describió anteriormente, bajo luz roja tenue. Todos los registros se realizaron dentro de los 20 min desde la inyección de anestésicos y los animales se mantuvieron a temperatura constante durante y después del procedimiento mediante mantas calefactoras. Cada ojo se registró

individualmente, se ocluyó el ojo contralateral, y se registró un promedio de 70 estímulos. Los ojos se estimularon con luz blanca sin atenuar (1 Hz) con un estimulador fótico (diodos emisores de luz), fijado a la máxima intensidad de luz y los registros se amplificaron, filtraron (0,5 Hz filtro de baja frecuencia, 100 Hz filtro de alta frecuencia) y promediaron. Se evaluó la amplitud entre la deflexión N2 y el pico P2, y se determinó la latencia de N2 desde el inicio hasta el segundo pico negativo.

11. Microscopía óptica y análisis de imágenes de la retina y nervio óptico de rata

11.1. Estudio histopatológico

Se analizaron histológicamente ojos de animales tratados semanalmente con CS o solución salina. Los ojos se enuclearon luego de una sobredosis de anestesia. Inmediatamente se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en *buffer* fosfato (pH 7,2) por 1 hora. Se mantuvo la membrana nictitante para la correcta orientación del corte. Se extrajeron la córnea y el cristalino y el segmento posterior se fijó nuevamente por un período de 12 h en el mismo fijador. Se realizó una sección de nervio óptico 1.5 mm posterior al globo ocular de ojos inyectados con vehículo o CS, que luego se fijó en tetróxido de osmio en *buffer* fosfato. Los nervios se procesaron en resina epoxi y cortes de 1 µm se tiñeron con azul de toluidina. Los segmentos posteriores se deshidrataron en series de alcohol y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm a lo largo del meridiano horizontal por la cabeza del nervio óptico y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

11.2. Procesado de imágenes

Las imágenes de microscopia óptica se capturaron digitalmente con una cámara Sony SSCDC50 adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E4000 (iluminación: 6-V luz halógena, 20W). Las imágenes capturadas se digitalizaron en una matriz de 520 x 390 pixeles. Luego se

transfirieron al sistema de análisis de imagen Scion Image (Scion Corporation Beta 4.0.2, Windows). La morfometría de la retina se evaluó según lo descrito por Takahata y col. (2003), con modificaciones menores. Se seleccionaron tres secciones de cada retina al azar. Se analizaron nueve imágenes microscópicas de 1 mm desde el borde temporal del nervio óptico en forma digital. Se utilizó un objetivo de 40x con luz acromática. En el aumento utilizado, cada píxel de la imagen corresponde a 0,31µm, y cada campo en el monitor representa un área de tejido de 19.318,7 μm^2. Se midió el espesor (en µm) de la capa plexiforme interna (CPI), la capa nuclear interna (CNI), la capa nuclear externa (CNE), y la retina total. El número de células en la capa de células ganglionares (CCG) se expresó en células por 100 µm. Para cada ojo, se promediaron los resultados obtenidos en tres secciones separadas y se registró la media de 5 ojos como el valor representativo de cada grupo. El análisis morfométrico se realizó por observadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo.

11.3. Morfometría del nervio óptico

La cuantificación de axones del nervio óptico se realizó según lo descripto por Levkovitch-Verbin y col. (2004) con modificaciones. Con un objetivo acromático de 100x, se capturaron 5 imágenes separadas de distintas regiones del nervio óptico (2 centrales y ocho periféricas en sentido horario), para determinar la densidad y distribución de los axones. A la magnificación utilizada, cada campo en el monitor correspondió a un área de tejido de 4.095 μm^2 y cada pixel de la imagen a 3,2 µm. Se calculó el tamaño de cada axón (diámetro) y la densidad de axones por mm^2. Se comparó el número de axones por campo entre los animales inyectados con vehículo o con CS. El número de axones contados en 5 imágenes, representó aproximadamente el 10 % del área total del nervio óptico. El análisis morfométrico se realizó por operadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo.

12. Inmunocitoquímica de melanopsina

Los animales se anestesiaron y perfundieron intracardíacamente con 150 ml de solución salina seguida de 300 ml de una solución fijadora conteniendo formaldehído al 4% en *buffer* fosfato 0,1M (pH 7,4). Luego, se enuclearon los ojos, se extrajeron la córnea y el cristalino, y el segmento posterior se sumergió durante 24 h en el mismo fijador. Las retinas se aislaron y montaron en portaobjetos de vidrio. La recuperación antigénica se realizó por calentamiento (90 ºC) durante 30 min en retinas enteras, sin teñir, inmersas en *buffer* citrato (pH 6,3) y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución 0,3% de H_2O_2 en PBS durante 20 min. Luego, las retinas se pre-incubaron con NHS al 2% en PBS durante 1 hora. Para la detección de CGRs positivas para melanopsina (mCGRs), las retinas se incubaron toda la noche a 4°C con el mismo anticuerpo utilizado para los experimentos de *Western blot* en una dilución de 1:1000. La inmunorreactividad para melanopsina se desarrolló con estreptavidina-biotina marcada, utilizando el sistema LSAB2®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (LSAB2® System HRP Dakocytomation, Dako, Carpinteria, CA, USA). Cada retina se dividió en cuadrante superior, inferior, nasal y temporal y se contaron todas las células melanopsina positivas en un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 (iluminación: lámpara halógena de 6-V, 20 W, equipado con una fuente de luz estabilizada) (100x) y se realizó un esquema representativo de la retina.

13. Marcación retrógrada de CGRs que proyectan al Colículo Superior.

Se realizó una incisión en la piel que recubre el cráneo y se expuso el cuero cabelludo. Se perforó el cráneo a ambos lados de la línea media, 6,5 mm por detrás del bregma y 1,5 mm lateral a la línea media. Se realizaron 2 agujeros de aproximadamente 2 mm de diámetro a ambos lados de la línea media, en la zona donde se encuentran el hemisferio derecho y el hemisferio izquierdo del Colículo Superior (Cs), determinado a partir de un atlas

estereotáxico de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2007). Se marcaron retrógradamente las CGRs mediante una inyección de 2 µl de Fluorogold, un trazador fluorescente (Fluorocromo, Denver, CO, USA) al 2% en solución salina, en ambos hemisferios del Cs. El trazador se inyectó con una jeringa Hamilton de 10 µl (Reno, Nevada, USA) con una aguja de calibre 30G. Cinco días después de la inyección de Fluorogold, se anestesiaron las ratas y se perfundieron intracardíacamente con 150 ml de solución salina seguida de 300 ml de una solución fijadora que contenía formaldehído al 4% en 0,1M de *buffer* fosfato (pH 7,4). Luego, se enuclearon cuidadosamente los ojos, se extrajeron la córnea y el cristalino, y el segmento posterior se sumergió en el mismo fijador durante 24 h. Las retinas se aislaron, se lavaron con solución *buffer* fosfato (0,01M de PBS, pH 7,4) y se montaron en un portaobjetos de vidrio para el recuento de células.

14. Evaluación del reflejo pupilar (RP)

Los animales se adaptaron a la oscuridad por 1 h antes de la evaluación del RP. Se aplicó un pulso de luz blanca (1200 lux) a un ojo y se registró la contracción de la pupila del ojo contralateral. Los registros se realizaron bajo luz infrarroja con una cámara de video digital (Sony DCR-SR60, Japón). Se determinó el diámetro de la pupila antes y 30 s después de aplicar el pulso de luz. La velocidad de muestreo fue de 30 imágenes/s. Se adquirieron las imágenes a partir de la grabación de un video digital utilizando el programa OSS Video Decompiler Software (One Stop Soft, New England, USA). El porcentaje de contracción de la pupila se calculó como el porcentaje del área de la pupila a los 30 s del inicio del pulso (estado estacionario) en relación con el tamaño de la pupila dilatada. En una serie de experimentos, se estimuló el ojo inyectado con vehículo o CS y el RP se registró en el ojo contralateral intacto. En otra serie de experimentos, el estímulo se aplicó en el ojo intacto y se registró el ojo contralateral inyectado con vehículo o CS.

15. Determinación de la supresión fótica de la síntesis nocturna de melatonina pineal

Animales inyectados bilateralmente con CS o solución fisiológica se sometieron a un pulso de 20 min de luz blanca (1200 lux) o azul (1000 lux,con máximo de emisión alrededor de los 480 nm) 5 h después de apagarse las luces (es decir, a las 24 h) o se mantuvieron en oscuridad hasta el sacrificio. Las ratas se sacrificaron inmediatamente después del pulso de luz, se extrajo la glándula pineal y se congeló a -80°C. Las glándulas pineales se homogeneizaron en 2 ml de HCl 0,1 M, y la melatonina se extrajo de los homogenatos (a excepción de 300 µl utilizado para determinar la concentración de proteínas) con 5 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó dos veces con 2% de $NaHCO_3$, y agua destilada. Alícuotas de 1,5 ml de la fase orgánica se secaron al vacío y se almacenaron a -20°C hasta la realización del RIA. La recuperación del proceso de extracción fue de 76 ± 5%. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de *buffer* (6 mM de NaN_3, 0,1 M de KH_2P0_4, y 0,1% de gelatina, pH 7,5) y luego se mezclaron con 50 µl de [^{3}H]-melatonina (dpm 20.000-24.000; actividad específica, 38,8 Ci/mmol) y 50 µl de un antisuero de conejo proporcionado amablemente por el Dr. Takashi Matozaki (Laboratory of Biosignal Sciences, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Japón). La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. La separación de las fracciones unida/libre se realizó por el método carbón-dextran, y la radioactividad de los sobrenadantes se midió en un contador de centelleo líquido. Los valores de melatonina se obtuvieron a partir de una curva estándar, cuyo límite de sensibilidad fue de 20 pg por tubo.

16. Determinación de la inducción por luz del gen de expresión temprana c-Fos en los NSQ

La inducción de c-Fos se determinó por inmunohistoquímica. Animales tratados con CS o solución salina en forma bilateral se sometieron a un pulso de luz blanca (1200 lux) de 10

min, 6 h después del apagado de las luces (es decir, a la 1 a.m.) o se mantuvieron en oscuridad hasta el sacrificio. Las ratas se anestesiaron 1 h después de recibir el pulso de luz y se perfundieron intracardíacamente con 100 ml de 0,1 M de PBS seguido de 300 ml de una solución fijadora conteniendo formaldehído al 4% en PBS 0,1 M (pH 7,4). Se extrajeron los cerebros y se sumergieron durante toda la noche en el mismo fijador. Luego, se transfirieron a una solución al 30% de sacarosa-PBS durante 48 horas. Se realizaron secciones coronales de 40 µm que se recolectaron en PBS 0,1 M y se lavaron con 0,4% Triton X-100 en PBS 0,01M (PBS-T). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% y NHS al 2% en PBS-T durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron por 72 h a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti c-Fos en una dilución 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Luego, se lavaron con PBS-T y se incubaron durante 2 h con un anticuerpo secundario universal biotinilado (1:200, Vector Labs). La reacción se visualizó con el complejo avidina-biotina y el cromógeno VIP (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs).

17. Determinación de los ritmos de actividad en pacientes con glaucoma

17. 1 Reclutamiento de los participantes

La población estudiada consistió en 9 pacientes de entre 60 y 80 años, edad promedio: 67 ± 3 años, sin enfermedades neurológicas ni disfunción motora, reclutados en el Servicio de Glaucoma del Hospital Oftalmológico “Santa Lucía”. Todos los pacientes presentaron un diagnóstico de glaucoma de ángulo abierto bilateral con más de 10 años de evolución, un disco óptico que evidenció gran deterioro de la relación copa disco (relación copa/disco ≥ 0,8) y un daño avanzado del campo visual. Como grupo control, se incluyeron 6 sujetos sanos, del mismo rango etario (edad promedio: 66 ± 2 años) y sin ninguna patología ocular a los que se les realizó la misma evaluación oftalmológica que a los pacientes con glaucoma. A

todos los participantes se les realizó una campimetría computarizada con un campímetro Humphrey Field Analyzer II 750 (Carl Zeiss Meditec) mediante la utilización de un programa central 24-2 (SITA, Swedish Interactive Thresholding Algorithm). Se consideró daño avanzado cuando el patrón de desviación estándar estaba fuera del 95% del límite de normalidad, con una prueba del hemicampo para glaucoma también fuera de límites normales ($p < 0,05$). Sólo se incluyeron campos visuales confiables (pérdidas de fijación, falsos positivos y falsos negativos menor del 25%). Para evitar el "efecto aprendizaje" de la perimetría se realizó, al menos, un segundo examen de campo visual a cada paciente que se incluyó en el análisis estadístico. Se incluyeron pacientes que presentaron faquias y pseudofaquias. Al momento de iniciar el estudio, se registraron datos demográficos y clínicos de todos los participantes. El protocolo experimental recibió la aprobación del Comité de Docencia e Investigación del Hospital Oftalmológico “Santa Lucía”. Todos los participantes dieron consentimiento informado por escrito.

17. 2 Registro de la actividad en pacientes

La actividad se registró con un actígrafo de muñeca, ligero y de tamaño pequeño (MicroMini Motionlogger®Actigraph, Ambulatory Monitoring, Inc., Ardsley, NY, USA). Todos los participantes utilizaron el actígrafo en la muñeca de la mano no hábil, en forma ininterrumpida durante 15 a 20 días. Este instrumento mide el número de movimientos corporales por arriba de un umbral de intensidad, registra la cantidad de movimientos cada 1 min y permite almacenar la información. Los registros de actividad se extrajeron y analizaron con el software Action-W2 (Ambulatory Monitoring, Inc., Ardsley, NY, USA). Para diferenciar el periodo de “sueño” del de “vigilia” se utilizó el algoritmo de Cole-Kripke (Cole y Kripke, 1988). El método descripto por Cole y Kripke evalúa el número de movimientos de

la muñeca en el minuto analizado, más un valor ponderado de movimientos en los 4 minutos previos y los 2 minutos posteriores.

18. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951), usando BSA como estándar.

19. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los tests de Student para la comparación entre dos grupos experimentales o ANOVA seguido de test de Tukey o de Dunnett, para comparaciones múltiples, según se indica en cada caso.

1. Estudio de la síntesis de PGs en la retina del hámster desde una perspectiva cronobiológica

Como se mencionó en la Introducción, diversas evidencias experimentales sugieren la participación de las PGs en la fisiopatología retiniana, así como en el procesamiento de la información fótica local. La primera serie de experimentos que se describirá a continuación tuvo por objeto el estudio de la síntesis de PGs en la retina del hámster dorado, desde una perspectiva cronobiológica. Los cambios diarios en la liberación de PGE2 y PGF2α en retinas de hámsteres sacrificados a diferentes intervalos a lo largo del ciclo de 24 h se representan en las Figuras 14 y 15, respectivamente. Ambos parámetros variaron significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad, con valores máximos a las 24:00 h.

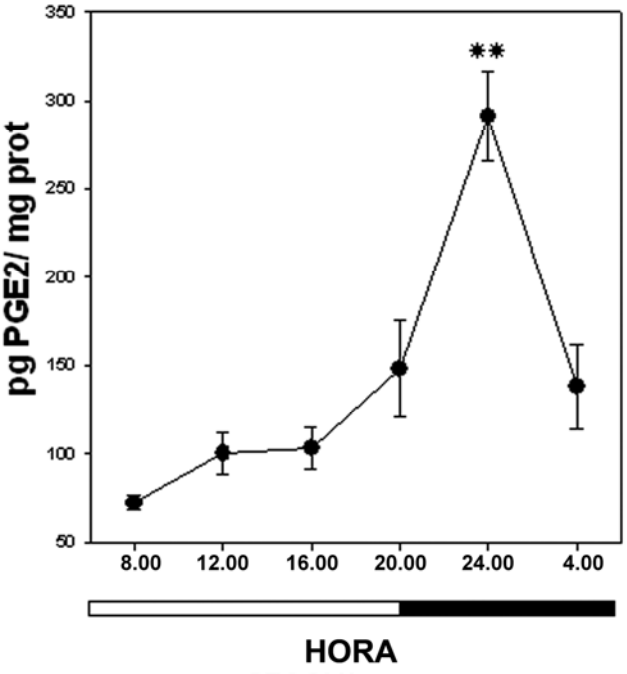

Figura 14. Liberación de PGE2 en retinas de hámsteres mantenidos en L:D y sacrificados en los horarios indicados. Se incubaron las retinas y los niveles de PGE2 se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. La liberación de PGE2 varió significativamente a lo largo del ciclo de 24 h ($p < 0,01$ ANOVA). Este parámetro fue significativamente mayor a las 24.00 h que en todos los otros intervalos. Los datos representan la media ± EE (n = 10 animales por grupo). **$p < 0,01$, test de Tukey.

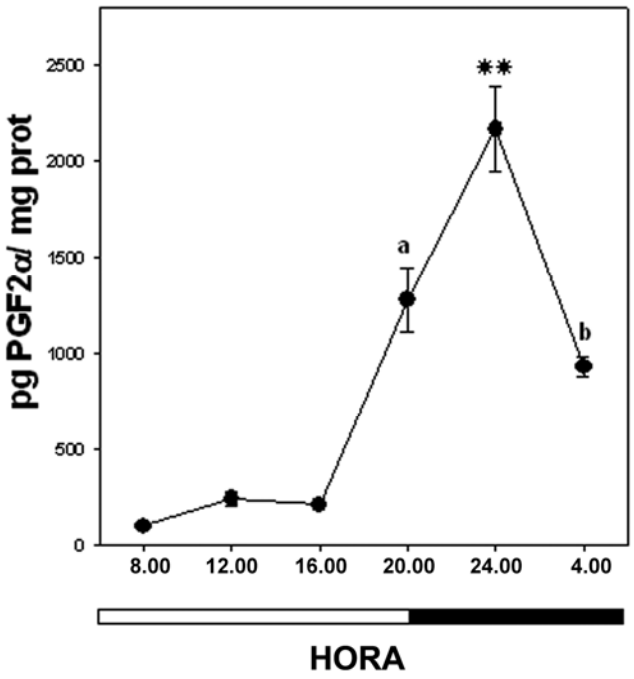

Figura 15. Liberación de PGF2α en retinas de hámsteres mantenidos en L:D y sacrificados en los horarios indicados. Se incubaron las retinas y los niveles de PGF2α se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. La liberación de PGF2α varió significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad ($p < 0,01$, ANOVA), con un máximo a las 24.00 h (**$p < 0,01$ vs. todos los otros horarios). A las 20.00 h, este parámetro difirió significativamente (a: $p < 0,01$) de todos los otros intervalos, a excepción de las 04.00 h. El valor a las 04.00 h difirió de todos los otros valores, a excepción de las 20.00 h (b: $p < 0,01$). Los datos representan la media ± EE (n = 10 animales por grupo), test de Tukey.

Cuando los animales se expusieron a oscuridad constante (D:D) durante 48 h antes del experimento y se sacrificaron al mediodía o la medianoche subjetivos, la liberación de ambas PGs fue significativamente mayor a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo (Figura 16).

La Figura 17 muestra *Western blots* representativos para COX-1 en retinas de hámsteres sacrificados a mediodía o medianoche (L:D), o al mediodía o medianoche subjetivos (D:D).

Se identificaron bandas de ~ 72 kDa en todas las muestras, de acuerdo con la masa molecular descripta para COX-1 en otros tejidos.

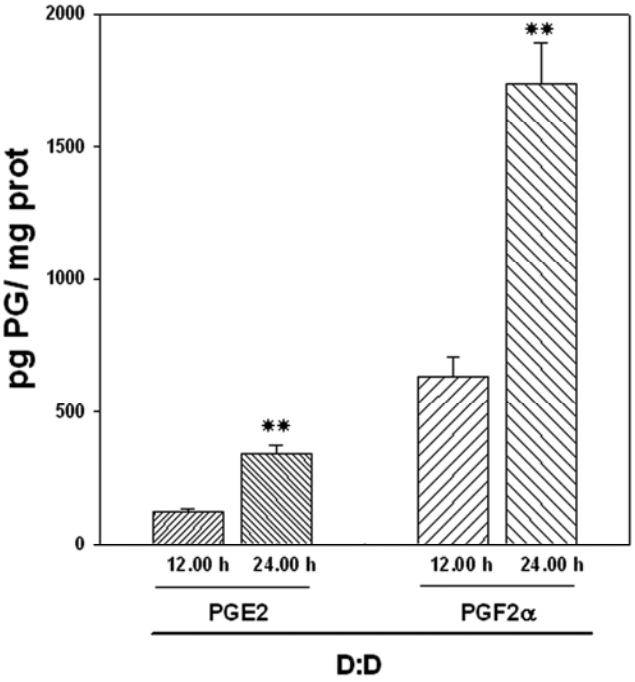

Figura 16. Liberación de PGE2 y PGF2α en retinas de hámsteres mantenidos en D:D y sacrificados a mediodía o a medianoche subjetivos. La liberación de PGE2 y PGF2α fue significativamente mayor a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo. Los datos representan la media ± EE (n = 10 animales por grupo). **p < 0,01 vs. los valores del mediodía subjetivo, test de Student.

El análisis densitométrico de las bandas (que se muestra en el panel derecho de la Figura 17) indicó diferencias significativas en los niveles de COX-1 entre el mediodía y la medianoche, así como entre el mediodía y la medianoche subjetivos. Los niveles de COX-1 fueron mayores al mediodía subjetivo que al mediodía y a la medianoche subjetiva (D:D) que a la medianoche (L:D). Se realizó un análisis similar para determinar los niveles retinianos de COX-2 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. En condiciones de L:D o D:D, no se observaron variaciones significativas en los niveles de COX-2 entre los distintos horarios.

Con el fin de determinar la localización retiniana de COX-1 y COX-2 se realizó un análisis inmunohistoquímico. En la retina de animales sacrificados al mediodía, la inmunorreactividad para COX-1 se localizó en células de la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa nuclear interna (CNI) (Figura 19A).

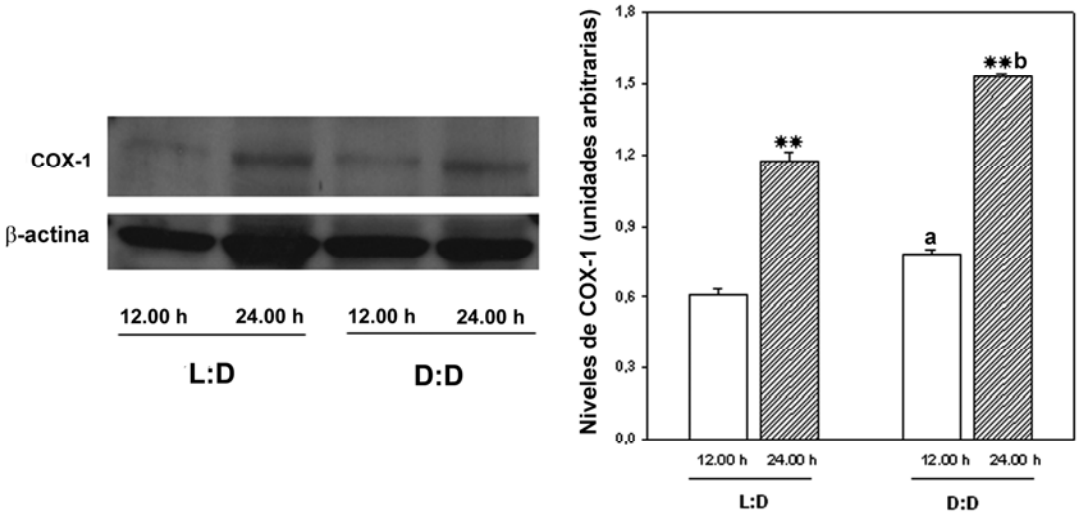

Figura 17. Niveles de COX-1 en la retina del hámster dorado. El panel izquierdo muestra un gel representativo de COX-1 en retinas de hámsteres mantenidos en L:D o D:D y sacrificados en los horarios que se indican. El panel derecho muestra el análisis densitométrico que indicó niveles significativamente mayores de COX-1 a medianoche que a mediodía (L:D) y a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo (D:D). Se representan las medias ± EE (n = 8 animales por grupo). ** $p < 0,01$ en comparación con el mediodía o el mediodía subjetivo, a: $p < 0,01$ vs. mediodía (L:D), b: $p < 0,01$ vs. medianoche (L:D), test de Tukey.

Asimismo, se observó una tinción punteada en la sublámina más interna de la capa plexiforme interna (Figura 19B) y una fuerte tinción punteada en toda la capa plexiforme externa (CPE, Figura 19C). La inmunorreactividad para COX-2 se localizó en la retina interna, principalmente en la CCG. Una inmunorreactividad débil para COX-2 se observó en la CNI (Figura 19D). No se observó inmunomarcación para ninguna de estas isoenzimas en la retina externa, y no se detectaron diferencias significativas en la localización de COX-1 y COX-2 entre animales sacrificados a mediodía o medianoche (datos no mostrados).

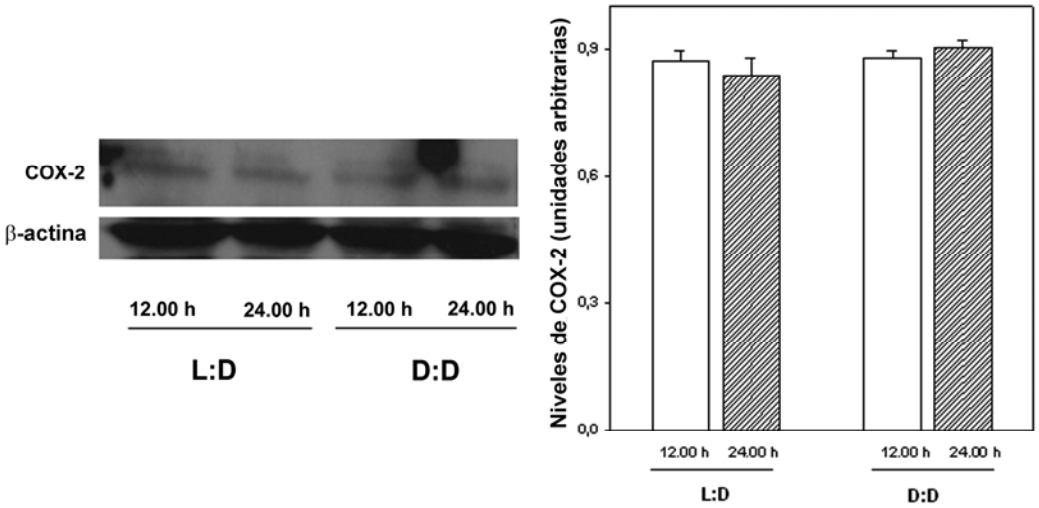

Figura 18. Niveles de COX-2 en la retina del hámster dorado. El panel izquierdo muestra un gel representativo para COX-2 en retinas de hámsteres mantenidos en L:D o D:D y sacrificados en los horarios que se indican. Se detectó una banda de ~ 70 kDa en todas las muestras. Panel derecho: análisis densitométrico de las bandas. No se observaron diferencias significativas entre el mediodía y la medianoche (L:D) o entre el mediodía subjetivo y la medianoche subjetiva (D:D). Se representan las medias ± EE (n = 8 animales por grupo).

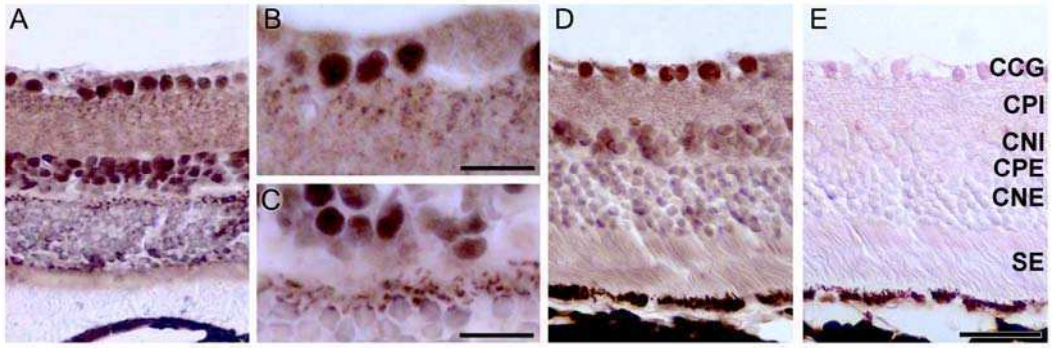

Figura 19. Análisis de la localización de COX-1 y COX-2 en la retina del hámster dorado. Se detectó una fuerte inmunorreactividad para COX-1 en las células de la CCG y la CNI (A) y se observó una tinción punteada intensa en la CPI (B) y la CPE (C). La inmunotinción para COX-2 se muestra en D. La inmunorreactividad positiva se limitó a células de la CCG y se observó una tinción débil también en la CNI. El control negativo sin anticuerpo primario se muestra en E. CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; SE: segmentos externos de los fotorreceptores. Escala: A, D, E = 50 µm, B, C = 25 µm.

Con el fin de analizar la influencia de los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) sobre las variaciones circadianas de la liberación de PGs de la retina, los animales fueron sometidos a una lesión bilateral de estos núcleos. Una semana antes y 25 días después de la cirugía, se

registró el ritmo de actividad locomotora en animales mantenidos en oscuridad constante en jaulas equipadas con un sensor infrarrojo, como se indicó en Materiales y Métodos. Se observó una pérdida del ritmo de actividad locomotora en animales con lesión bilateral de los NSQ, como se muestra en la Figura 20.

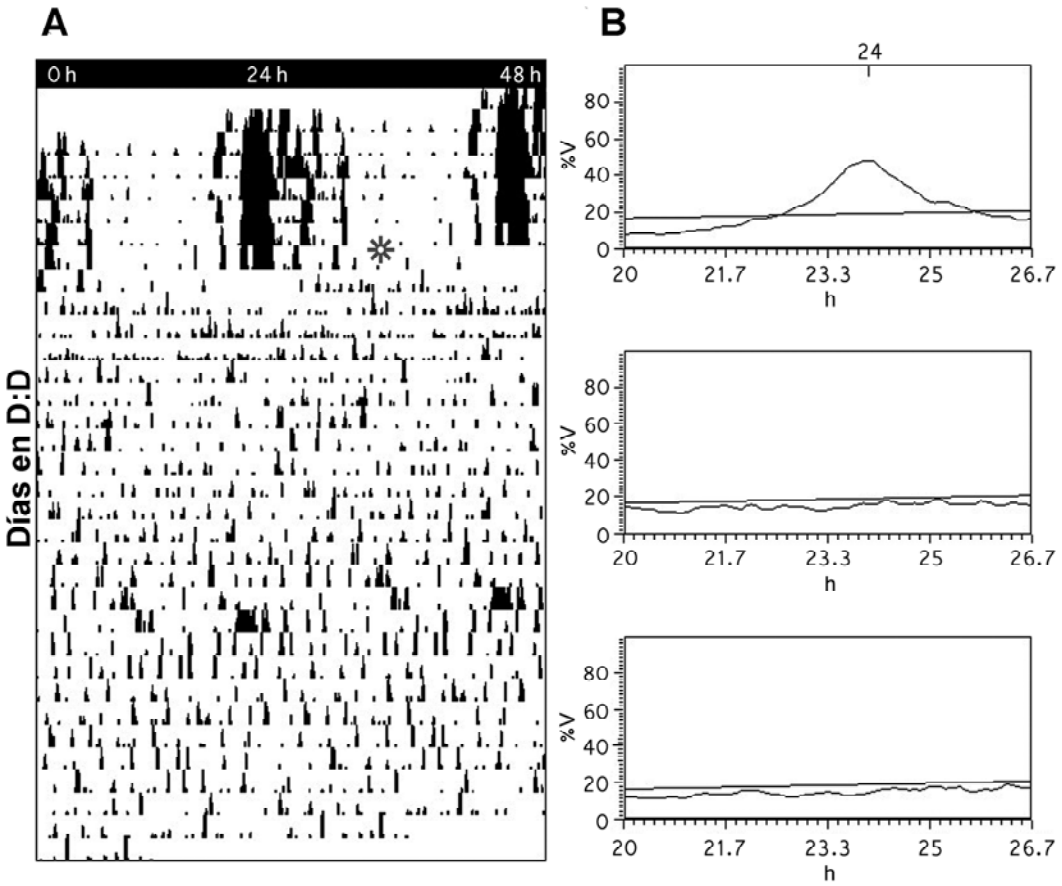

Figura 20. Ritmo de actividad locomotora de animales con lesión bilateral de los NSQ. A: en animales mantenidos en D:D, se observó un ritmo circadiano de libre curso (*free running*) una semana antes de la cirugía, mientras que la lesión de los NSQ (indicada por un asterisco) provocó pérdida de la ritmicidad. B: periodograma de un animal con lesión de los NSQ. Se muestra el % de la varianza en relación con el período del animal antes de la lesión. El panel central muestra la pérdida de periodicidad después de la cirugía que se mantuvo durante varias semanas (panel inferior).

En la Figura 21 se muestra el análisis histológico *post-mortem* que demuestra la eliminación completa de los NSQ en los animales lesionados. Animales con lesión de los NSQ se sacrificaron al mediodía o medianoche subjetivos y se analizó la liberación retiniana de PGE2 y PGF2α.

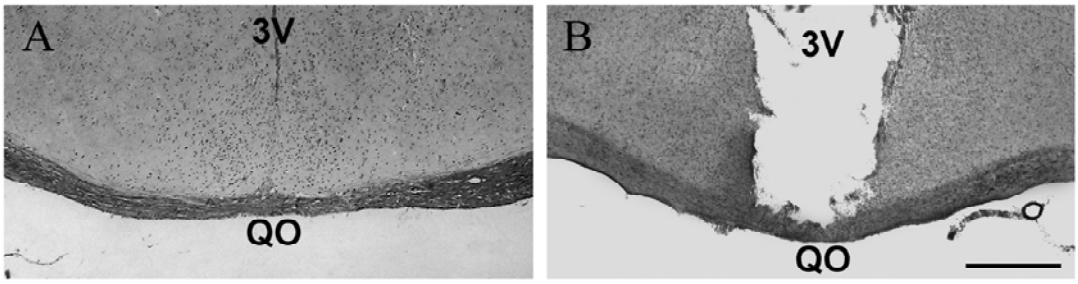

Figura 21. Análisis morfológico *post-mortem* de los animales con lesión de los NSQ. Se muestran microfotografías representativas de secciones coronales con tinción de Klüver-Barrera en un animal con tratamiento simulado (A) y un animal lesionado (B). En los animales control, se observaron núcleos bilaterales intactos por encima del quiasma óptico, en tanto que en animales lesionados se observó ausencia de los NSQ, sin afectar la integridad del quiasma óptico. Escala: 500 µm. 3V: tercer ventrículo; QO: quiasma óptico.

En los animales con lesión de los NSQ, los niveles de ambas PGs fueron significativamente mayores a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo, como se muestra en la Figura 22.

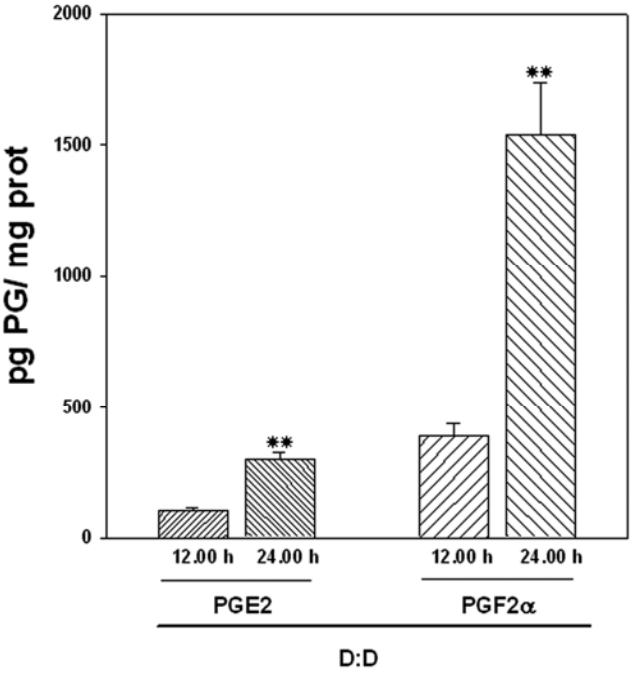

Figura 22. Liberación de PGs en retinas de animales con lesión bilateral de los NSQ, mantenidos en D:D y sacrificados en los intervalos indicados. La liberación de PGE2 y PGF2α fue significativamente mayor a la medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo. Se representan las medias ± EE (n = 7 animales por grupo). ** $p < 0,01$ en comparación con los valores al mediodía subjetivo, test de Student.

Estos resultados sugieren que la liberación de PGE2 y PGF2α en la retina de hámster está regulada por un reloj circadiano independiente de los NSQ, presumiblemente localizado en la retina interna.

2. Estudio de las variaciones circadianas de proteínas CLOCK y BMAL1 en la retina del hámster dorado

En la Figura 23 se representan los niveles nucleares y citoplasmáticos de la proteína CLOCK en retinas de animales sacrificados a diferentes intervalos a lo largo del ciclo de 24 h. Se identificaron bandas de ~ 100 kDa en todas las muestras, de acuerdo con la masa molecular descripta para esta proteína. Los niveles nucleares de CLOCK variaron significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad, con valores mayores en la fase diurna respecto a la medianoche. No se observaron diferencias significativas en los niveles citoplasmáticos de esta proteína.

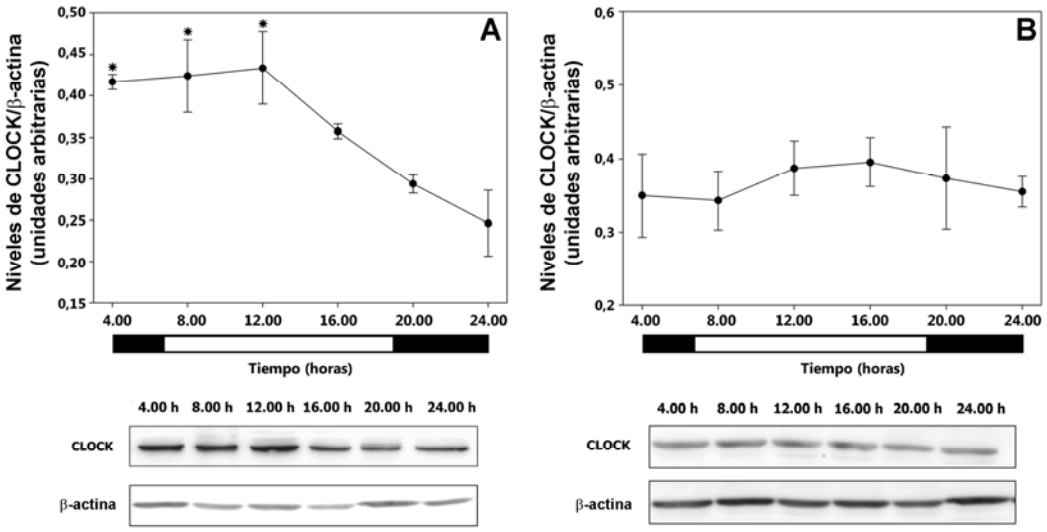

Figure 23. Niveles de CLOCK en retinas de hámsteres mantenidos en L:D y sacrificados en los horarios indicados. Panel superior: Resultado del análisis densitométrico de los niveles de CLOCK determinados por *Western blot* en fracciones nucleares de retinas de animales sacrificados en los horarios indicados (A). Los niveles nucleares de CLOCK fueron significativamente mayores en la fase de luz que a la medianoche. No se observaron variaciones diarias en los niveles citoplasmáticos de esta proteína (B). Se representan las medias ± EE (n = 5 animales / grupo). * $p < 0,05$ en comparación con el valor de las 24.00 h, ANOVA, test de Tukey. Panel inferior: *Western blot* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

En la Figura 24 se representan los niveles nucleares y citoplasmáticos de BMAL1 en retinas de animales sacrificados a diferentes intervalos a lo largo del ciclo de 24 h. Se identificaron bandas de ~ 68 kDa en todas las muestras, de acuerdo con la masa molecular descripta para BMAL1. Análogamente a lo observado para CLOCK, los niveles nucleares de esta proteína fueron mayores en la fase diurna que a la medianoche, en tanto que los niveles citoplasmáticos de BMAL1 no variaron significativamente en función de la hora del sacrificio.

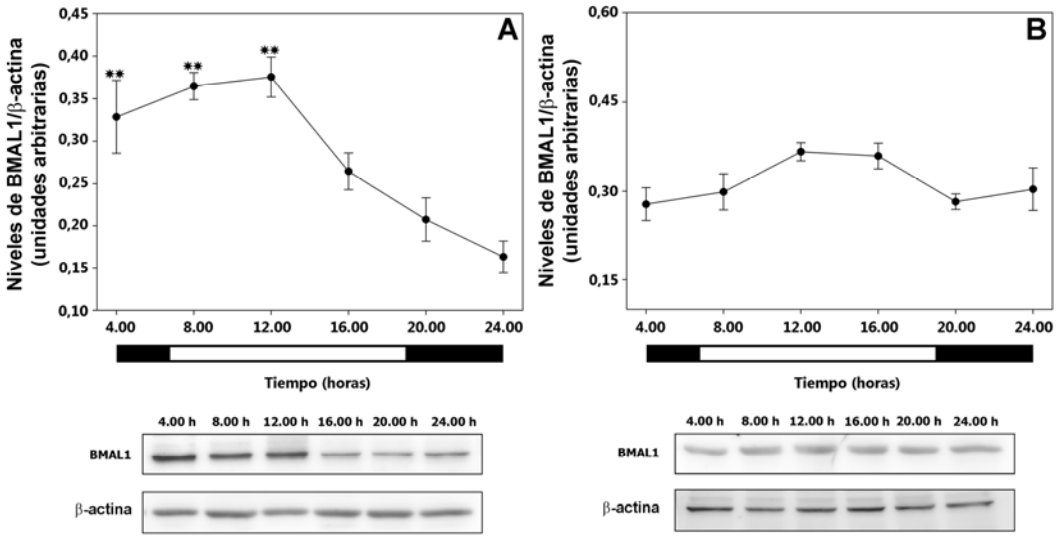

Figure 24. Niveles de BMAL1 en retinas de hámsteres mantenidos en L:D y sacrificados en los horarios indicados. Panel superior: Resultado del análisis densitométrico de los niveles de BMAL1 determinados por *Western blot* en fracciones nucleares de retinas de animales sacrificados en los horarios indicados (A). Los niveles nucleares de BMAL1 fueron significativamente mayores en la fase de luz que a la mdianoche. No se observaron variaciones diarias en los niveles citoplasmáticos de esta proteína (B). Se representan las medias ± EE (n = 5 animales / grupo). ** $p < 0,01$ en comparación con el valor de las 24.00 h, ANOVA, test de Tukey. Panel inferior: *Western blot* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

A continuación, se analizaron los niveles nucleares y citoplasmáticos de CLOCK en retinas de animales expuestos a oscuridad constante durante 48 h antes del sacrificio y sacrificados al mediodía o medianoche subjetivos (Figura 25). No se observaron diferencias entre ambos intervalos en los niveles citoplasmáticos de CLOCK, en tanto que los niveles nucleares de

esta proteína fueron significativamente mayores a mediodía subjetivo que a medianoche subjetiva.

Se realizó un análisis similar para examinar los niveles de la proteína BMAL1 y los resultados se representan en la Figura 26.

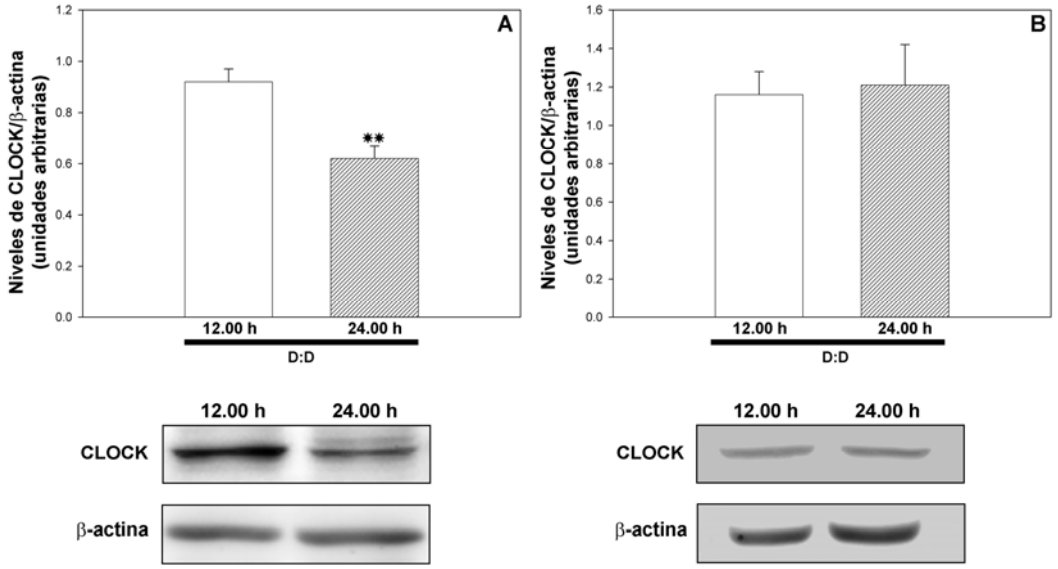

Figure 25. Niveles de CLOCK en retinas de hámsteres mantenidos en D:D. Panel superior: Análisis densitométrico de los niveles de CLOCK determinados por *Western blot* en fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B) de retinas de animales sacrificados a mediodía o medianoche subjetivos. Los niveles nucleares de CLOCK fueron significativamente mayores a mediodía subjetivo que a medianoche subjetiva, en tanto que no se observaron cambios diarios en los niveles citoplasmáticos de esta proteína. Se representan las medias ± EE (n = 5 animales / grupo). ** $p < 0,01$, test de Student. Panel inferior: *Western blot* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

Se observó un perfil temporal similar para BMAL1 que para CLOCK; también en este caso, los niveles citoplasmáticos no difirieron entre el mediodía y la medianoche subjetivos, en tanto que los niveles nucleares fueron significativamente mayores a mediodía subjetivo que a medianoche subjetiva.

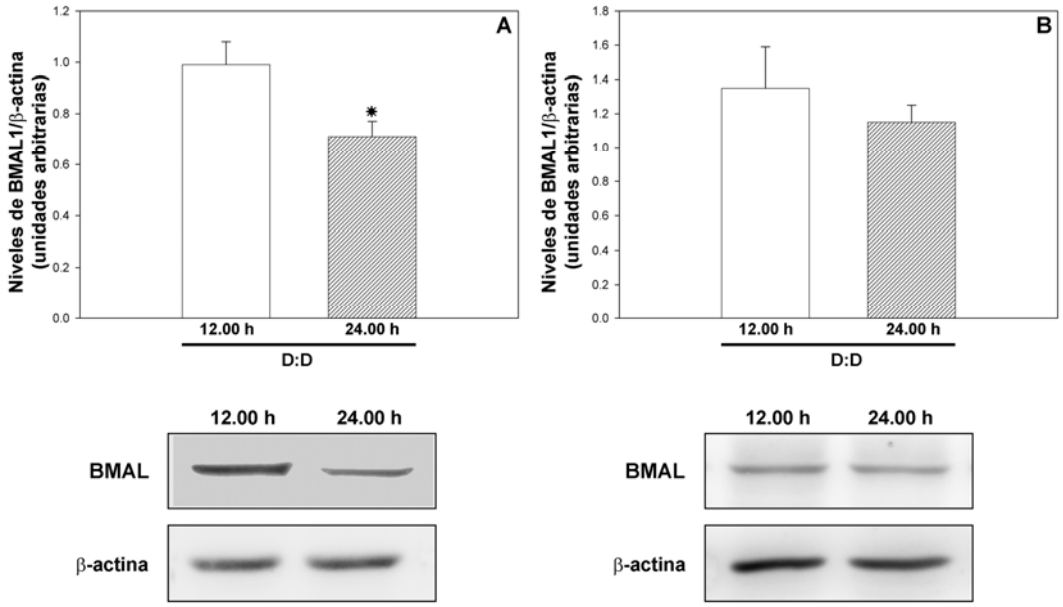

Figure 26. Niveles de BMAL1 en retinas de hámsteres mantenidos en D:D. Panel superior: Análisis densitométrico de los niveles de BMAL1 determinados por *Western blot* en fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B) de retinas de animales sacrificados a mediodía o medianoche subjetivos. Los niveles nucleares de BMAL1 fueron significativamente mayores a mediodía subjetivo que a medianoche subjetiva, en tanto que no se observaron cambios diarios en los niveles citoplasmáticos de esta proteína. Se representan las medias ± EE (n = 5 animales / grupo). * $p < 0,05$, test de Student. Panel inferior: *Western blots* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

A continuación, se realizó un estudio inmunohistoquímico con el objeto de identificar la localización retiniana de estas proteínas. En animales sacrificados a mediodía, la proteína CLOCK se localizó exclusivamente en la CCG (Figura 27). No se observaron diferencias en la localización retiniana de CLOCK en retinas de animales sacrificados a medianoche (datos no mostrados).

La Figura 28 muestra el estudio de la localización retiniana de la proteína BMAL1. La inmunomarcación para BMAL1 se localizó exclusivamente en la CCG. Tampoco en este caso se observaron diferencias en la localización de la proteína en función de la hora del sacrificio (datos no mostrados).

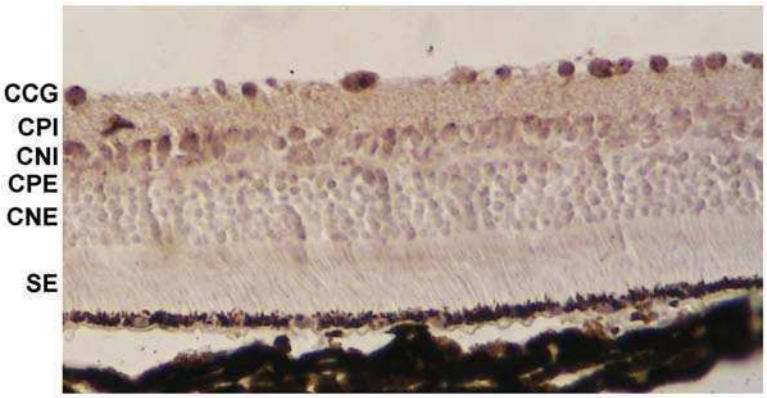

Figura 27. Localización de CLOCK en la retina del hámster dorado. La presencia de CLOCK sólo se detectó en la capa de células ganglionares. Se obtuvieron resultados similares en otros tres animales. CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa.

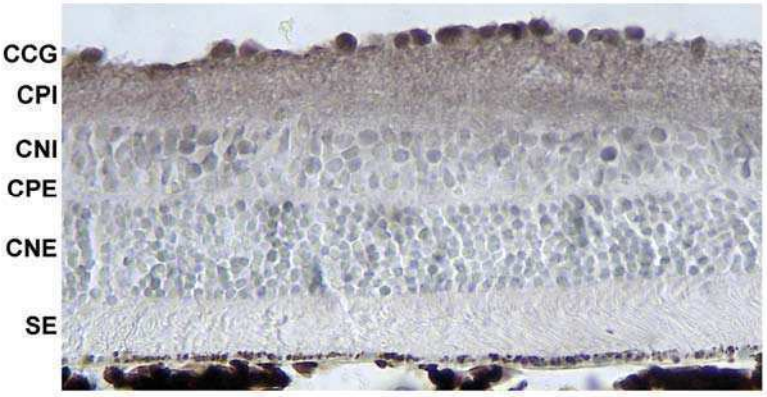

Figura 28. Localización de BMAL1 en la retina del hámster dorado. La presencia de BMAL1 sólo se detectó en la capa de células ganglionares. Se obtuvieron resultados similares en otros tres animales. CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa.

Con el objeto de examinar la influencia de los NSQ sobre las variaciones diarias en los niveles de las proteínas CLOCK y BMAL1, se examinó el efecto de una lesión bilateral de estos núcleos sobre los niveles nucleares y citoplasmáticos de ambas proteínas. El control de la lesión de los NSQ se realizó, como ya se describió, a través de la pérdida del ritmo de

actividad locomotora y el estudio histológico *post-mortem* (Figuras 20 y 21, respectivamente). En animales con lesión de los NSQ expuestos a oscuridad constante y sacrificados a mediodía o medianoche subjetivos, no se observaron diferencias significativas en los niveles nucleares o citoplasmáticos de CLOCK (Figura 29), ni en los niveles citoplasmáticos de BMAL1, en tanto que las diferencias entre el mediodía y la medianoche subjetivas en los niveles nucleares de BMAL1 persistieron (Figura 30).

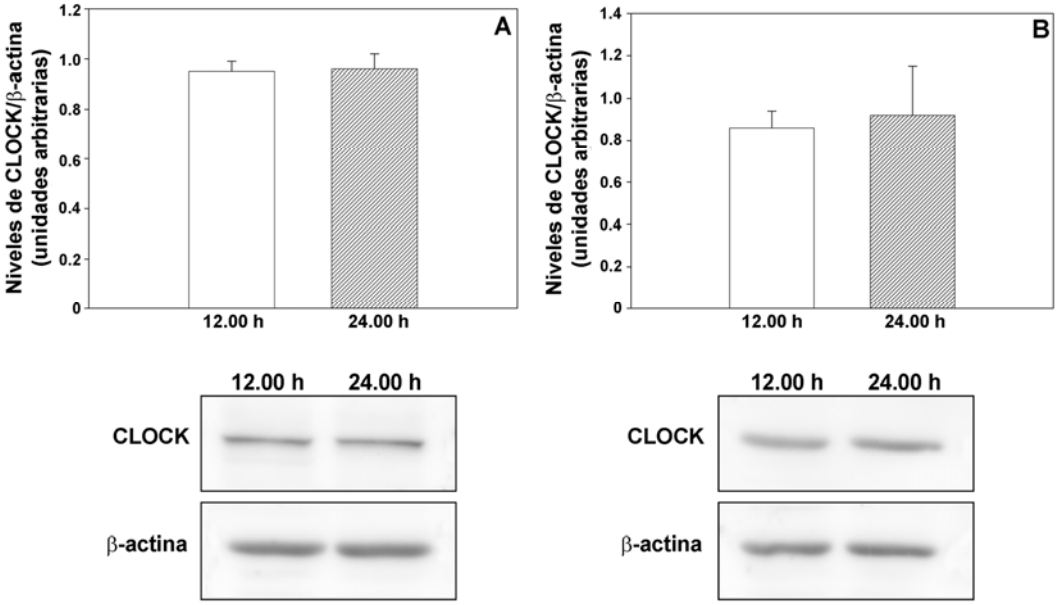

Figura 29. Niveles nucleares y citoplasmáticos de CLOCK en retinas de animales con lesión bilateral de los NSQ y sacrificados al mediodía o la medianoche subjetivos (D:D). Panel superior: Análisis densitométrico de los niveles de CLOCK determinados por *Western blot* en fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B) de retinas de animales sacrificados a mediodía o medianoche subjetivos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de esta proteína entre el mediodía subjetivo y la medianoche subjetiva. Se representan las medias ± EE (n = 8 animales / grupo). Panel inferior: *Western blot* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

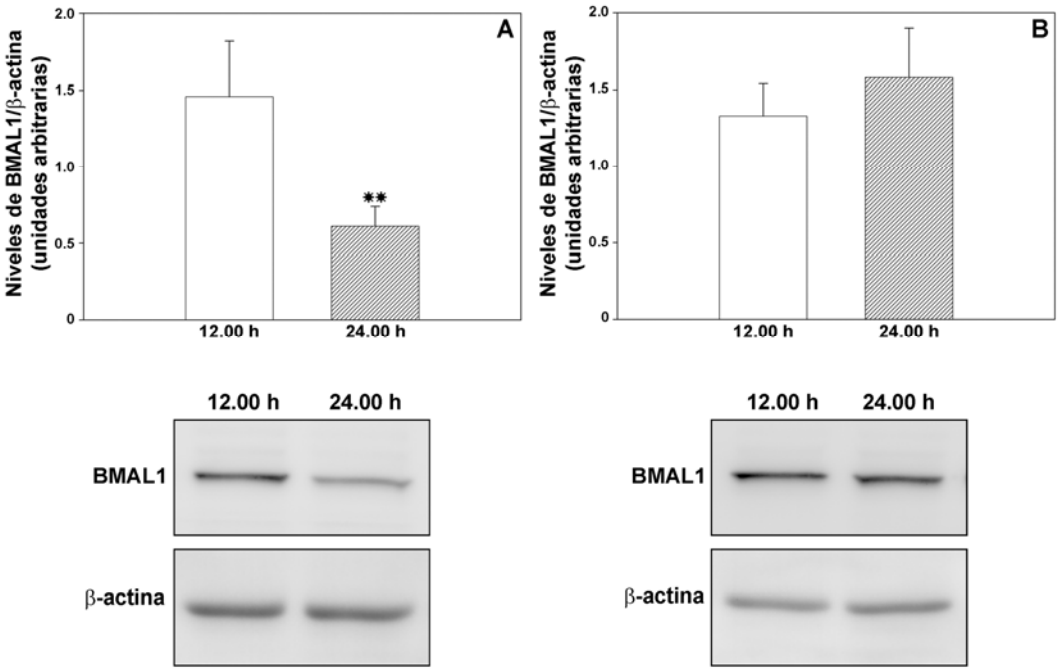

Figura 30. Niveles nucleares y citoplasmáticos de BMAL1 en retinas de animales con lesión bilateral de los NSQ, y sacrificados al mediodía o la medianoche subjetivos (D:D). Panel superior: Análisis densitométrico de los niveles de BMAL1 determinados por *Western blot* en fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B) de retinas de animales sacrificados a mediodía o medianoche subjetivos. Los niveles nucleares de BMAL1 fueron significativamente mayores a mediodía subjetivo que a medianoche subjetiva, en tanto que los niveles citoplasmáticos no variaron entre ambos horarios. Se representan las medias ± EE (n = 8 animales / grupo) ** $p < 0,01$, test de Student. Panel inferior: *Western blot* representativos de las fracciones nucleares (A) y citoplasmáticas (B).

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de variaciones circadianas significativas en los niveles nucleares de BMAL1, que no dependieron del ciclo de luz-oscuridad, ni de los NSQ. En cambio, los niveles de CLOCK variaron significativamente en forma circadiana, pero estas variaciones no fueron evidentes en ausencia de los NSQ. Asimismo, ambas proteínas se localizaron exclusivamente en las células ganglionares de la retina (CGRs) del hámster dorado.

3. Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma en ratas

El objetivo de la serie de experimentos que se describirá a continuación, fue desarrollar un modelo de glaucoma experimental en ratas a través de la administración de CS en la cámara

anterior del ojo. Para ello, se inyectaron animales con diferentes concentraciones de CS en un ojo y vehículo en el ojo contralateral y se determinó la PIO en ambos ojos de cada animal 24 h después de la inyección. La Figura 31 muestra los valores de PIO de los ojos inyectados con vehículo o CS (10, 20 ó 40 %). Se observó un aumento leve pero no significativo de la PIO en los ojos inyectados con 10 ó 20 % de CS, mientras que la inyección con CS al 40% aumentó significativamente este parámetro.

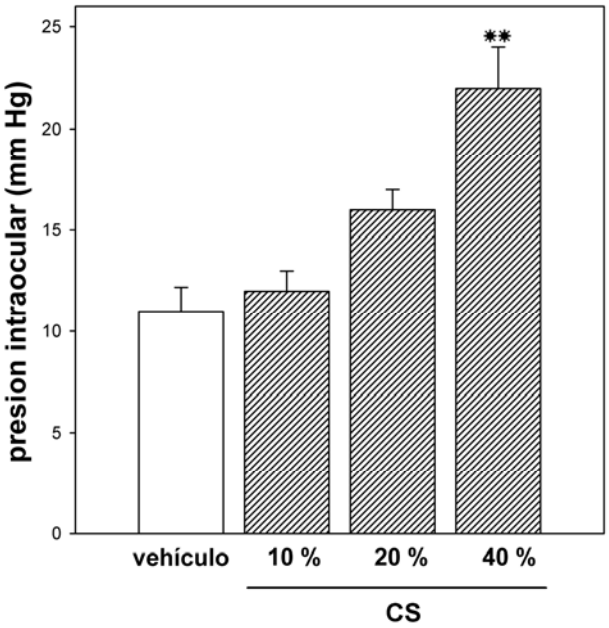

Figura 31. Efecto de una única inyección intracameral de CS sobre la PIO en ratas. Los ojos se inyectaron con vehículo o CS (10 - 40 %), 24 h antes de la determinación de la PIO. Se observó un aumento significativo de este parámetro en los ojos inyectados con 40 (pero no con 10 ó 20) % de CS. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

A fin de analizar el curso temporal del efecto del CS sobre la PIO, los animales se inyectaron con una única inyección de CS al 40 % en un ojo, mientras que el ojo contralateral se inyectó con vehículo y se determinó la PIO en ambos ojos antes de la inyección (día 0) y diariamente a partir de 24 h después de la inyección, como se muestra en la Figura 32. La inyección de

CS indujo un aumento de casi el doble de la PIO que duró siete días, mientras que en el octavo día post- inyección, la PIO en los ojos inyectados con CS alcanzó valores control.

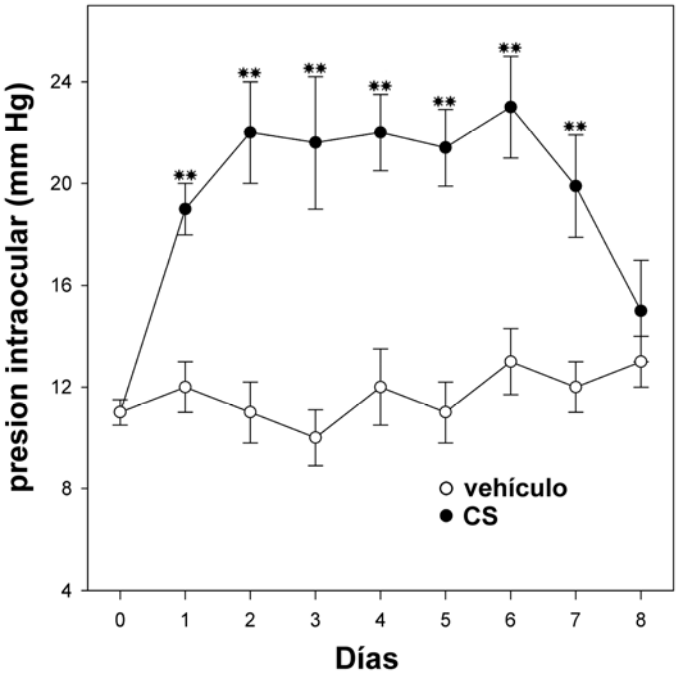

Figura 32. Determinaciones tonométricas de la PIO en ojos tratados con una única inyección intracameral de solución salina (círculos blancos) o CS (círculos negros). Las inyecciones se realizaron en el día 0, y se evaluó la PIO en ambos grupos experimentales todos los días hasta el día 8 post-inyección. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). ** $p < 0,01$ vs. la PIO de ojos inyectados con solución salina en los mismos intervalos después de la inyección, test de Student.

Con el fin de analizar el efecto de la administración crónica de CS sobre la PIO, los animales se inyectaron una vez por semana con CS (en un ojo) y vehículo (en el ojo contralateral). La PIO se determinó a intervalos de 7 días en ambos ojos de cada animal, antes de la nueva inyección. Los valores promedio de PIO de estos animales evaluados semanalmente se muestran en la Figura 33. La PIO de los ojos tratados con CS alcanzó un nivel de estado estacionario que fue significativamente mayor que el de los ojos inyectados con solución salina, y se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas). Tanto en el estudio agudo como crónico, se observó un alto grado de consistencia en los valores de PIO en los

ojos inyectados con CS. Todos los ojos, sin ninguna excepción, respondieron con un aumento de este parámetro luego de la inyección de CS.

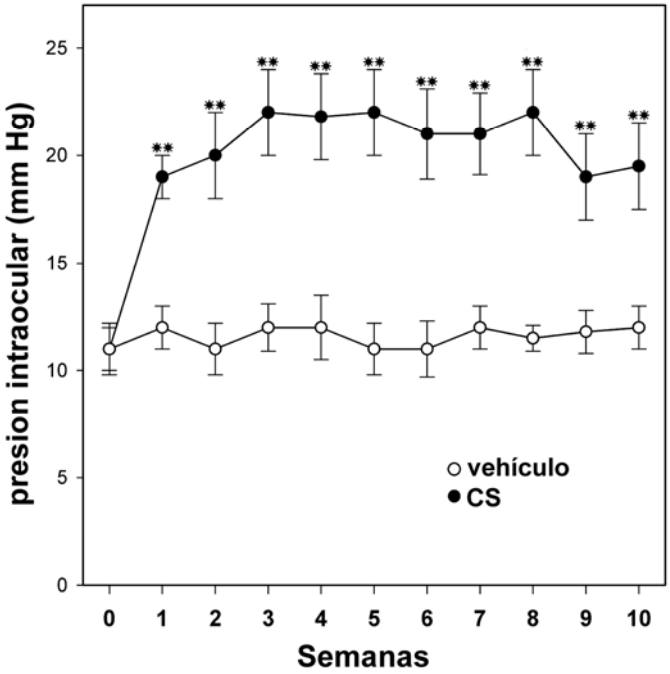

Figura 33. Efecto de la administración crónica de CS sobre la PIO de rata. Se realizaron inyecciones semanales de solución salina (círculos blancos) o CS (círculos negros), después de la evaluación de la PIO. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo). ** $p < 0,01$ vs. los correspondientes valores de PIO de los ojos inyectados con solución salina, test de Student.

El estado funcional de las retinas de los ojos inyectados semanalmente con vehículo o CS se examinó por electrorretinografía escotópica. Las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico de ratas inyectadas con vehículo en un ojo y CS en el ojo contralateral durante 6 semanas se muestra en la Figura 34. En el panel derecho de la misma Figura se muestran registros electrorretinográficos representativos. Tanto la amplitud de la onda a como de la onda b del ERG disminuyeron significativamente en los ojos inyectados con CS respecto a los inyectados con vehículo. Después de 3 semanas de tratamiento con vehículo o CS, no se observaron cambios electrorretinográficos significativos (datos no mostrados).

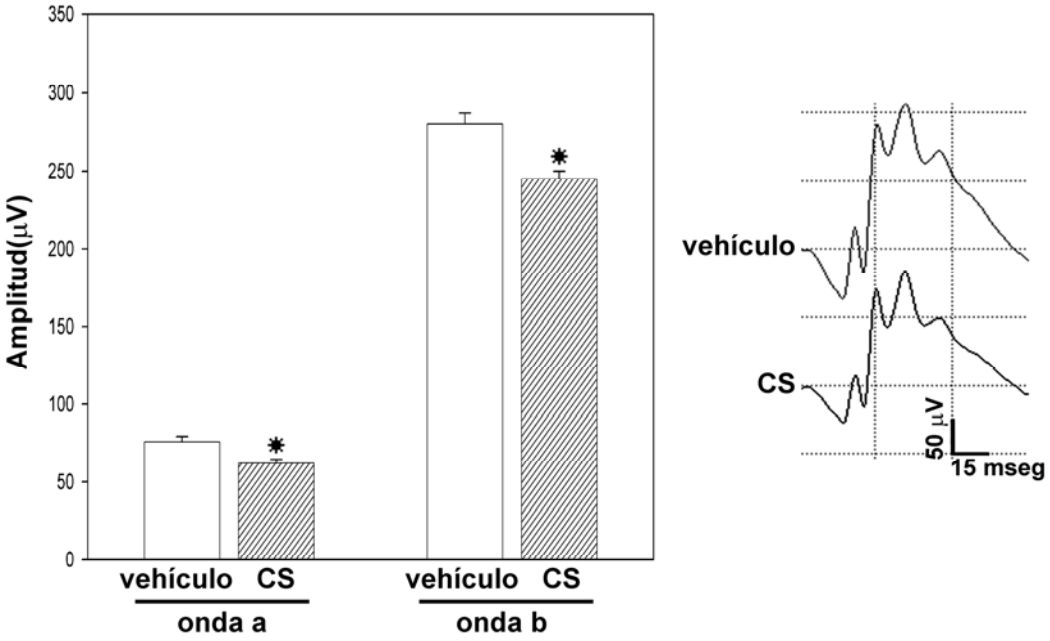

Figura 34. ERG escotópico de ratas inyectadas con vehículo o CS. Los animales se inyectaron semanalmente con CS en un ojo y solución salina en el ojo contralateral durante 6 semanas. El panel izquierdo muestra las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico y en el panel derecho se muestran ERGs representativos de ambos grupos. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b en los ojos inyectados con CS durante 6 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), * $p < 0,05$, test de Student.

Estudios similares se realizaron después de 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS (Figura 35). En estas condiciones, se observó una reducción adicional en la amplitud de las ondas a y b del ERG en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. El tratamiento con CS durante 6 ó 10 semanas no afectó las latencias de la onda a y b en comparación con los ojos inyectados con vehículo.

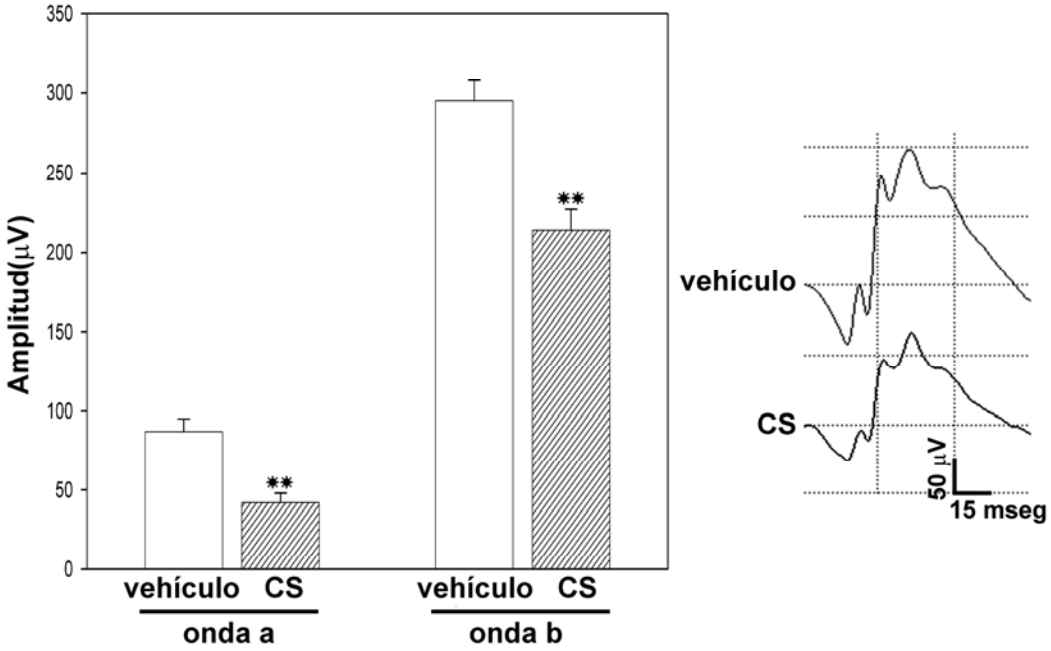

Figura 35. ERG escotópico de ratas inyectadas con vehículo o CS. Los animales fueron inyectados semanalmente con CS en un ojo y solución salina en el ojo contralateral durante 10 semanas. El panel izquierdo muestra las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico y en el panel derecho se muestran ERGs representativos de ambos grupos. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), ** $p < 0,01$ test de Student.

Para evaluar la función de la vía visual, se registraron potenciales visuales evocados (VEPs) por un *flash* de luz, luego de 3, 6 y 10 semanas de hipertensión ocular inducida por inyecciones semanales de CS. Se observó una disminución significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los ojos inyectados con CS durante 6 ó 10 semanas en comparación con los ojos inyectados con vehículo, sin cambios evidentes en las latencias, como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 36. Registros representativos de los VEPs para todos los grupos experimentales se muestran en el panel derecho de la Figura 36. No se observaron cambios en la amplitud del componente N2-P2 del VEP luego de 3 semanas de hipertensión ocular inducida por CS (datos no mostrados). Los ERGs y los VEPs en ojos intactos no difirieron significativamente de los registrados en los ojos inyectados con vehículo a las 3, 6 ó 10 semanas (datos no mostrados).

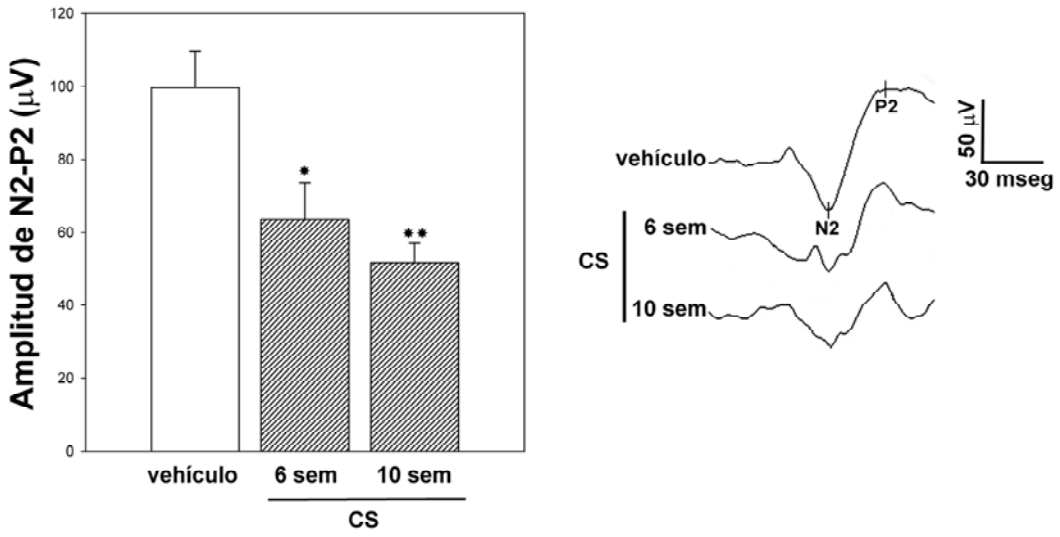

Figura 36. VEPs en ratas inyectadas con vehículo o CS. Los animales se inyectaron semanalmente con CS en un ojo y solución salina en el ojo contralateral durante 6 ó 10 semanas. El panel izquierdo muestra la amplitud promedio del componente N2-P2 y el panel de la derecha muestra registros representativos. Se observó una disminución significativa en este parámetro en los ojos inyectados con CS por 6 ó 10 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

A continuación, se realizó un análisis histológico de la retina y la cabeza del nervio óptico en ojos inyectados con vehículo o CS. Se observaron cambios significativos en ambas estructuras en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. Aunque el espesor total de la retina, la CPI, la CNI y la CNE no difirió entre los ojos inyectados con vehículo o con CS (Tabla III), se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas (Figura 37). El número promedio de células en la CCG/100 μm ± EE del grupo control fue 9,2 ± 0,5 mientras que en los ojos inyectados con CS, este valor fue 5,9 ± 0,7 ($p < 0,01$, n = 5 retinas/grupo). A las 3 ó 6 semanas de tratamiento con vehículo o CS no se observaron alteraciones histológicas en la retina o el nervio óptico (datos no mostrados).

Tabla III. Espesor total de la retina y sus capas.

	10 semanas	
	Vehículo	**CS**
TOTAL	132 ± 7	129 ± 6,8
CPI	32,7 ± 4,6	31,6 ± 4,2
CNI	25 ± 2,8	23,3 ± 2,3
CNE	37,1 ± 3	35,5 ± 4,7

Se midió el espesor total de la retina y sus capas en ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre ambos grupos experimentales. CPI: plexiforme interna, CNI: nuclear interna y CNE nuclear externa

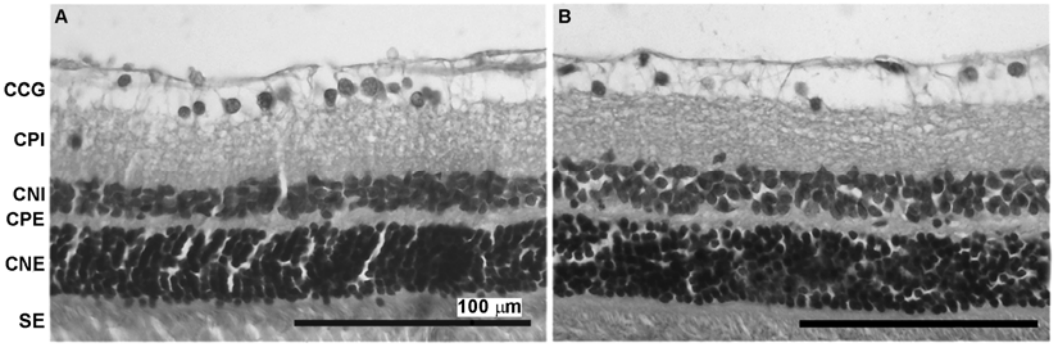

Figura 37. Secciones transversales de retinas de una rata que se inyectó con solución salina en un ojo (A) y con CS en el ojo contralateral durante 10 semanas (B). Nótese la disminución del número de células de la capa de células ganglionares (CCG) en el ojo inyectado con CS. Las capas restantes de la retina mostraron un aspecto similar en ambos grupos. CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna, CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa. Tinción de Hematoxilina y eosina.

Los axones del nervio óptico de los ojos inyectados con vehículo presentaron una forma uniforme (redondeada) y un tamaño variable (Figura 38A). En la cabeza del nervio óptico de los ojos tratados con CS durante 10 semanas se observó una pérdida global de uniformidad e integridad de la tinción (Figura 38). En los ojos tratados con CS (Figura 38B) se observó un aumento en la distancia entre los haces de axones. Los axones individuales del nervio óptico

de los ojos inyectados con CS también mostraron distensiones y distorsiones, y se apartaron de la morfología circular característica de axones normales.

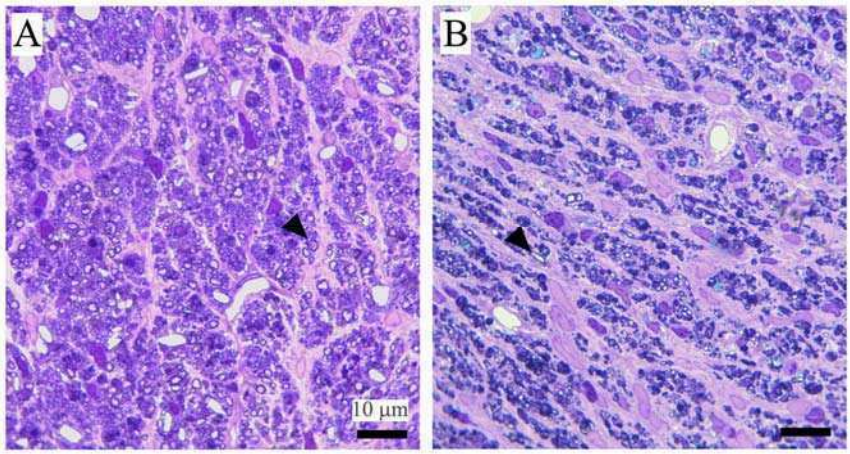

Figura 38. Imágenes de secciones transversales de la cabeza del nervio óptico en un ojo inyectado con vehículo (A) y un ojo inyectado con CS durante 10 semanas (B). Nótese la homogeneidad de la tinción en el nervio óptico control, que se corresponde con un nervio sano. Los axones individuales mostraron formas uniformes, generalmente redondeadas y empaquetados en forma estrecha formando fibras de un nervio sano (punta de flecha). En el nervio del ojo tratado con CS se observó una tinción de menor densidad de fibras. La apariencia de los axones individuales se caracterizó por la distensión y la distorsión axonal que se apartaba de la morfología circular de axones normales (punta de flecha). Tinción con azul de toluidina.

Para analizar la influencia del diámetro axonal sobre la pérdida de axones inducida por la hipertensión ocular, se comparó el número de axones en tres rangos de diámetro, entre 0,05 a 0,6 µm, en ambos grupos experimentales (Figura 39). En los ojos inyectados con CS durante 10 semanas se observó una pérdida significativa de axones medianos y grandes, pero no de axones de diámetro pequeño.

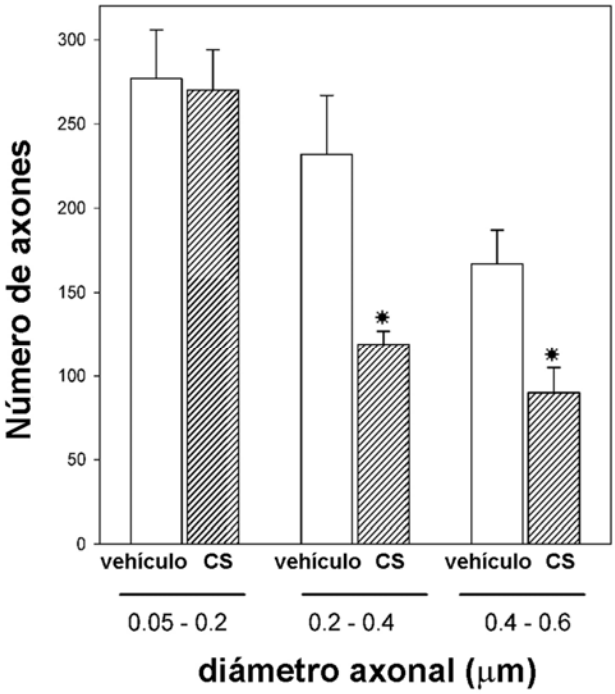

Figura 39. Distribución del diámetro axonal en los ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. En los ojos inyectados con CS se observó una disminución significativa en el número de axones medianos y grandes, pero no de axones pequeños Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo) *p < 0,05, test de Student.

Este conjunto de resultados indica que la administración crónica intracameral de CS reproduce características centrales del glaucoma crónico de ángulo abierto humano y por lo tanto, ésta podría ser una herramienta útil para el estudio de los efectos del glaucoma sobre la fisiología circadiana.

4. Estudio de funciones visuales no formadoras de imagen en el modelo de glaucoma experimental inducido por CS

Se determinaron los niveles de rodopsina en las retinas de ojos inyectados con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas mediante un análisis de *Western blot.* Como se muestra en la Figura 40, se identificaron bandas de ~ 40 kDa en todas las muestras, en concordancia con la masa

molecular descripta para rodopsina por otros autores. Los niveles de rodopsina no variaron significativamente entre los grupos experimentales.

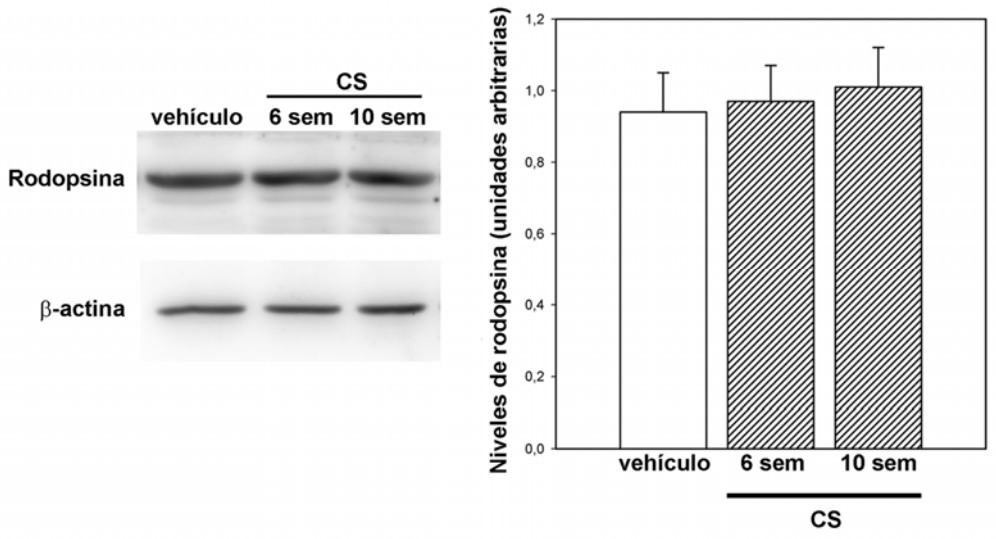

Figura 40. Análisis de los niveles de rodopsina en las retinas de ojos inyectados con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas. El panel izquierdo muestra un gel representativo para rodopsina en retinas de ratas inyectadas con vehículo o CS. Se detectó una banda de ~ 40 kDa en todas las muestras. Panel derecho: análisis densitométrico de las bandas. No se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los grupos experimentales. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo).

Los resultados del análisis por *Western blot* de los niveles de melanopsina en los mismos grupos, se muestra en la Figura 41. En este caso, se identificó una banda inmunorreactiva de ~ 80 kDa, correspondiente a melanopsina glicosilada, de acuerdo a lo descripto por otros autores. El análisis densitométrico de las bandas indicó que los niveles de melanopsina fueron significativamente menores (~ 50%) en las retinas de los ojos inyectados con CS respecto a los inyectados con vehículo durante 10 semanas.

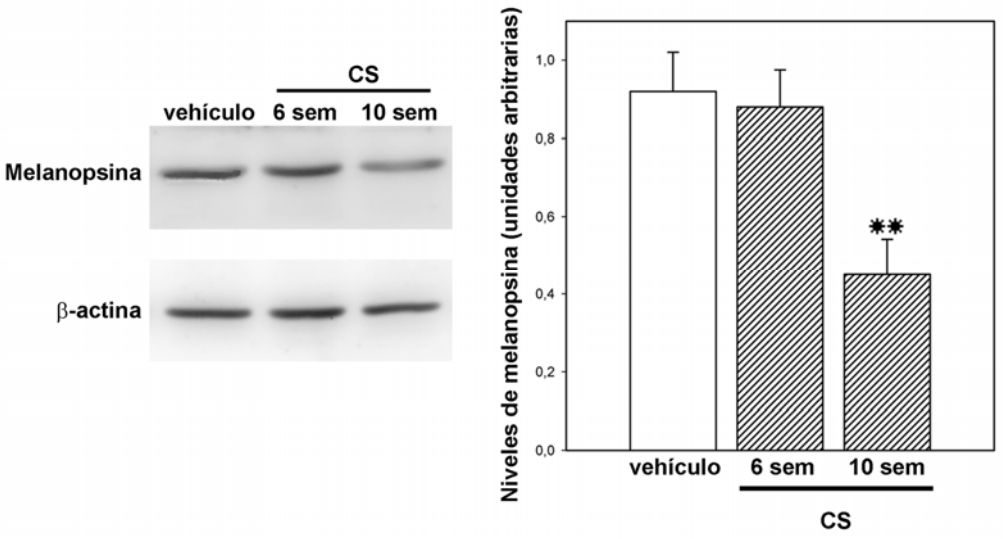

Figura 41. Análisis de los niveles de melanopsina en las retinas de ojos inyectados con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas. En el panel izquierdo se muestran *Western blots* representativos para melanopsina en retinas de ratas inyectadas con vehículo o CS. Se detectó una banda de ~ 80 kDa en todas las muestras. Panel derecho: análisis densitométrico de las bandas. A las 10 semanas de tratamiento con CS se observó una disminución significativa de este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo). ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

En la Figura 42 se representan los niveles de un marcador de CGRs, la proteína Thy-1 en retinas de animales inyectados con vehículo o CS durante los períodos mencionados. Se identificó una banda de ~ 29 kDa que corresponde a Thy-1 de acuerdo a lo descripto en otros trabajos. Se observó una disminución significativa (~ 45%) en los niveles de Thy-1 en las retinas de los ojos inyectados con CS respecto a los inyectados con vehículo durante 10 semanas (Figura 42). A las 6 semanas de tratamiento con vehículo o CS, no se observaron diferencias significativas en los niveles de rodopsina, melanopsina o Thy-1 entre ambos grupos. No se observaron diferencias en estos parámetros entre las retinas de los ojos inyectados con vehículo durante 6 ó 10 semanas (datos no mostrados).

El estudio inmunocitoquímico en retinas control con un anticuerpo anti-melanopsina permitió la inmunomarcación de un número pequeño de CGRs, incluyendo los cuerpos celulares, dendritas y axones, como se muestra en la Figura 43. Se observó una superposición de dendritas inmunopositivas de células adyacentes formando una estructura reticular. Las

dendritas y los axones proximales positivos tuvieron un aspecto de cuentas, mostrando una marcación punteada y densa. Se observaron campos dendríticos de formas y tamaños variados.

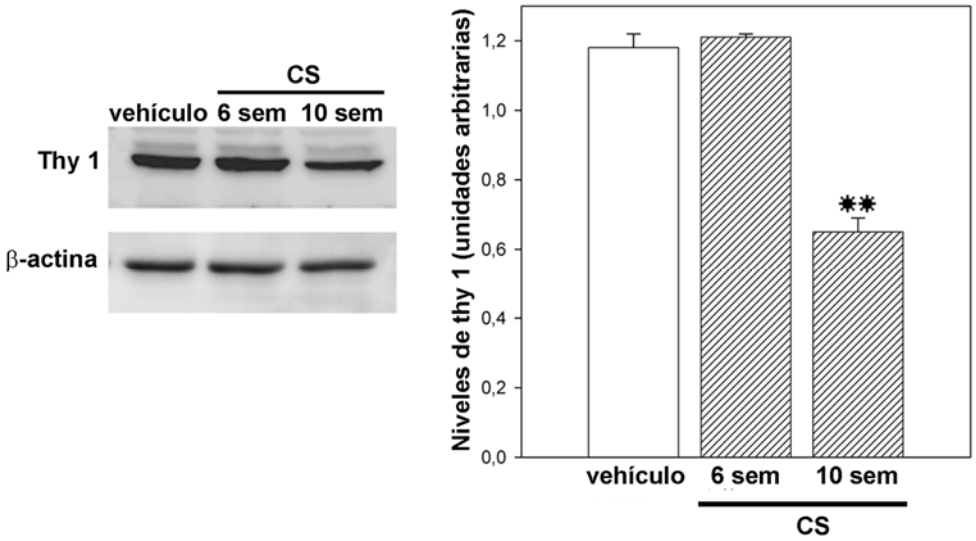

Figura 42. Análisis de los niveles de Thy-1 en las retinas de ojos inyectados con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas. En el panel izquierdo se muestran *Western blots* representativos para Thy-1 en retinas de ratas inyectadas con vehículo o CS. Se detectó una banda de ~ 29 kDa en todas las muestras. Panel derecho: análisis densitométrico de las bandas. A las 10 semanas de tratamiento con CS se observó una disminución significativa de este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo). ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

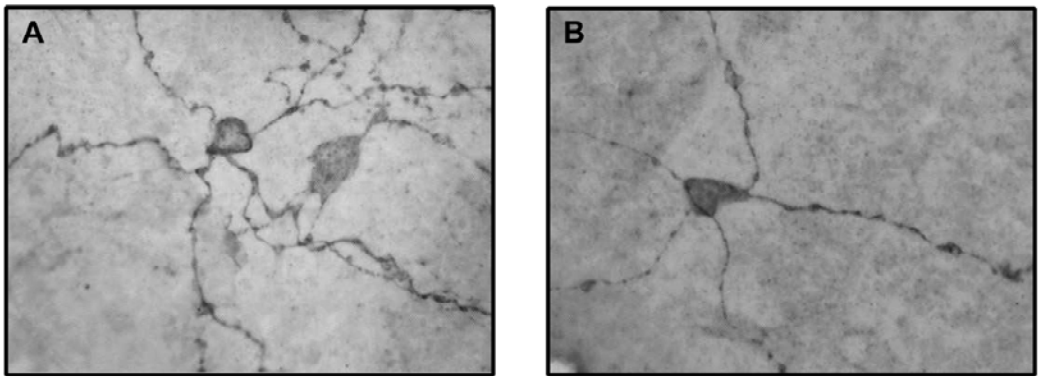

Figura 43. Estudio inmunocitoquímico de CGRs que contienen melanopsina en retinas de ratas control. Nótese el aspecto de rosario de las dendritas en el detalle (B).

En la Figura 44 se muestra una representación esquemática del número de células inmunorreactivas para melanopsina en retinas de ojos inyectados con vehículo o CS durante

10 semanas. Este parámetro fue significativamente mayor en las retinas de los ojos inyectados con vehículo (1374 ± 74 células) que en los inyectados con CS (763 ± 146 células), $p < 0,01$, test de Student, n= 4 ojos / grupo.

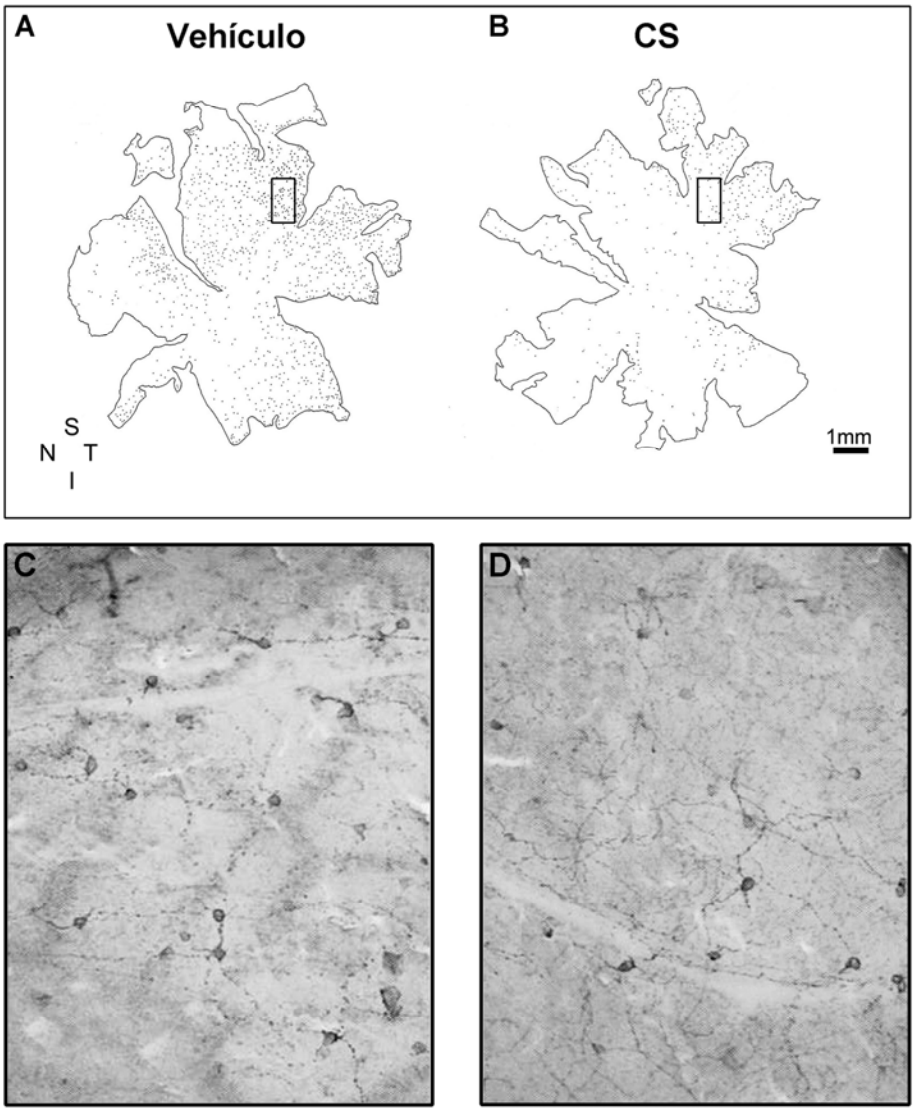

Figura 44. Estudio inmunocitoquímico de melanopsina en retinas de ratas inyectadas con vehículo o CS durante 10 semanas. Panel superior: representación esquemática de la distribución de células melanopsina positivas en retinas control (A). Cada soma celular se representa como un punto de tamaño relativo. Se muestran detalles de la retina inyectada con vehículo (panel C) o CS (panel D). Nótese la alta densidad celular en los cuadrantes superior y temporal. La melanopsina se localizó en el soma celular, en axones y dendritas. Luego de 10 semanas de tratamiento con CS (B, D) se observó un menor número de CGRs positivas para melanopsina respecto a los ojos inyectados con vehículo (A, C). S: superior, I: inferior, N: nasal, T: temporal.

Se marcaron las CGRs que proyectan al Colículo Superior (Cs) mediante la inyección de un trazador retrógrado (Fluorogold). Luego de 10 semanas de tratamiento con CS, se observó una disminución significativa (~ 40%) en el número de CGRs positivas para Fluorogold, tanto en el centro como en la periferia de la retina, respecto al control (Figura 45). No se observaron diferencias significativas en el número de CGRs marcadas con Fluorogold en ojos inyectados con vehículo o CS durante 6 semanas (datos no mostrados).

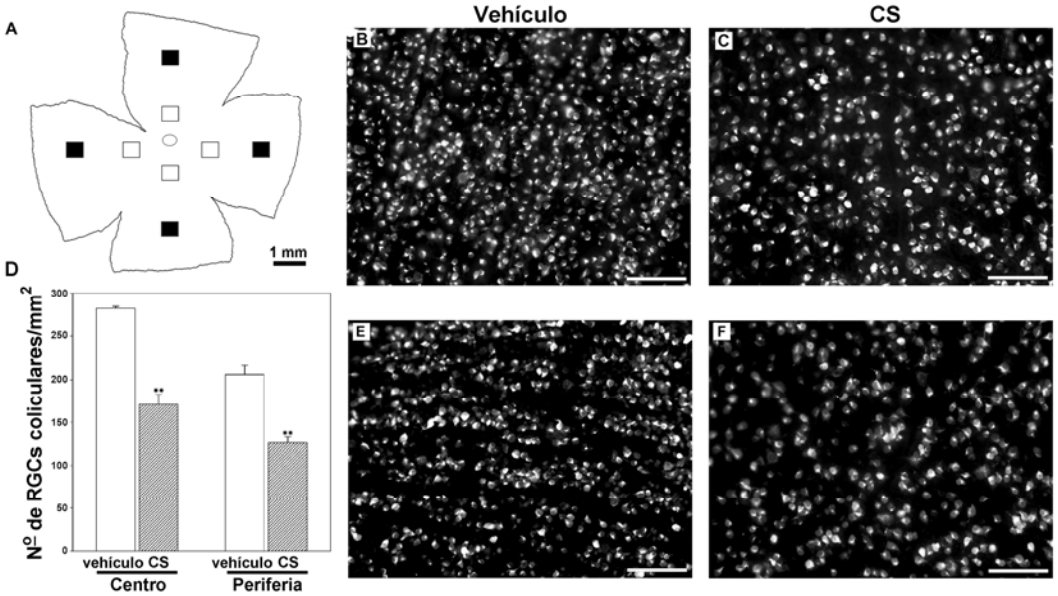

Figura 45. Análisis de CGRs que proyectan al Colículo Superior en retinas de animales inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. Panel A: Representación esquemática de una retina que muestra las regiones analizadas (cuadrados blancos: centro, cuadrados negros: periferia). La intensidad de la marca de Fluorogold en los animales inyectados con vehículo (B y E, retina central y periférica, respectivamente) fue significativamente mayor que en las retinas de ojos inyectados con CS tanto en el centro como en la periferia (C y F, respectivamente). Panel D: Se muestra la media ± EE (n = 4 ojos por grupo), ** $p < 0,01$, test de Student. Escala: (B, C, E and F) = 50 μm.

Se analizó el reflejo pupilar (RP) consensual en animales en los que se inyectó vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas en un ojo, mientras que en ambos casos, el ojo contralateral se mantuvo intacto. Se estimuló con luz el ojo tratado (con vehículo o CS) y se registró la contracción pupilar del ojo intacto, como se indica en Materiales y Métodos. El tratamiento

con CS luego de 6 ó 10 semanas provocó una disminución significativa en la magnitud de la contracción pupilar, como se muestra en la Figura 46.

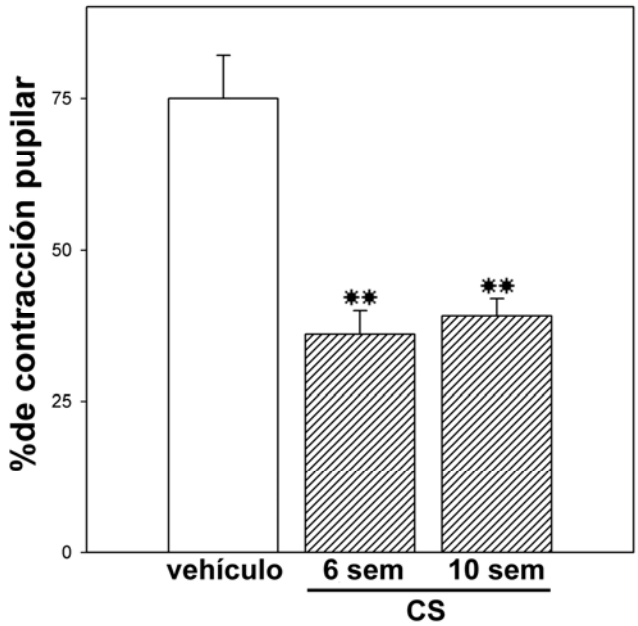

Figura 46. Determinación del RP consensual en animales inyectados en forma unilateral con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas. En todos los casos, se iluminó el ojo tratado (con vehículo o CS) y se registró la contracción pupilar en el ojo intacto. El tratamiento con CS durante 6 ó 10 semanas redujo significativamente el % de contracción de la pupila (respecto al área de la pupila en oscuridad) medida para cada ojo en forma individual. No se observaron diferencias en este parámetro en ojos inyectados con vehículo por 6 ó 10 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 8 ojos / grupo). ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

En cambio, cuando se estimuló con luz el ojo intacto y la contracción pupilar se evaluó en el ojo inyectado con vehículo o CS, no se observaron diferencias en la magnitud de este parámetro entre los grupos experimentales (Figura 47).

Con el objeto de analizar la supresión de la síntesis nocturna de melatonina pineal inducida por exposición a luz, animales inyectados con vehículo o CS en forma bilateral fueron expuestos a un pulso breve (20 min) de luz blanca o azul a medianoche. Luego del pulso de

luz, los animales se sacrificaron, se extrajeron las glándulas pineales y se utilizaron para la determinación del contenido de melatonina.

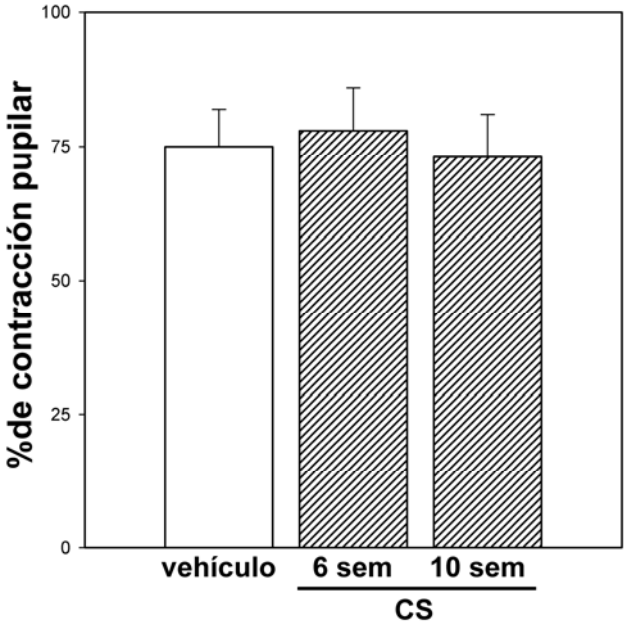

Figura 47. Determinación del reflejo pupilar consensual en animales inyectados en forma unilateral con vehículo o CS durante 6 ó 10 semanas. En todos los casos, se estimuló con luz el ojo intacto y se registró la contracción pupilar en el ojo tratado (con vehículo o CS). El tratamiento con CS durante 6 ó 10 semanas no afectó significativamente el % de contracción de la pupila (respecto al área de la pupila en oscuridad) medida para cada ojo en forma individual. Se representan las medias ± EE (n = 8 ojos / grupo).

La luz blanca disminuyó significativamente el contenido de melatonina pineal en ambos grupos experimentales. La luz azul disminuyó significativamente el contenido de melatonina pineal en los animales cuyos ojos se inyectaron de forma bilateral con vehículo, pero no afectó significativamente este parámetro en los animales tratados con CS durante 10 semanas. El contenido de melatonina pineal a medianoche fue significativamente mayor en los animales control que en los animales con glaucoma (Figura 48).

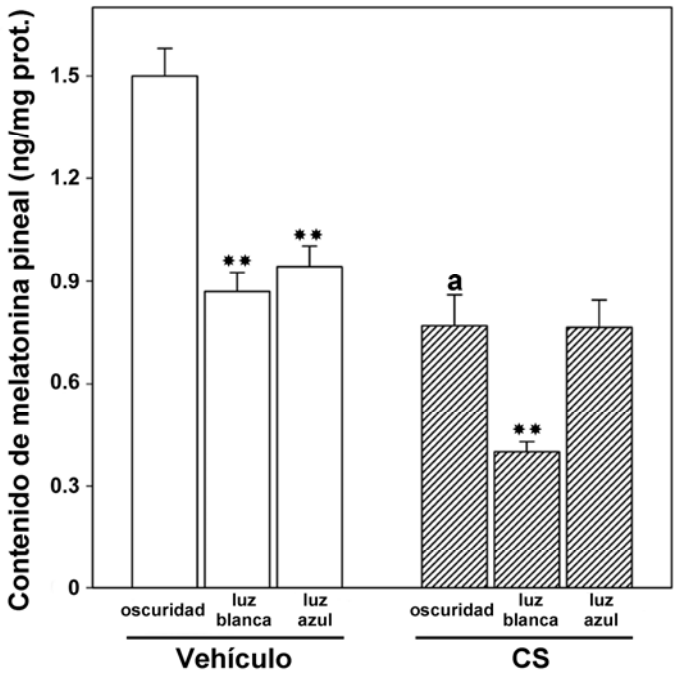

Figura 48. Estudio de la supresión fótica de la síntesis nocturna de melatonina pineal en animales inyectados en forma bilateral con vehículo o CS durante 10 semanas. En los animales inyectados con vehículo, el contenido de melatonina pineal se redujo significativamente luego de un pulso de luz blanca o azul. En los animales inyectados con CS, el contenido de melatonina pineal sólo se redujo significativamente luego de un pulso de luz blanca. Se representan las medias ± EE (n = 8 ojos / grupo). ** $p < 0,01$ vs. oscuridad, a $p < 0,01$ vs. vehículo en oscuridad, test de Tukey.

A continuación, se analizó la inducción del gen temprano c-Fos en respuesta a la luz en los NSQ de animales cuyos ojos se inyectaron en forma bilateral con vehículo o CS durante 10 semanas.

En la Figura 49 se muestra la inducción por luz de c-Fos en los NSQ de ratas inyectadas bilateralmente con vehículo o CS durante 10 semanas. Un pulso de luz indujo un aumento significativo en la inmunorreactividad para c-Fos en los NSQ de ambos grupos.

Sin embargo, los niveles de c-Fos, luego de un pulso de luz, fueron significativamente menores en los núcleos hipotalámicos de los animales cuyos ojos fueron inyectados

bilateralmente con CS que en los animales inyectados con vehículo. No se observaron diferencias significativas en los niveles de c-Fos en oscuridad entre ambos grupos.

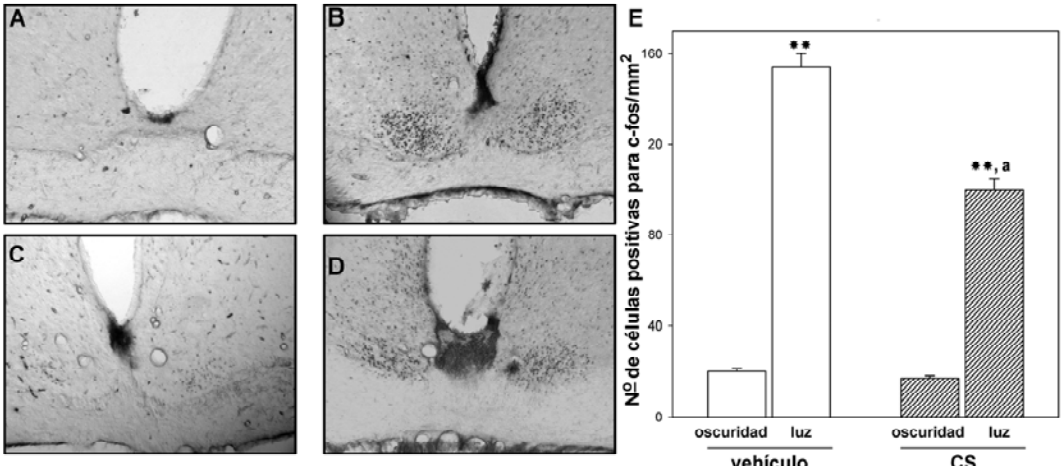

Figura 49. Inducción por luz de c-Fos en los NSQ de ratas inyectadas bilateralmente con vehículo o CS durante 10 semanas. A, B, C y D: imágenes representativas de la expresión del factor de transcripción temprana c-Fos en los NSQ de animales control o tratados con CS. Nótese la localización de c-Fos en la zona retinoceptiva de los NSQ luego de un pulso de luz. Los niveles del factor de transcripción se cuantificaron por inmunohistoquímica. En oscuridad, no se observaron diferencias en los niveles de c-Fos en los NSQ de animales inyectados con vehículo (A) o con CS (C). Luego de un pulso de luz (aplicado 6 h después del inicio de la fase oscura) se observó un aumento significativo en los niveles de esta proteína en los animales inyectados con vehículo (B). En ratas con glaucoma (D), la inducción de c-Fos por luz fue significativamente menor que en las ratas control (B). (E): Se representan las medias ± EE (n = 8 ojos / grupo) **p < 0,01 vs. oscuridad en cada grupo, a: p < 0,01 vs. luz en el grupo control.

Se analizó el ritmo de actividad locomotora en animales inyectados con vehículo o CS en forma bilateral durante 10 semanas. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 50. Los animales tratados con CS durante 10 semanas fueron capaces de sincronizar a un ciclo L:D de 24 h, pero con un retraso significativo en el inicio de la actividad con respecto al apagado de las luces (*phase angle*: controles = 9.7 ± 2.6 min, (n = 10); glaucoma = -50.0 ± 12.1 min, (n = 15), p < 0.01, test de Student). Asimismo, el porcentaje de actividad locomotora en la fase fótica fue significativamente mayor en los animales tratados con CS durante 10 semanas que en los animales inyectados con vehículo (14.1 ± 1.8 % vs. 8.4 ±

1.4%, respectivamente, $p < 0.05$, test de Student). Ambos grupos presentaron un tiempo de sincronización similar luego de un adelanto o retraso de fase de 6 h del ciclo L:D (retraso: controles 5.45 ± 0.25 días, glaucoma 5.8 ± 0.49 días, $p > 0.05$; adelanto: controles = 5 ± 0.30 días, glaucoma = 5.30 ± 0.37 días, $p > 0.05$).

Este conjunto de resultados indica que el glaucoma experimental induce alteraciones significativas en el sistema de melanopsina retiniana y sugiere que la hipertensión ocular crónica podría afectar la fisiología circadiana.

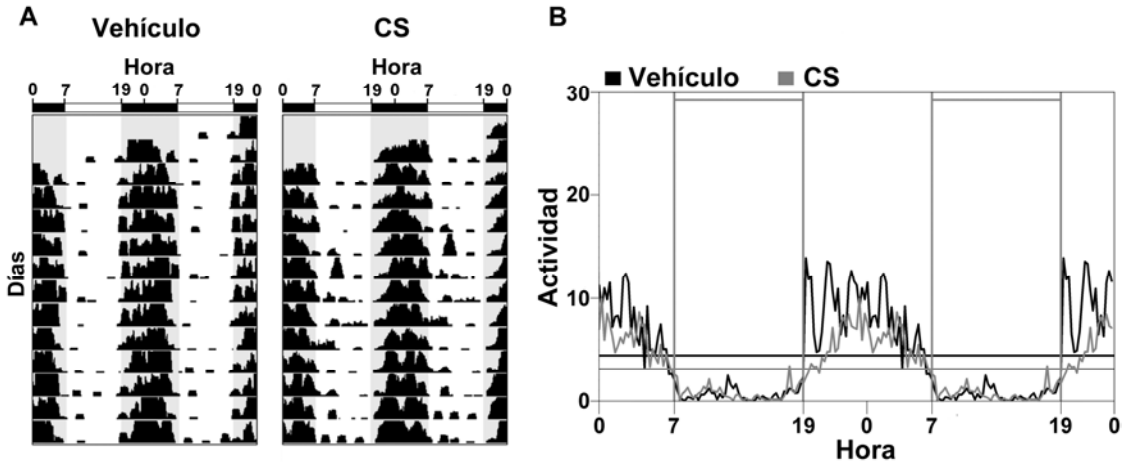

Figura 50. Ritmos de actividad locomotora de ratas inyectadas bilateralmente con vehículo o CS durante 10 semanas. Panel A: Actograma de doble *plot* representativo de ratas inyectadas con vehículo (izquierda) o CS (derecha) en un ciclo L:D. En el eje horizontal se representa la actividad en el transcurso de 2 ciclos (48 h) y en el eje vertical la sucesión de ciclos consecutivos. En cada línea del actograma se representa sombreada la zona correspondiente al tiempo durante el cual se desarrolla la fase de actividad del ciclo. La barra que se encuentra arriba del actograma indica la fase de luz (barra blanca) y la fase de oscuridad (barra negra) El porcentaje de actividad locomotora en la fase fótica fue significativamente mayor en las ratas inyectadas con CS respecto de las inyectadas con vehículo (CS: 14.1 ± 1.8 %, vehículo: 8.4 ± 1.4%, $p < 0.05$, test de Student). Panel B: Gráfico en forma de onda con la actividad promedio de ratas inyectadas con vehículo o CS. Se observa un retraso en el inicio de la actividad respecto del apagado de las luces en los animales inyectados con CS (vehículo: 9.7 ± 2.6 min (n=10); CS: -50.0 ± 12.1 min (n = 15), $p < 0.01$, test de Student).

5. Estudio del ritmo diario de actividad en pacientes con glaucoma

Sobre la base de los resultados obtenidos en la sección anterior, se consideró de interés examinar la fisiología circadiana en pacientes con glaucoma. Como se detalló en Materiales y Métodos, se utilizó un actígrafo de muñeca, ligero y de tamaño pequeño para evaluar las

variaciones diarias en la actividad. Se reclutaron pacientes con glaucoma y controles cuyos datos demográficos y clínicos se indican en la Tabla IV.

Sobre la base de un exhaustivo examen oftalmológico, cuyos resultados se detallan en la Tabla V, se diagnosticó glaucoma en los pacientes denotados entre 7 y 15, en tanto que los pacientes del 1 al 6 no mostraron signos de esta disfunción ocular.

Tabla IV. Datos demográficos de los pacientes reclutados en el estudio

Paciente	Edad	Sexo	Antecedentes clínicos	Antecedentes oculares
1	65	M	S/P	ninguno
2	71	M	HTA	ninguno
3	63	F	S/P	ninguno
4	70	F	S/P	ninguno
5	68	M	HTA	ninguno
6	66	F	S/P	ninguno
7	63	M	S/P	ninguno
8	76	F	HTA	Miopía moderada
9	74	F	S/P	cirugía catarata AO y glaucoma OI
10	64	M	S/P	cirugía catarata OI
11	63	F	S/P	cirugía glaucoma AO
12	60	F	S/P	trabeculectomía AO
13	75	F	HTA	glaucoma AO
14	70	M	S/P	trabeculectomía AO
15	69	M	S/P	glaucoma AO

Del 7 al 15 los pacientes fueron diagnosticados con glaucoma de acuerdo a los criterios que se indican en la Tabla V, en tanto que los pacientes del 1 al 6 no tuvieron signos evidentes de esta disfunción ocular (controles). OI: ojo izquierdo, AO: ambos ojos, HTA: hipertensión arterial, F: femenino, M: masculino, S/P: sin particularidades.

Tabla V. Resultados del examen oftalmológico realizado en todos los sujetos reclutados

PACIENTE	AV	BMC	PIO media (OD/OI)	N.O (OD/OI)	CAMPO VISUAL
1	20/20	S/P	15/15	0.2/0.2	PHG: dln, OD: DM:- 1,02 DSM: 1,60, OI: DM: -1,33 DSM: 1,50
2	20/20	S/P	13/14	0.2/0.2	PHG: dln, OD: DM:- 1,20 DSM: 1,80, OI: DM: -1.33 DSM: 1,60
3	20/20	S/P	14/12	0.2/0.2	PHG: dln, OD: DM:- 1 DSM: 1,30, OI: DM: -1,05 DSM: 1,20
4	20/20	S/P	15/14	0.1/0.1	PHG: dln, OD: DM: -0,67, DSM: 1,83, OI: DM:-1,75, DSM:1,75
5	20/20	S/P	16/15	0.3/0.3	PHG: dln, OD: DM: -0,30, DSM: 1,58, OI: DM:-0,60, DSM:1,73
6	20/20	S/P	14/15	0.1/0.1	PHG: dln, OD: DM: -0,2, DSM:1,5, OI: DM:-0,3, DSM:1,7
7	20/20	S/P	20/20	0.7/0.8	PHG: fln, OD: DM: -6,5 DSM:16,6, OI:DM:-5,1 DSM:17
8	20/25	S/P	20/16	0.9/0.9	PHG: fln, OD: DM:-22 DSM:28, OI: DM:-20 DSM: 30
9	OD:20/80 OI:20/20	Catarata N1 AO	13/13	O.9/0.9	PHG: fln, OD: DM:-18,9 DSM:20,4, OI: DM:-10,4 DSM:18
10	OD:20/50 OI:20/30	PF AO	16/17	1.0/0.8	PHG: fln, OD: DM: -24 DSM: 9,63, OI: DM:- 12,68 DSM: 13
11	OD:20/200 OI:20/400	Catarata N1 AO	10/10	0.9/1.0	PHG: fln, OD: DM:-24,4 DSM:16, OI: DM:-24 DSM:20
12	20/20	S/P	16/16	0.9/0.9	PHG: fln, OD: DM: -29,73 DSM:10,41, OI: DM:-23,55 DSM: 12,73
13	OD:20/50 OI:20/20	S/P	17/17	0.9/0.8	PHG: fln, OD: DM: -16,71, DSM: 11,48, OI: DM:-18,04, DSM:13,39
14	OD:20/25 OI:20/25	S/P	16/15	0.8/0.9	PHG: fln, OD: DM: -13,62, DSM:19,49, OI: DM:-12,55, DSM:14,37
15	OD:20/20 OI:20/30	S/P	16/14	0.7/0.7	PHG: fln, OD: DM: -15,30, DSM: 21,47, OI: DM:-17,00, DSM:15,01

Se diagnosticó glaucoma en los sujetos 7 a 15 en función del resultado del campo visual y la excavación de la papila. Los sujetos 1 a 6 no presentaron signos de la enfermedad. AV: agudeza visual (medida con corrección óptica (csc)), BMC: biomicroscopía, N.O: nervio óptico, OI: ojo izquierdo, OD: ojo derecho, AO: ambos ojos, PHG: prueba del hemicampo para glaucoma, dln: dentro de los límites normales, fln: fuera de los límites normales, DM: defecto medio, DSM: desviación estándar modelo, S/P: sin particularidades, PF: pseudofaquia. Las cataratas se clasificaron según el sistema de clasificación de opacidades de las lentes III (Locs III).

Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el de pacientes con glaucoma en las variables que se indican en la Tabla VI. Si bien el tiempo total de sueño no varió entre

ambos grupos, los pacientes con glaucoma presentaron menor eficiencia de sueño y mayor actividad, más minutos de vigilia, y mayor cantidad de episodios de vigilia durante la noche, que el grupo control. Aún en estado preliminar, estos resultados demuestran alteraciones significativas en diversos parámetros circadianos (particularmente, en la calidad de sueño) en pacientes con glaucoma avanzado.

Tabla VI. Resultados del estudio de actividad diaria realizado en todos los sujetos reclutados

	control	**glaucoma**	
	media ± EE	**media ± EE**	
pacientes	6	9	
duración (días) del registro	18,33 ± 0,84	18,56 ± 0,38	**NS**
actividad total media (unidades arbitrarias)	150 ± 9,38	157 ± 4,33	**NS**
tiempo total de sueño (min)	523 ± 43,68	452 ± 21,33	**NS**
eficiencia de sueño (%)	80 ± 2,85	60 ± 3,33	******
latencia de sueño (min)	576 ± 56,74	444 ± 35,33	**NS**
actividad media durante el intervalo de sueño	14 ± 1,63	24 ± 3	******
min vigilia en el int. de sueño	19 ± 3,10	46 ± 7	******
episodios vigilia (EV) en el intervalo de sueño	9,9 ± 1,22	14,6 ± 1,57	******
media EV en el intervalo de sueño (min)	2,5 ± 0,24	3,9 ± 0,5	******

Se indican las medias ± EE de los parámetros estudiados en todos los pacientes a través del registro de actividad durante 20 días. NS: no significativo. ** $p < 0,01$, test de Student.

Actogramas representativos de pacientes control y pacientes con glaucoma avanzado se muestran en la Figura 51.

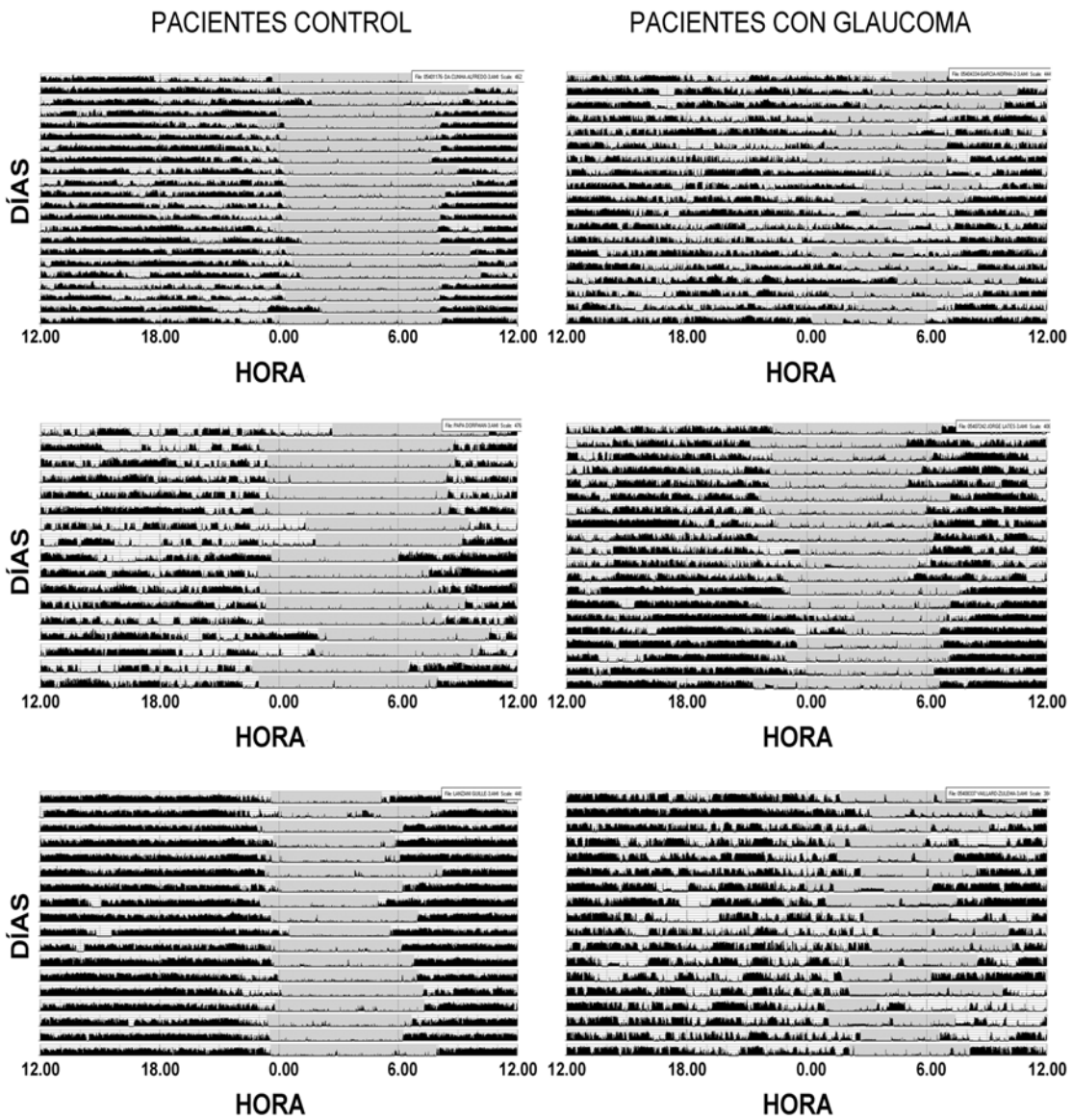

Figura 51. Actogramas representativos de sujetos control y pacientes con glaucoma. En el eje horizontal se representa la actividad en el transcurso de 1 ciclo (24 h) y en el eje vertical la sucesión de ciclos consecutivos. En cada línea del actograma se representa en negro la zona correspondiente al tiempo durante el cual el paciente está en la fase de actividad y en gris claro la zona que corresponde al tiempo en el cual el paciente está en la fase de sueño. Nótese la mayor actividad en la fase de sueño en los pacientes con glaucoma en comparación con los sujetos control.

La información retiniana en mamíferos es crítica para la sincronización y los cambios de fase de los ritmos circadianos generados por el marcapasos hipotalámico. Por lo tanto, el estudio de la actividad rítmica retiniana, ya sea auto-sostenida o como eferencia de la información procedente de los NSQ, es esencial para la comprensión de la génesis y fisiología de la actividad circadiana. En este contexto, este trabajo de tesis tuvo esencialmente dos objetivos, por un lado se analizaron algunos aspectos del reloj biológico en la retina del hámster dorado y por otro, se examinó el efecto de una enfermedad ocular prevalente como el glaucoma sobre la fisiología circadiana en un modelo experimental en ratas y en pacientes. Con la salvedad del estudio en el modelo de glaucoma experimental y los pacientes con glaucoma, los experimentos realizados se centraron en examinar distintos aspectos del reloj biológico en la retina del hámster dorado. Aunque los estudios en este modelo experimental son relativamente más escasos que los realizados en otros modelos animales (especialmente la rata y el ratón), el hámster dorado constituye una herramienta de valor indiscutible, particularmente cuando se trata de profundizar conocimientos cronobiológicos (lo que constituye uno de los objetivos de este trabajo). Esta especie ha sido extensamente utilizada como modelo en cronobiología dado que presenta ritmos biológicos robustos y fácilmente registrables, así como una marcada influencia circadiana en la fisiología del organismo *in toto* y de la retiniana en particular. Desde esta perspectiva, no resulta sorprendente que la primera evidencia experimental que avala sólidamente la presencia de un reloj circadiano endógeno en la retina de mamíferos hubiera sido obtenida, precisamente, en el hámster dorado (Tosini y Menaker, 1996). En nuestro laboratorio, iniciamos el análisis de diversos aspectos de la retina de esta especie hace ya más de quince años y al presente disponemos de una cantidad considerable de antecedentes que avalan la experiencia adquirida en el estudio de este modelo animal. Por otra parte, la rata constituye la especie de uso más frecuente para los estudios experimentales de glaucoma. Si bien hemos realizado diversos intentos para desarrollar un

modelo de glaucoma experimental en hámsteres, el tamaño del ojo de esta especie constituyó un serio impedimento para la determinación de la PIO, un aspecto insoslayable cuando se pretende modelar una enfermedad en la que la hipertensión ocular constituye el principal factor de riesgo. Este conjunto de consideraciones avala el uso de dos especies diferentes (el hámster y la rata) para el desarrollo de los objetivos centrales de este trabajo de tesis.

Los resultados obtenidos en la primera serie de experimentos indican que la liberación de PGE2 y PGF2α en la retina de hámster está regulada por un reloj circadiano local, independiente de los NSQ. Trabajos previos han demostrado que retinas de vaca y rata son capaces de sintetizar PGE2 y PGF2α a partir de ácido araquidónico radiomarcado (Birkle y Bazán, 1984b; 1986), y que las retinas de conejo pueden liberar PGE2 y PGF2α a partir de ácido araquidónico endógeno (Preud'homme y col., 1985), siendo la PGE2 el eicosanoide predominante. Los resultados obtenidos indican que la retina de hámster es capaz de liberar PGs en forma espontánea a partir de fuentes endógenas, aunque se observaron niveles mayores de PGF2α que de PGE2. Aunque no se dispone de una interpretación clara para esta discrepancia, parece probable que factores dependientes de la especie puedan explicarla.

En condiciones de luz-oscuridad se observaron variaciones diarias significativas en la liberación de PGE2 y PGF2α, con un máximo a medianoche. Un ritmo diario en la retina puede ser controlado por un oscilador circadiano endógeno, por respuesta directa a la luz o por una combinación de ambos mecanismos. El control endógeno de un proceso rítmico debe ser demostrado por su persistencia en condiciones constantes. Cuando los animales se expusieron a oscuridad constante durante 48 h y se sacrificaron a mediodía o a medianoche subjetivos, las diferencias horarias en la liberación de ambas PGs persistieron. Dado que las PGs son compuestos altamente fotosensibles, es posible que la luz durante el período de incubación pueda tener un efecto deletéreo sobre estas moléculas. De hecho, los niveles de ambas de PGs fueron significativamente mayores bajo condiciones de oscuridad que de luz.

Sin embargo, la observación de que las variaciones entre el mediodía subjetivo y la medianoche subjetiva persistieron en oscuridad constante avala el concepto de una función controlada por un reloj endógeno. En este sentido, aunque no se descarta la posibilidad de que la luz puede influir sobre la biosíntesis o la liberación retiniana de PGs, el ciclo de luz-oscuridad no parece ser una condición necesaria para la generación de este ritmo. Se han demostrado anteriormente variaciones circadianas en los niveles de PGs en el líquido cefalorraquídeo de ratas (Pandey y col., 1995), en el órgano diafisario de la médula ósea de rata (Yosipovitch y col., 1995) y en el humor acuoso del conejo (Liu, 2000). En el órgano diafisario de rata, los niveles de PGs son altos durante la tarde y los períodos de oscuridad y disminuyen a la mañana, mientras que en el líquido cefalorraquídeo y el humor acuoso de conejo, se demostró un ritmo en la producción de PGs con un pico en la fase opuesta. Por lo tanto, es posible que la coordinación temporal de la liberación de PGs se ejerza en un nivel tisular/celular, lo que adquiere sentido si se tiene en cuenta que estas moléculas participan en mecanismos de regulación local. En cuanto al efecto de la estimulación fótica, se ha demostrado que la exposición de ojos de cerdo a luz *in vivo* e *in vitro* aumenta los niveles retinianos de PGs (Hanna y col., 1997). Sin embargo, en este estudio se utilizó una intensidad luminosa de 2700 lux *in vitro* o de 3770 lux *in vivo*, mientras que en nuestras condiciones experimentales la intensidad de luz fue marcadamente menor (300 lux).

En la retina de hámster, los niveles de COX-1 (pero no de COX-2) fueron más altos a medianoche que a mediodía y a la medianoche subjetiva que al mediodía subjetivo, lo que sugiere una correlación entre los niveles de esta isoenzima y la liberación de PGs. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la expresión de COX-1 en la retina está regulada por un reloj circadiano endógeno. Al presente, se ha descripto sólo un número relativamente pequeño de mecanismos regulatorios para COX-1. Aunque esta isoenzima fue originalmente considerada constitutiva, se han descripto alteraciones en los niveles de COX-1 retinianos en

diversas situaciones experimentales (Fang y col., 1997). Se ha demostrado que la PGE2 estimula la síntesis de COX-1 y aumenta los niveles de su ARNm en células osteoblásticas de ratón (Oshima y col., 1991). De esta manera, un ciclo de retroalimentación positiva de la PGE2 sobre la COX-1 podría contribuir a los cambios circadianos retinianos en los niveles de esta isoenzima.

La localización de COX-1 y COX-2 se ha examinado en la retina de diversas especies como ratón, rata y humano (Ju y Neufeld, 2002). En el ratón, la COX-1 se localiza en los segmentos externos de los fotorreceptores, en células horizontales, microglia, células ganglionares (CGRs) y células amácrinas desplazadas, mientras que en la rata y en la retina humana, la COX-1 está presente principalmente en CGRs y en células amácrinas desplazadas. La inmunorreactividad para COX-2 en el ratón y la rata se observa en los procesos de la capa plexiforme externa y en ciertas células amácrinas y CGRs, mientras que en la retina humana, la inmunorreactividad para COX-2 sólo se localiza en los procesos de la capa plexiforme externa. En la retina de hámster, la COX-1 y la COX-2 se localizaron en la retina interna (pero no externa), sobre todo en la capa de CGRs y la capa nuclear interna.

Como se mencionó en la Introducción, múltiples parámetros retinianos fluctúan significativamente a lo largo del día (Tabla III), incluso bajo condiciones de iluminación constante, lo que sugiere que la génesis de estos ritmos está controlada por un reloj endógeno. En muchos de estos estudios, los ojos no se analizaron en forma aislada, lo que permite una posible influencia centrífuga de los NSQ. Sin embargo, se demostró que retinas en cultivo mantienen un ritmo circadiano en la producción de melatonina (Cahill y Besharse, 1993; Tosini y Menaker, 1996). Por otra parte, Terman y col. (1993) demostraron que las lesiones de los NSQ no afectan el ritmo en la fagocitosis de los discos de membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores. Como se muestra en este trabajo, el ritmo en la liberación

retiniana de PGs persistió en animales con lesión bilateral de los NSQ, lo que sugiere que este ritmo es generado localmente.

A pesar del conjunto de evidencias que avalan la existencia de un (o más de un) reloj retiniano circadiano, la localización celular de este/os reloj/es no ha sido aún completamente identificada. Considerando que la biosíntesis retiniana de melatonina es un ritmo circadiano paradigmático, la identificación del tipo de células capaces de sintetizar melatonina fue considerada un indicador clave de la localización del reloj retiniano. Dado que la síntesis de melatonina persiste después de la destrucción de la retina interna de *Xenopus* (Hayasaka y col., 2002) y de pollo (Ivanova y Iuvone, 2003a), se sugirió que el reloj circadiano se localiza en los fotorreceptores (Tosini y col., 2007a). Asimismo, se ha demostrado que la actividad específica de la enzima arilalquilamina -N-acetiltransferasa (AA-NAT, enzima clave en la biosíntesis de la melatonina) aumenta en cultivos de células retinianas luego de tratamientos que aumentan la proporción de fotorreceptores (Ivanova y Iuvone, 2003b). Además, diversos estudios han identificado varios componentes del reloj exclusivamente en los fotorreceptores de *Xenopus* (revisado por Anderson y Green, 2000). Por lo tanto, las evidencias disponibles apoyan la idea de que el reloj circadiano de la retina se encuentra en los fotorreceptores (Hayasaka y col., 2002). Sin embargo, la posibilidad de que otro tipo de células retinianas también sea capaz de sintetizar melatonina aún no puede descartarse formalmente. De hecho, como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio hemos demostrado la existencia de ritmos diarios en la biosíntesis de melatonina, en la actividad de AA-NAT y en los niveles de ARNm de esta enzima en cultivos de CGRs embrionarias de pollo durante al menos tres ciclos, con un período cercano a las 24 horas (Garbarino-Pico y col., 2004). Estos resultados indican que las CGRs de la retina de pollo pueden funcionar como osciladores circadianos autónomos capaces de sintetizar melatonina con máximos durante el día, en fase opuesta a la síntesis del metoxiindol en los fotorreceptores (Garbarino-Pico y col., 2004). Sobre la base de

los resultados de esta Tesis, es posible postular que las CGRs de la retina del hámster pueden funcionar como osciladores circadianos capaces de sintetizar PGs.

Recientemente se ha demostrado una función hasta ahora no identificada de la PGE2, que consiste en el ajuste de los circuitos de retroalimentación de la expresión de genes circadianos en relojes circadianos periféricos (Tsuchiya y col., 2005). En este sentido, se ha previsto en un futuro próximo analizar esta posible función de la PGE2 sobre el reloj circadiano retiniano. En suma, estos resultados indican la existencia de un ritmo circadiano robusto en la liberación retiniana de PGs, probablemente asociada a la COX-1. Dado que las variaciones circadianas de la liberación de PGs se mantuvieron después de la lesión de los NSQ, estos resultados sugieren que el sistema PGs/COX-1 podría ser parte del conjunto de señales eferentes del reloj retiniano o bien formar parte de la maquinaria molecular de este reloj. En todo caso, el hecho de que la COX-1 y la COX-2 se localizaran en la retina interna pero no en los fotorreceptores, vincula al sistema generador de PGs con un reloj retiniano presumiblemente localizado en la retina interna. De esta forma, las PGs retinianas, como un componente del sistema generador de ritmos oculares, podrían formar parte de los mecanismos que subyacen a la regulación temporal de la fisiología retiniana.

La capacidad de oscilación autónoma de los relojes circadianos, particularmente en los NSQ de mamíferos, ocurre a través de ciclos de retroalimentación de transcripción/traducción acoplados, en los que los elementos positivos *Clock* y *Bmal1* interactúan con elementos negativos (*Per1* y *2*, y *Cry* 1 y 2), (Ko y Takahashi, 2006; Reppert y Weaver, 2002; Schibler, 2006; Siepka y col., 2007). Se ha demostrado la expresión de estos genes reloj también en la retina de diferentes especies de vertebrados y en muchos casos se han obtenido resultados contradictorios. Por ejemplo, mientras que Dorenbos y col. (2007) demostraron por RT-PCR en células únicas la presencia de los transcriptos para los seis componentes clave del reloj circadiano (*Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, y *Per2*) en células amácrinas dopaminérgicas,

pero no en los fotorreceptores de la retina de ratón, Tosini y col. demostraron la presencia de los ARNms para *Per1*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, y *Bmal1*, pero no para *Per2* en fotorreceptores de rata (Tosini y col., 2007a). Además, se ha demostrado que los niveles de ARNm de *Bmal1* (Tosini y col., 2007b) o de *Per1*, *Cry1*, y *Clock* (Kamphuis y col., 2005), no muestran variaciones circadianas significativas en la retina de rata, mientras que otros autores observaron variaciones circadianas en los niveles de ARNms de *Per2*, *Per3*, *Cry2*, y *Bmal1* también en esta especie (Kamphuis y col., 2005).

A pesar de las evidencias ya mencionadas respecto a la utilidad del hámster como modelo paradigmático para el estudio de la fisiología circadiana y de ser ésta la primera especie de mamíferos en la que se demostró la existencia de un reloj retiniano autónomo (Tosini y Menaker, 1996), al presente no se dispone de ningún estudio diseñado con el objeto de examinar el engrama molecular del reloj circadiano en la retina de esta especie. Para analizar este aspecto, se determinaron los niveles de las proteínas CLOCK y BMAL1 en retinas de hámster en distintas condiciones experimentales. La determinación de los niveles de estas proteínas constituye por sí mismo un enfoque original en el área porque todos los estudios anteriores en retinas de diversas especies (sin ninguna excepción) se restringieron a determinar los niveles de sus respectivos ARNms que no siempre constituyen indicadores fidedignos de los niveles proteicos.

A diferencia de lo mencionado para la retina, en estudios previos de otros autores se determinaron los niveles proteicos de BMAL1 (Tamaru y col., 2000) y CLOCK (Maywood y col., 2003; Kondratov y col., 2003) en los NSQ de rata y ratón respectivamente. En este caso, se demostró que si bien se observa una variación circadiana en los niveles de BMAL1, los niveles de CLOCK no varían circadianamente en homogenatos totales de NSQ (Maywood y col., 2003). En cambio, cuando se separan las fracciones citoplasmáticas y nucleares resultan evidentes las variaciones circadianas de los niveles de CLOCK en ambos compartimentos

celulares (Kondratov y col., 2003). Por lo tanto, otro aspecto novedoso (particularmente en la retina) de los experimentos realizados en esta Tesis, fue el análisis diferencial de los niveles citoplasmáticos y nucleares de estas proteínas. Considerando que la participación de estas proteínas en la organización molecular del reloj circadiano está intrínsecamente asociada a su capacidad de actuar como factores de transcripción, es esperable que su presencia en el núcleo esté directamente asociada con su función biológica. Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran, por primera vez, la existencia de variaciones diarias significativas en los niveles nucleares pero no citoplasmáticos de las proteínas CLOCK y BMAL1, con valores mayores a mediodía que a medianoche. Asimismo, dado que no se observaron variaciones en los niveles citoplasmáticos, la translocación de estas proteínas al núcleo podría ser un aspecto central en la maquinaria molecular del reloj circadiano. Se ha sugerido, que al menos en los NSQ ambas proteínas translocan al núcleo ya en forma de dímeros y que el control circadiano de CLOCK se produce a nivel de su translocación nuclear dependiente de BMAL1 (Kondratov y col., 2003). Sin embargo, los eventos intracelulares involucrados en la redistribución y regulación intracelular de las proteínas reloj no han sido aún examinados y serán objeto de próximos estudios. La observación experimental de que las variaciones diarias en los niveles de CLOCK y BMAL1 persisten en condiciones de oscuridad constante, indica que esta oscilación no depende del estado de iluminación ambiental, sino de un reloj endógeno. Si bien las variaciones circadianas en los niveles nucleares de CLOCK no fueron evidentes luego de la lesión bilateral de los NSQ, el hecho de que las variaciones en los niveles nucleares de BMAL1 persistan en estas condiciones indica que la génesis de estas oscilaciones, al menos en parte, es independiente de los NSQ y se localiza en la propia retina. Considerando que estas proteínas actúan en forma de dímeros, queda aún por elucidar si las variaciones en los niveles de BMAL1 (en ausencia de los NSQ) son suficientes para inducir variaciones circadianas en los niveles nucleares de los heterodímeros, a pesar de que los

niveles de CLOCK no varíen en forma aparente. Por otra parte, si bien al presente no se dispone de un modelo fehaciente para la interpretación de estos resultados en conjunto, es posible suponer la existencia de una relación compleja entre el reloj retiniano y el hipotalámico, incluso a nivel del engrama molecular del sistema generador de ritmos en la retina. Otros autores también observaron diferencias en los patrones de expresión circadiana luego de la ablación de los NSQ. Sakamoto y col. (2000) demostraron en retina de rata, que luego de la lesión de los NSQ las variaciones diarias en los niveles de ARNm de la AA-NAT se mantienen, mientras que las variaciones en los niveles de ARNm de *Per2* y *Dbp* (un gen controlado por el reloj) desaparecen. El estudio inmunohistoquímico demostró que CLOCK y BMAL1 se localizan exclusivamente en la capa de CGRs. Este resultado constituye una de las evidencias más sólidas obtenidas hasta ahora en mamíferos respecto a la existencia de un reloj circadiano en la retina interna, y no en los fotorreceptores, en los que no se detectó la presencia de estas proteínas, al menos por los métodos inmunohistoquímicos utilizados en este trabajo. Otros estudios, muchos de ellos con las limitaciones ya mencionadas, también han propuesto la existencia de un reloj circadiano en la retina interna. En ese sentido, se demostró que los ritmos circadianos en los sistemas dopaminérgico y melatoninérgico persisten en ratas con retinas distróficas (Sakamoto y col., 2004; Doyle y col., 2002a y b) y que neuronas de la retina interna de ratón coexpresan los ARNms de varios genes reloj (Witkovsky y col., 2003; Ruan y col., 2006). En particular, se demostró la presencia de transcriptos para los seis genes reloj en células horizontales, bipolares, catecolaminérgicas y CGRs, pero no en los fotorreceptores, con una mayor proporción en las amácrinas dopaminérgicas (Ruan y col., 2006). Además, los ritmos en los niveles de estos transcriptos persistieron por más de 25 días en cultivos de retinas de ratón en las que los fotorreceptores habían degenerado (Ruan y col., 2006). En conjunto, estos resultados junto con los obtenidos en este trabajo de Tesis indican que las neuronas retinianas que albergan las bases

moleculares para la generación de ritmos endógenos se distribuyen entre la CNI y CCG de la retina de mamíferos. Por el contrario, en la retina de vertebrados no mamíferos como *Xenopus* y distintas especies de aves, la expresión de genes reloj no parece limitarse a la retina interna, sino también está presente en los fotorreceptores. Estas observaciones podrían reflejar diferencias evolutivas entre mamíferos y vertebrados no mamíferos, y no excluyen completamente la posibilidad de la función de los fotorreceptores como sustrato anatómico para un reloj retiniano. Sin embargo, cabe destacar que a pesar de la presencia de genes reloj en los fotorreceptores (Gekakis y col., 1998; Miyamoto y Sancar, 1998; Namihira y col., 2001; Thompson y col., 2003; Witkovsky y col., 2003), no se detectó expresión coordinada de los seis genes reloj en este tipo celular, por lo tanto es poco probable que estas células puedan formar un ciclo circadiano completo de retroalimentación autónoma viable (Ruan y col., 2006). En consecuencia, es posible que en los fotorreceptores, estos genes pudieran cumplir funciones diferentes al reloj. Estos resultados contrastan con el paradigma actual basado principalmente en datos de la retina de anfibios, en el que los fotorreceptores son considerados los osciladores circadianos endógenos que median el ritmo en la liberación de melatonina (Cahill y Besharse, 1993) y expresan altos niveles de los genes centrales del reloj (Zhu y Green, 2001; Zhu y col., 2000); en cambio en la retina de mamíferos, los genes reloj y consecuentemente la función reloj podrían localizarse preferencialmente en la retina interna. Los resultados obtenidos en esta Tesis proveen una base ampliada para el estudio de los ritmos en la retina de mamíferos, así como de la localización e identificación de las neuronas marcapaso en la CCG.

Los relojes retinianos inducen cambios en el sistema visual en función de la hora del día en forma predictiva a las variaciones de iluminación que ocurren al amanecer y al atardecer. Es esencial para el funcionamiento del sistema de regulación temporal que estos relojes circadianos estén presentes en la propia retina. De esta forma, la presencia de relojes en las

células CGRs y otras poblaciones celulares de la retina interna, en calidad de osciladores circadianos autónomos, además de su capacidad de fotorrecepción intrínseca a través del fotopigmento melanopsina (como se discutirá más adelante), les confiere la posibilidad de regular la fisiología de la retina y cambiar la sensibilidad de la retina a la entrada fótica sobre una base circadiana, lo que en definitiva, permitiría regular la entrada de información a los NSQ y otras estructuras. Sobre la base de estas consideraciones, se posible proponer que las CGRs desempeñan un papel central en el sistema circadiano y por lo tanto, alteraciones a nivel de este tipo celular podrían afectar significativamente la génesis de los ritmos biológicos.

PARTE II

Considerando la función clave de la información fótica en la generación de los ritmos biológicos, es de gran interés determinar en qué forma las enfermedades oftalmológicas pueden afectar al sistema circadiano. Las enfermedades oculares que pueden afectar la entrada fótica al sistema circadiano incluyen las cataratas, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la retinitis pigmentosa, la atrofia del nervio óptico y el glaucoma (revisado por Jean-Louis y col., 2008). La catarata, una opacidad del cristalino, no disminuye de manera significativa la entrada de luz a menos que la enfermedad esté muy avanzada (Jongebloed y col., 1993). La retinopatía diabética es una causa frecuente de pérdida de las funciones visuales e incluso de ceguera irreversible (Klein y col., 1987) que varía considerablemente en su gravedad, de modo tal que la entrada de luz al sistema circadiano cambiará en función del avance de la enfermedad. La etapa final de la enfermedad diabética proliferativa transmitirá menos luz; un ojo con retinopatía diabética tratado con láser pierde funciones visuales en áreas discretas y por lo tanto, podría reducir la entrada de estímulos de luz al sistema circadiano. La degeneración macular relacionada con la edad es un proceso que afecta a distintas capas de la retina, con cicatrices profundas y pérdida de transmisión de los

estímulos de luz (VanNewkirk y col., 2000). La retinitis pigmentosa es reconocida como una degeneración progresiva de los bastones, que provoca ceguera nocturna y pérdida del campo visual periférico (van Soest y col., 1999). Sin embargo, el hallazgo de la pérdida de células ganglionares de la retina (CGRs) en el glaucoma constituye probablemente el aspecto más significativo en términos de la fisiología circadiana (Jakobs y col., 2005).

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera, caracterizada por defectos del campo visual debidos a la pérdida de CGRs y el daño a la cabeza del nervio óptico. Considerando la presencia de melanopsina (Hannibal y col., 2004) y *Cry* (Hattar y col., 2003) en CGRs de la retina humana y una disminución del RP en pacientes con glaucoma (Clark y Mapstone, 1986), es posible conjeturar que individuos con pérdidas graves de CGRs (es decir, con glaucoma), podrían experimentar desincronización de sus ritmos circadianos. Para evaluar esta hipótesis fue necesario el desarrollo de un modelo de glaucoma experimental en ratas. Como ya se mencionó, cuando se inició este trabajo de Tesis Doctoral disponíamos en el laboratorio de un modelo de glaucoma inducido por inyecciones crónicas de AH. Sin embargo, el fabricante de este reactivo sorpresivamente interrumpió en forma definitiva su producción lo que resultó un gran perjuicio para la continuidad de esta línea de trabajo. A pesar de múltiples intentos, no resultó posible reemplazar el AH (Sigma, nº de catálogo H1751) con otras preparaciones de la misma empresa u otros orígenes, lo que nos llevó a la búsqueda de nuevos recursos para inducir un modelo de glaucoma experimental en ratas.

Sobre la base de las consideraciones mencionadas en la Introducción, los experimentos cuyos resultados se discutirán a continuación tuvieron por objeto desarrollar un modelo de glaucoma experimental en ratas a través de inyecciones intracamerales de CS.

Los resultados obtenidos indican que una inyección aguda de CS en la cámara anterior del ojo de rata aumentó significativamente la PIO en comparación con los ojos inyectados con vehículo, en forma dependiente de la dosis. Una inyección única de 40 % de CS mantuvo

niveles elevados de PIO durante siete días, alcanzando valores similares al control en el 8vo día post-inyección. Aunque el destino intraocular del CS es aún desconocido, el lento descenso de la PIO observado después de una inyección única, sugiere que el CS puede salir de la cámara anterior por el flujo de humor acuoso y/o ser degradado por una actividad de condroitinasa local. Dado que el aumento de la PIO fue transitorio, se realizaron inyecciones semanales de CS para mantener un aumento sostenido en este parámetro. La PIO de los ojos tratados semanalmente con CS alcanzó un nivel de estado estacionario similar al provocado por una inyección única de CS, fue significativamente mayor que el de los ojos inyectados con vehículo y se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas).

Diversos viscoelásticos que contienen CS y AH, como el Viscoat ® (3,0% AH - 4,0% CS) se han convertido en herramientas casi imprescindibles en la cirugía del segmento anterior del ojo humano para reducir el trauma del tejido y la pérdida de células endoteliales, así como para mantener el volumen de la cámara anterior. Sin embargo, es bien sabido que estos agentes son responsables de causar o exacerbar un aumento transitorio pero significativo de la PIO después de la cirugía. Dado que los agentes viscoelásticos con AH pero sin CS, como el Healon (1% AH), el Healon ® 5 (2,3% AH) y el GV Healon ® (1,4% AH) también aumentan la PIO en humanos, el efecto hipertensivo del Viscoat® podría ser atribuido al AH. De hecho, como ya se mencionó, en trabajos previos demostramos que la inyección intracameral de AH induce un aumento significativo de la PIO en ratas. Aunque se ha demostrado que la administración intracameral de CS aumenta la PIO en gatos, pero no en conejos (Zhu y Cai, 1992), el efecto del CS sobre la PIO de ratas no había sido previamente examinado. Inyecciones repetidas de CS (9 mg/ojo) en la cámara anterior de gatos aumentó la PIO en 4 a 7 mm Hg por encima de la de los ojos control, en tanto que en ojos de ratas se observó un incremento de casi un 100% (~ 10 mm Hg) en ojos inyectados con CS al 40% (8 mg/ojo). Dado que la cámara anterior del ojo de rata es muy estrecha, la mayor hipertensión

ocular provocada por el CS en la rata que en el gato podría atribuirse al hecho de que las concentraciones intracamerales reales de CS en el ojo de rata podrían ser superiores a las alcanzadas en el ojo de gato. Además, no puede descartarse una menor capacidad de lavado del CS en la cámara anterior de la rata.

Como ya se mencionó, inyecciones crónicas de AH aumentan significativamente la PIO en ratas (Benozzi y col., 2002). La eficacia del CS para aumentar la PIO en la rata fue similar a la obtenida a través de inyecciones de AH. Sin embargo, para alcanzar una hipertensión ocular similar, fue necesaria una mayor concentración de CS (40 %) que de AH (1 %). El dominio de AH es dependiente de la concentración y forma una red polimérica continua a una concentración de 1 mg/ml. Por el contrario, el dominio de CS es limitado y adquiere una configuración de “cepillo para botellas” sin formar una red polimérica. Además, numerosas moléculas de CS se unen a una sola columna vertebral de AH para formar el agregado de un proteoglicano típico. Por lo tanto, es esperable que la cantidad de CS necesaria para aumentar la PIO sea mucho mayor que la de AH. Estos resultados confirman el conocimiento existente sobre la polimerización de AH y las propiedades de agregación del CS. Además de las diferencias estructurales, diferencias en el *turnover* de estos dos GAGs podrían explicar esta observación. A pesar de las concentraciones relativamente altas de CS necesarias para inducir una hipertensión ocular sostenida, no se observaron signos de inflamación en los ojos inyectados crónicamente con CS.

Se ha sugerido que los GAGs pueden reducir el diámetro funcional de los canales de flujo a través de los espacios corneoesclerales intertrabeculares profundos y/o regular el flujo a través de la membrana basal juxtacanalicular. Por lo tanto, es posible que el CS inyectado en forma intracameral actúe de manera similar al CS endógeno (es decir, impidiendo el flujo normal de humor acuoso). Es bien sabido que la hipertensión ocular desempeña un rol causal, aunque no necesariamente exclusivo, en la pérdida visual glaucomatosa. De hecho, no todos

los modelos experimentales de hipertensión ocular crónica causan las mismas alteraciones en la retina o en la cabeza del nervio óptico. Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron con el fin de evaluar las consecuencias funcionales e histológicas de la hipertensión ocular crónica inducida por inyecciones semanales de CS.

Diversas observaciones indican que algunos componentes del ERG pueden ser afectados en modelos experimentales de glaucoma. Considerando que las inyecciones crónicas de CS indujeron una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico que fue evidente a las 6 semanas de tratamiento, los resultados obtenidos en esta Tesis apoyan esta observación. Además, el hecho de que se observara una reducción adicional de estos parámetros después de 10 inyecciones semanales de CS sugiere una disfunción retiniana progresiva asociada con la hipertensión ocular crónica. En concordancia con estos resultados, en un modelo de glaucoma experimental inducido por oclusión de tres venas epiesclerales en ratas, se demostró una disminución significativa de la amplitud de las ondas a y b del ERG (Bayer y col., 2001a). Cambios similares en el ERG de *flash* se demostraron en el ratón DBA/2J, un modelo espontáneo de glaucoma de ángulo cerrado (Bayer y col., 2001b) y en ojos inyectados crónicamente con AH en la cámara anterior (Moreno y col., 2005). Por otra parte, Viswanathan y col., (2000), demostraron cambios en el ERG de *flash* que se correlacionan con las respuestas en el ERG *pattern* en un modelo de glaucoma inducido por láser en monos. Asimismo, se ha descripto una reducción significativa en la amplitud de la onda b del ERG escotópico en ratas *Brown Norway* con inyección de solución hipertónica salina en una vena epiescleral (Chauhan y col., 2002).

Aunque los VEPs reflejan la actividad de todas las células de la vía óptica desde los fotorreceptores a la corteza visual, incluyendo las CGRs y sus axones, pocos estudios han evaluado previamente los VEPs en modelos experimentales de glaucoma en roedores. En humanos, se ha demostrado que el glaucoma afecta los VEPs provocando tanto reducciones

en la amplitud (Papst y col., 1984) como aumentos en la latencia (Towle y col., 1983). Sin embargo, más recientemente (Grippo y col., 2006) se demostraron sólo retrasos moderados en los VEPs de ojos con daño glaucomatoso. Los resultados obtenidos en esta Tesis indican una disminución significativa en la amplitud (pero no en la latencia) del componente N2-P2 del VEP en ojos expuestos a hipertensión ocular inducida por CS, que podría deberse a una reducción en la llegada de señales a la corteza visual y/o a alteraciones a nivel cortical. En concordancia con estos resultados, se demostró una reducción en la amplitud de los VEPs en monos con glaucoma experimental (Johnson y col., 1989). A pesar de las diferencias inter-especie en los generadores neuronales de los componentes del VEP, es posible que esta respuesta se origine en la corteza. Por lo tanto, es tentador especular que las inyecciones crónicas de CS puedan afectar la respuesta post-sináptica del nervio óptico, además de las CGRs y la cabeza del nervio óptico. La disfunción retiniana descripta resultó dependiente del tiempo de hipertensión ocular, ya que se observó una mayor disminución del ERG y del VEP a las 10 que a las 6 semanas de hipertensión ocular, y no se observaron cambios en estos parámetros después de 3 semanas de tratamiento con CS.

En cuanto a la arquitectura de la retina, se observó un daño significativo limitado a la CCG y los axones del nervio óptico en los ojos inyectados con CS después de 10 semanas de tratamiento. En los ojos inyectados con vehículo, se observó una morfología intacta y compatible con un nervio óptico sano. Los axones individuales fueron generalmente uniformes y con un empaquetamiento estrecho formando las fibras del nervio. Por el contrario, en los ojos hipertensos se observó una pérdida total de la integridad del nervio, así como una alteración en la forma de los axones. Además, resultó evidente una disminución marcada en el número de axones, siendo los axones grandes significativamente más vulnerables que las fibras de diámetro pequeño. Parece poco probable que este resultado pueda atribuirse a un encogimiento de los axones, ya que en la distribución del diámetro

axonal no se observaron cambios hacia diámetros más pequeños. Esta pérdida de uniformidad a nivel de axones individuales podría explicar la pérdida total de uniformidad e integridad del nervio óptico. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado una pérdida preferencial de los axones grandes del nervio óptico en otros modelos de glaucoma experimental en ratas y monos (Levkovitch-Verbin y col., 2002; Glovinsky y col., 1991). En suma, estos resultados indican que inyecciones semanales de CS indujeron una elevación moderada y sostenida de la PIO, que a su vez, provocó alteraciones significativas en la función y la histología retiniana, compatibles con las alteraciones inducidas por el glaucoma humano de ángulo abierto. Por otra parte, junto con las evidencias que demuestran mayores niveles de CS en la malla trabecular de pacientes con glaucoma, estos resultados avalan que el aumento de los niveles de CS podría desempeñar un papel clave en la desregulación de la PIO característica del glaucoma.

Una vez desarrollado un modelo experimental que reproduce características centrales del glaucoma humano, se utilizó este modelo para analizar las alteraciones del sistema visual no formador de imagen. Los resultados obtenidos indican que la hipertensión ocular crónica indujo una disminución significativa en el número de células ganglionares que contienen melanopsina (mCGRs) y en los niveles de melanopsina, pero no en los niveles de rodopsina. Además, estos resultados indican que el glaucoma experimental inducido por inyecciones crónicas de CS provocó alteraciones significativas en el sistema visual no formador de imagen, tales como el RP, la supresión nocturna de melatonina pineal, la expresión de c-Fos en los NSQ inducidas por luz y el ritmo de actividad locomotora.

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se traduce en la pérdida de CGRs. Estudios previos han demostrado diversos grados de pérdida de CGRs dependiendo del modelo de hipertensión ocular y la especie animal utilizada. En este estudio, se observó una disminución significativa en el número de mCGRs (~ 45%) y en los niveles de

melanopsina (~ 50%) luego de 10 (pero no de 6) semanas de hipertensión ocular. El número de CGRs que inervan el colículo superior (marcadas con Fluorogold) y los niveles de Thy-1 disminuyeron significativamente un 40% y un 45%, respectivamente, luego de 10 semanas de hipertensión ocular crónica inducida por inyecciones semanales de CS. Dado que la disminución en el número de mCGRs y en los niveles de melanopsina fue similar a la observada para CGRs positivas para Fluorogold y en los niveles de Thy-1 respectivamente, estos resultados indican que las mCGRs son similarmente vulnerables a los efectos deletéreos de la hipertensión ocular que el resto de las células ganglionares. En contraste con este resultado, Li y col. (2006) utilizando un modelo experimental de glaucoma inducido por la fotocoagulación con láser de argón de las venas epiesclerales y límbicas en ratas *Sprague-Dawley* demostraron que las mCGRs son resistentes incluso después de 12 semanas de hipertensión ocular. En otro estudio, se demostró que en ratones C57/BL6 un mes después de la axotomía del nervio óptico, disminuye significativamente el número de CGRs, en tanto que la densidad de las mCGRs no cae significativamente (Robinson y Madison, 2004). Sin embargo, Wang y col., (2008) demostraron una pérdida significativa de las mCGRs en otro modelo experimental de glaucoma inducido por cauterización de tres venas epiesclerales en ratas *Wistar*. Por lo tanto, parece posible que el modelo experimental de glaucoma, así como la cepa de ratas utilizada podría explicar la discrepancia entre el trabajo de Li y col., (2006) y los presentes resultados. En necesario recalcar que los resultados anteriores se basaron en estudios inmunohistoquímicos, mientras que en el presente trabajo de Tesis, la disminución en los niveles de melanopsina también fue demostrado por *Western blot*. En concordancia con estos resultados, se demostró una reducción significativa en los niveles de ARNm de melanopsina en ratas *Wistar* en el modelo de glaucoma inducido por tratamiento con láser de argón de las venas epiesclerales (Wang y col., 2008).

El gran número de proyecciones centrales proveniente de las mCGRs podría indicar numerosas funciones (Hattar y col., 2002; Lucas y col., 2003; Gooley y col., 2003; Hannibal y col., 2004). Con el fin de identificar estas funciones, varios grupos crearon ratones nulos para melanopsina, con la interesante paradoja de que después de años de buscar un fotopigmento circadiano, se obtuvo éxito luego de deshacerse de las células que lo producen (Guler y col., 2008; Hatori y col., 2008; Hattar y col., 2003; Mrosovsky y Hattar, 2003; Panda y col., 2003; Panda y col., 2002; Ruby y col., 2002). Considerando que el glaucoma experimental inducido por inyecciones semanales de CS provocó una disminución en los niveles de melanopsina, así como en el número de mCGRs, este modelo podría ser una nueva herramienta para estudiar funciones relacionadas con este tipo particular de CGRs.

Diversas líneas de evidencia demuestran defectos en el RP aferente en pacientes con glaucoma (Kaback y col., 1976; Kohn y col., 1979; Prywes, 1976). Sin embargo, un número muy reducido de estudios han examinado el RP en modelos experimentales de glaucoma en ratas. En ese sentido, se demostró un déficit significativo del RP que se correlaciona con los niveles de PIO en ratas *Brown Norway* con glaucoma experimental inducido por la cauterización de 3 venas vórtice y 2 venas epiesclerales (Grozdanic y col., 2003). Los resultados de esta Tesis indican una disminución de la constricción de la pupila en ratas con glaucoma experimental inducido por inyecciones semanales de CS. Históricamente, se consideró que las señales neuronales desencadenadas por la luz que inducen el RP se originan exclusivamente a partir de los conos y bastones. Sin embargo, más recientemente se demostró que las mCGRs pueden contribuir de manera significativa al mantenimiento de la contracción de la pupila en respuesta a estímulos luminosos de 30 s o más, incluso a bajas irradiancias, y que las respuestas fóticas de los conos se adaptan considerablemente y contribuyen poco a estímulos de luz de 30 s, aunque la respuesta de los bastones se adapta menos y contribuye significativamente al mantenimiento de la contracción de la pupila frente a estímulos

luminosos de estado-estacionario en niveles de irradiación que se encuentran por debajo del umbral de la fotorrespuesta de la melanopsina (McDougal y Gamlin, 2010). En este trabajo, se utilizó un estímulo luminoso de 30 s con el fin de evitar la contribución de los conos. Dado que no se observaron cambios en los niveles de rodopsina en los ojos tratados con CS, parece probable que la disminución del RP se pueda atribuir a una alteración en el sistema de melanopsina. Si bien no se observaron cambios en los niveles de melanopsina y en el número de mCGRs en ojos inyectados con CS durante 6 semanas, se observó una disminución significativa del RP a las 6 y 10 semanas de hipertensión ocular. Se ha demostrado que los cambios funcionales e histológicos progresan con la evolución del glaucoma y que la perturbación funcional es anterior a los cambios morfológicos (Moreno y col., 2005; Belforte y col., 2010). Los resultados obtenidos sugieren que el RP puede ser un indicador no invasivo y sensible de la disfunción del sistema de melanopsina, dado que este parámetro reveló una alteración en un momento en el que los niveles de melanopsina parecen relativamente normales.

La supresión aguda de la síntesis de melatonina inducida por un estímulo luminoso es un claro indicador de la llegada de información fótica a los NSQ (Brainard y col., 1997). La luz, procesada en las mCGRs se transmite a través del tracto retinohipotalámico (TRH) hacia los NSQ que conecta a la retina con la glándula pineal, a través de una vía neural multisináptica. La luz tiene dos efectos sobre la secreción de melatonina pineal (Lewy y col., 1980): 1) los ciclos de luz-oscuridad sincronizan el ritmo circadiano de su secreción, y 2) luz de intensidad y duración suficientes inhibe bruscamente su secreción (Pérez- Rico y col., 2009; 2010). El espectro de acción para la supresión de melatonina inducida por la luz en la glándula pineal humana permitió identificar un máximo en 446 - 477 nm de longitud de onda como la región más sensible para la regulación de la secreción de melatonina (Brainard y col., 2001; Thapan y col., 2001), lo que sugiere que un fotopigmento distinto del de los bastones y los conos

puede ser el principal responsable de la regulación de melatonina en el ojo humano. Por otra parte, se demostró que la exposición de ratas a la luz blanca y azul durante 15 minutos suprimen en forma similar la actividad de AA-NAT de la glándula pineal de rata (Jarmak y col., 1998). Como se muestra en este trabajo, la luz azul redujo significativamente la producción nocturna de melatonina pineal en los animales inyectados con vehículo en forma bilateral por 10 semanas, pero fue ineficaz para la supresión de secreción nocturna de melatonina en animales con glaucoma; mientras que la luz blanca disminuyó significativamente este parámetro en ambos grupos. A pesar de que numerosas evidencias avalan la idea de que las mCGRs constituyen la vía principal de fototransducción neuroendócrina (Brainard y col., 2001), el hecho de que la luz blanca suprimiera significativamente los niveles de melatonina nocturna en los animales tratados con vehículo o CS podría sugerir que los conos y bastones desempeñan un rol trascendente en la generación de esta respuesta en la rata. De hecho, la luz policromática es más eficaz en la supresión de la melatonina nocturna en humanos que la luz monocromática azul (en el rango de longitud de onda para la estimulación de melanopsina), lo que implica que esta respuesta no estaría regulada solamente por melanopsina (Revell y Skene, 2007). Los resultados obtenidos demuestran que los niveles nocturnos de melatonina pineal fueron significativamente menores en animales glaucomatosos que en los controles. En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que el glaucoma experimental induce una disminución significativa en la síntesis retiniana de melatonina (Moreno y col., 2004). Considerando que en la retina, la melatonina es sintetizada a través de la misma vía que la descripta en la glándula pineal, no es del todo sorprendente que el glaucoma puede afectar tanto la biosíntesis pineal como retiniana del metoxiindol.

Como se muestra en este trabajo, la sensibilidad del RP a la luz blanca disminuyó, mientras que la sensibilidad de la supresión de melatonina por luz blanca permaneció intacta en los

animales con glaucoma experimental. En este sentido, debe tenerse en cuenta que las proyecciones de las mCGRs al núcleo pretectal olivar son responsables del RP, mientras que la vía mCGRs → TRH → NSQ → glándula pineal está implicada en la supresión nocturna de melatonina pineal por la luz. Por lo tanto, parece posible que el glaucoma experimental pueda afectar diferencialmente a estas vías. En este sentido, se ha previsto en un futuro próximo analizar la regulación diferencial de estas vías en animales con glaucoma.

El proto-oncogen c-fos produce la fosfoproteína FOS, un factor de transcripción capaz de regular la transcripción de diversos genes (Morgan y Curran, 1991). En los NSQ, la inducción de c-fos está principalmente regulada por la luz ambiental. Las células de los NSQ que expresan c-Fos se limitan inicialmente a las zonas retinoceptivas, y posteriormente la activación neuronal avanza hacia la porción dorsomedial. La inyección intracerebroventricular de oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de Fos puede bloquear los cambios de fase inducidos por luz en el ritmo de actividad (Wollnik y col., 1995). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inducción de c-fos en los NSQ está involucrada en la sincronización fótica (Schwartz y col., 1995; Takahashi, 1995; Wollnik, y col., 1995), o al menos podría ser utilizado como un marcador de la activación fótica en los NSQ. En este estudio, la expresión de c-Fos inducida por luz se utilizó para investigar la respuesta funcional fótica de los NSQ en ratas con glaucoma. La luz indujo una expresión significativa de c-Fos en ambos grupos, sin embargo, este parámetro fue significativamente menor en los animales inyectados bilateralmente con CS que en los inyectados con vehículo, lo que sugiere que el glaucoma puede provocar un déficit en los cambios de fase del reloj circadiano de mamíferos inducidos por luz. En concordancia con estos resultados, recientemente se demostró que ratas con glaucoma inducido por el tratamiento de venas epiesclerales con laser argón son capaces de sincronizar su actividad locomotora a cambios de fase en el ciclo de luz-oscuridad, pero requieren más tiempo para readaptarse a un cambio

en el ciclo LD y muestran una variabilidad significativamente mayor en el inicio de la actividad, en comparación con ratas normales ((Drouyer y col., 2008). Por otra parte, se demostró una reducción significativa en los terminales axónicos de las CGRs en los NSQ, el principal blanco de la inervación casi exclusiva de las mCGRs (Panda y col., 2003). En el trabajo mencionado, se demostró una disminución no sólo en los niveles de ARNm para melanopsina, sino también en los niveles del ARNm para rodopsina. Por lo tanto, los resultados obtenidos por este grupo deben tener en cuenta la contribución de los fotorreceptores clásicos. Por el contrario, en el modelo experimental de glaucoma inducido por inyecciones semanales de CS no se observaron cambios en los niveles de la rodopsina, lo que sugiere que los cambios descriptos podrían ser exclusivamente atribuibles a la reducción en los niveles de melanopsina.

En este trabajo de Tesis, se registró la actividad locomotora en animales inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. Las ratas inyectadas con CS mostraron ritmos circadianos de actividad normales en el ciclo L:D y fueron capaces de sincronizar a cambios de fase en ambos sentidos del fotoperíodo (adelantos y retrasos de fase). Sin embargo, mientras que los animales inyectados con vehículo mostraron un inicio de actividad que coincidía con el apagado de las luces, el inicio de la actividad en las ratas inyectadas con CS se retrasó significativamente respecto al apagado de las luces. Esto podría interpretarse como un déficit en el ajuste de la sincronización fótica, como una falta de la respuesta de enmascaramiento por el apagado de las luces, o ambas. Es importante señalar que tanto la sincronización como el enmascaramiento contribuyen a la sincronización de los ritmos normales, y que ambos mecanismos dependen de una vía fotorreceptiva circadiana intacta (Golombek y Rosenstein, 2010). Los animales nocturnos bajo condiciones de iluminación artificial presentan poca actividad durante la fase de luz del fotoperíodo. En este estudio, las ratas con glaucoma fueron significativamente más activas que las ratas control durante la fase de luz, lo que

sugiere una disminución en el mecanismo de sincronización fótica (o, en este caso, en el enmascaramiento negativo a la luz). Estas diferencias generales en la sincronización podrían representar una alteración en el mecanismo de fototransducción en el TRH que se traduciría en una comunicación deficiente entre los relojes de la retina y de los NSQ. Experimentos futuros permitirán discernir si estos cambios afectan efectos paramétricos (fotoperíodo), no paramétricos (cambios de fase inducidos por un pulso de luz) o el enmascaramiento (modulación directa de la conducta) de la luz. En conjunto, estos resultados indican que el glaucoma afecta no sólo a las funciones visuales formadoras de imágenes, sino también a las funciones visuales no formadoras de imagen, como el control del ritmo circadiano. Para evaluar la viabilidad de esta hipótesis en el glaucoma humano se analizaron los ritmos de actividad en un número por ahora reducido de pacientes con glaucoma avanzado (9) y sus respectivos controles (6), mediante el uso de actígrafos no invasivos, cuya utilidad ha sido ampliamente validada en estudios de diferentes grupos de investigación (Sadeh y col., 1995; Ancoli-Israel y col., 2003).

Se realizó el reclutamiento de pacientes sobre la base de un riguroso examen oftalmológico que incluyó el campo visual y la excavación papilar, como características patognomónicas de la enfermedad. Los pacientes fueron rigurosamente informados de los objetivos y los alcances del estudio, que fue aprobado por el comité de ética del Hospital Oftalmológico “Santa Lucía”.

A pesar del número relativamente reducido de pacientes con glaucoma y controles que hemos podido incluir en este estudio, los resultados obtenidos indican que el glaucoma podría alterar diversos parámetros relacionados con la actividad circadiana, particularmente la calidad de sueño. Si bien el tiempo total de sueño no varió entre ambos grupos, los pacientes con glaucoma presentaron menor eficiencia de sueño y mayor actividad, más minutos de vigilia y mayor cantidad de episodios de vigilia durante la noche, que el grupo control. En

concordancia, se demostró que pacientes con distinto grado de disfunción visual y daño en el nervio óptico son más propensos a presentar alteraciones en el sueño que pacientes con disfunción visual pero sin daño en el nervio óptico (Wee y col., 2004). En suma, estos resultados sugieren que el glaucoma no solo afecta las funciones visuales clásicas, sino también las funciones visuales que regulan y coordinan diversos componentes del sistema circadiano.

Si bien para los investigadores básicos los estudios en humanos representan un enorme desafío por razones diversas, uno de los objetivos centrales del trabajo de los investigadores básicos es incidir de alguna manera positiva en la calidad de vida de pacientes (particularmente en nuestro caso) que padecen una enfermedad visual invalidante como el glaucoma. El glaucoma puede afectar a la calidad de vida de varias maneras. Estas incluyen los efectos visuales de la propia enfermedad (disminución del campo visual), los efectos psicológicos del diagnóstico (el temor a la ceguera), los posibles efectos secundarios del tratamiento (médico o quirúrgico), y los efectos económicos (el costo de las consultas y los tratamientos). Como se muestra en este trabajo, el glaucoma podría provocar alteraciones no sólo visuales, sino también en funciones no visuales. Además de problemas de sueño, trastornos del ritmo circadiano pueden provocar falta de concentración, menor rendimiento, disminución de habilidades cognitivas, coordinación psicomotora pobre, y dolores de cabeza, entre muchos otros. Existen diversas estrategias terapéuticas para restablecer el equilibrio circadiano. De esta forma, mediante la identificación de los trastornos circadianos en el glaucoma, estos resultados podrían contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad ocular.

Consecuencias conceptuales de los resultados

Los seres humanos tenemos la capacidad única de desafiar en forma consciente y oponernos a nuestros propios relojes biológicos y nuestros ritmos diarios (trabajo por turnos, vuelos transmeridianos, etc.). Los organismos vivos han evolucionado para hacer frente a una de las características más conspicuas del planeta, los ciclos diarios de luz y oscuridad (Dunlap y Loros, 2004). En este contexto, la luz es la principal señal ambiental que permite a los organismos sincronizarse con el ciclo día-noche. Es notable que la luz actúe como un estímulo específico para dos sentidos mediados a través de un único órgano sensorial, el ojo. El nexo entre la luz y el tiempo en la intrincada red neuronal del hombre es, ciertamente, intrigante. En este sentido, Granit (1950) fue pionero al referirse a "nuestro más noble órgano de los sentidos" cuando se refirió a cómo se organiza la interpretación compleja del mundo de la luz, la forma y el color. Sin embargo, esta descripción tiene hoy un peso aún mayor en vista de la nueva concepción del ojo como un "órgano con doble sentido" que vincula no sólo la luz y la visión, sino también la luz y el tiempo. Un órgano sensorial suele ser capaz de recibir sólo un determinado tipo de estímulo, por lo que sólo puede interpretar ciertos tipos de comunicación con el medio ambiente. En el caso del ojo, sólo una fracción muy limitada del espectro electromagnético es detectable. Sin embargo, la luz del sol o de fuentes artificiales, en particular, en el espectro azul-verde, proporciona estímulos electromagnéticos específicos para fotorreceptores no clásicos de la retina, a través de los cuales se envía la información temporal diaria para los NSQ. Esta información es luego utilizada por los NSQ para ajustar los de otro modo menos eficientes ritmos biológicos internos, con las condiciones de iluminación ambiental. Junto con los fotorreceptores clásicos que permiten sobre todo la formación de imágenes, el hombre y otras especies tienen fotorreceptores que además de una serie de respuestas a la luz no formadoras de imagen, transmiten información crucial sobre el "tiempo" y de esta manera, pueden producir impactos profundos sobre el sistema circadiano.

Además de la vía de transmisión de luz-oscuridad, el hecho de que la retina pueda contener un reloj circadiano autónomo en las CGRs sugiere que la organización del sistema circadiano podría ser más compleja de lo que originalmente se supuso. Esta función de la retina solo recientemente reconocida podría estar “amenazada” particularmente en una afección ocular prevalente como es el glaucoma, lo que constituye un factor adicional a tener en cuenta en la evaluación y la terapéutica de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- La retina de hámster es capaz de liberar PGs en forma espontánea, con valores más altos a medianoche que a mediodía y a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo. Estas variaciones persistieron en animales con lesión de los NSQ.
- Los niveles de COX-1 (pero no de COX-2) fueron más altos a medianoche que a mediodía en la retina de hámster; estas variaciones persistieron aún en oscuridad constante. Estas enzimas se localizaron en la retina interna (pero no externa), sobre todo en la capa de células ganglionares y la capa nuclear interna.
- Los niveles nucleares (pero no citosólicos) de CLOCK y BMAL1 en la retina de hámster muestra variaciones diarias significativas, con valores mayores a mediodía que a medianoche, que se mantienen incluso en oscuridad constante. Estas proteínas se expresan exclusivamente en la capa de células ganglionares en la retina de hámster.
- La expresión de CLOCK y BMAL1 está regulada por un reloj circadiano retiniano parcialmente independiente de los NSQ.
- Inyecciones semanales de CS producen un aumento significativo de la PIO que alcanza un nivel de estado estacionario, similar al provocado por una inyección única de CS, y que se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas).
- Las inyecciones semanales de CS inducen una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico y de los VEPs, que fue evidente a partir de las 6 semanas de hipertensión ocular y progresó en períodos posteriores.
- Las inyecciones crónicas de CS inducen un daño significativo en la morfología de la retina limitado a la CCG que es evidente a las 10 semanas de hipertensión ocular. Se observó una alteración de la forma de los axones y una disminución marcada en el número de axones, siendo los axones grandes más vulnerables que las fibras de diámetro pequeño.

- La hipertensión ocular crónica induce una disminución significativa en el número de células ganglionares que contienen melanopsina (mCGRs) y en los niveles de melanopsina y Thy-1, pero no en los niveles de rodopsina.

- Las mCGRs son vulnerables a los efectos deletéreos de la hipertensión ocular en forma similar al total de las células ganglionares.

- Las inyecciones semanales de CS inducen una disminución del reflejo pupilar aferente que es evidente ya a partir de las 6 semanas de hipertensión ocular, probablemente debido a una alteración en el sistema de melanopsina.

- La luz blanca reduce significativamente la producción nocturna de melatonina pineal en ratas inyectadas con vehículo o CS en forma bilateral por 10 semanas, mientras que la luz azul sólo reduce significativamente este parámetro en animales inyectados con vehículo.

- La luz induce una expresión significativa de c-Fos en animales inyectados bilateralmente con vehículo o CS durante 10 semanas, sin embargo, este parámetro fue significativamente menor en los animales inyectados bilateralmente con CS que en los inyectados con vehículo.

- Las ratas inyectadas con CS en forma bilateral durante 10 semanas presentan ritmos circadianos normales de actividad en el ciclo L:D y son capaces de sincronizar a cambios de fase en ambos sentidos del fotoperíodo (adelantos y retrasos de fase). Sin embargo, los animales inyectados con vehículo muestran un inicio de actividad que coincide con el apagado de las luces, mientras que el inicio de la actividad en las ratas inyectadas con CS se retrasó significativamente del apagado de las luces.

- Los animales inyectados con CS en forma bilateral durante 10 semanas son significativamente más activos durante la fase de luz del fotoperíodo que los inyectados con vehículo.

- Pacientes con glaucoma de ángulo abierto avanzado presentan alteraciones en diversos parámetros relacionados con la actividad circadiana, particularmente la calidad y cantidad de sueño.

- Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res*. 2001; 916(1-2):172-91.

- Acott TS, Westcott M, Passo MS, Van Buskirk EM. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26:1320-29.

- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(12):5168-73.

- Alm A, Villumsen J. Effects of topically applied PGF2 alpha and its isopropylester on normal and glaucomatous human eyes. *Prog Clin Biol Res*. 1989;312:447-58.

- al-Zadjali KH, Imler MP, Ohia SE. Inhibitory effect of prostaglandins on dopamine release from the retina. *Gen Pharmacol*. 1994; 25(2):289-96.

- Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep* 2003; 26(3):342-92.

- Anderson FE, Green CB. Symphony of rhythms in the Xenopus laevis retina. *Microsc Res Tech*. 2000; 50(5):360-72.

- Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL, John SW. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet*. 2002; 30(1):81-5.

- Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1960; 25:11-28.

- Aschoff J, Hoffmann K, Pohl H, Wever R. Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia* 1975; 2(1):23-78.

- Aschoff J, von Goetz C. Masking of circadian activity rhythms in hamsters by darkness. *J Comp Physiol A*. 1988;162(4):559-62.

- Barany EH, Scotchbrook S. Influence of testicular hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. *Acta Physiol Scand*. 1954; 30(2-3):240-8.

- Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81(7):2142-6.

- Barnard AR, Appleford JM, Sekaran S, Chinthapalli K, Jenkins A, Seeliger M, Biel M, Humphries P, Douglas RH, Wenzel A, Foster RG, Hankins MW, Lucas RJ. Residual photosensitivity in mice lacking both rod opsin and cone photoreceptor cyclic nucleotide gated channel 3 alpha subunit. *Vis Neurosci*. 2004; 21: 675-83.

- Barnard AR, Hattar S, Hankins MW, Lucas RJ. Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr Biol*. 2006; 16(4):389-95.

- Bassi CJ, Powers MK. Circadian rhythm in goldfish visual sensitivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987; 28(11):1811-5

- Bayer AU, Danias J, Brodie S, Maag KP, Chen B, Shen F, Podos SM, Mittag TW. Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*. 2001a; 72: 667-77.

- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, et al. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001b; 42:1258-65.

- Bazan NG. Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid. *Prog Clin Biol Res*. 1989; 312:15-37.

- Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol*. 2003; 460(3):380-93.

- Belforte N, Sande PH, de Zavalia N, Knepper PA, Rosenstein RE. Chondroitin sulphate increases intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(11):5768-75.

- Benozzi J, Jaliffa CO, Firpo Lacoste F, Llomovatte DW, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of brimonidine on rabbit trabecular meshwork hyaluronidase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(8):2268-72.

- Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, Rosenstein RE. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 2196-200.

- Beaulé C, Robinson B, Lamont EW, Amir S. Melanopsin in the circadian timing system. *J Mol Neurosci*. 2003;21(1):73-89.

- Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295(5557):1070-73.

- Besharse JC, Iuvonne, PM. Circadian clock in Xenopus eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* 1983; 305: 133-5.

- Bhattacherjee P, Hammond BR. Inhibition of increased permeability of the blood-aqueous barrier by non-steroidal anti-inflammatory compounds as demonstrated by fluorescein angiography. *Exp Eye Res*. 1975; 21(6):499-505.

- Bhattacherjee P, Paterson CA. Further investigation into the ocular effects of prostaglandin E2, leukotriene B4 and formyl-methionyl-leucyl phenylalanine. *Exp Eye Res*. 1990; 51(1):93-6.

- Bilak M, Wu L, Wang Q, Haughey N, Conant K, St Hillaire C, Andreasson K. PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2004; 56(2):240-8.

- Bill A, Phillips CI. Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Exp Eye Res*. 1971. 12(3):275-81.

- Bill A. A reply to R. Tripathi: uveoscleral drainage of aqueous humor. *Exp Eye Res*. 1977; 25 Suppl: 309-10.

- Birkle DL, Bazan NG. Effect of K+ depolarization on the synthesis of prostaglandins and hydroxyeicosatetra(5,8,11,14)enoic acids (HETE) in the rat retina. Evidence for esterification of 12-HETE in lipids. *Biochim Biophys Acta*. 1984a; 795(3):564-73.

- Birkle DL, Bazan NG. Lipoxygenase- and cyclooxygenase-reaction products and incorporation into glycerolipids or radiolabeled arachidonic acid in the bovine retina. *Prostaglandins* 1984b; 27: 203-16.

- Birkle DL, Bazan NG. The arachidonic acid cascade and phospholipid and docosahexanoic acid metabolism in retina, in *Progress in Retinal Research*, Vol. 5 (Osborn N. and Chader G., eds), pp. 309–335. Pergamon Press, London, 1986.

- Bito LZ. A physiological approach to glaucoma management: the use of local hormones and the pharmacokinetics of prostaglandin esters. *Prog Clin Biol Res*. 1989; 312:329-47.

- Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, De Franco I, Perfetti S, Varotto A, Tenna V. Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 1998; 105(2):209-15.

- Brainard GC, Rollag MD, Hanifin JP. Photic regulation of melatonin in humans: ocular and neural signal transduction. *J Biol Rhythms*. 1997; 12(6):537-46.

- Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*. 2001; 21: 6405-12.

- Brann MR, Cohen LV. Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. *Science* 1987; 235: 585-7.

- Cahill GM, Besharse JC. Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. *Neuron* 1993; 10: 573-7.

- Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: Regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog Ret Eye Res*. 1995; 14:267-91.

- Cavallaro B, Burnside B. Prostaglandins E1, E2, and D2 induce dark-adaptive retinomotor movements in teleost retinal cones and RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29(6):882-91.

- Cernea P. The resistance to drainage of the aqueous humor. *Oftalmologia* 1993; 37(4):289-98.

- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a

chronic pressureinduced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 2969-76.

- Chaurasia SS, Rollag MD, Jiang G, Hayes WP, Haque R, Natesan A, Zatz M, Tosini G, Liu C, Korf HW, Iuvone PM, and Provencio I. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem*. 2005; 92: 158-70.

- Choong YF, Devarajan N, Pickering A, Pickering S, Austin MW. Initial management of ocular hypertension and primary open-angle glaucoma: an evaluation of the royal college of ophthalmologists' guidelines. *Eye* 2003; 17(6):685-9.

- Clark CV, Mapstone R. Pupil cycle time in primary closed-angle glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 1986; 21(3):88-91.

- Cole RJ, Kripke DF. Progress in automatic sleep/wake scoring by wrist actigraph. *Sleep Res.*1988;17:331

- Colwell CS. Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol*. 2000; 43(4):379-88.

- Cyran SA, Yiannoulos G, Buchsbaum AM, Saez L, Young MW, Blau J. The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the Drosophila clock protein period. *J Neurosci*. 2005; 25(22):5430-7.

- Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF 3rd. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*. 1995; 332(1):6-11.

- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005; 433: 749-54.

- Daubs JG, Crick RP. Effect of refractive error on the risk of ocular hypertension and open angle glaucoma. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1981; 101(1):121-6.

- David R, Livingston D, Luntz MH. Ocular hypertension: a comparative follow-up of black and white patients. *Br J Ophthalmol*. 1978; 62(10):676-8.

- Dentchev T, Yao Y, Pratico D, Dunaief J. Isoprostane F2alpha-VI, a new marker of oxidative stress, increases following light damage to the mouse retina. *Mol Vis*. 2007;13:190-5.

- DeSantis L, Garth Waite C, Knepper PA. Dexamethasone induction of ocular hypertension in the primate [ARVO abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31:488.

- Dinet V, Korf HW. Impact of melatonin receptors on pCREB and clock-gene protein levels in the murine retina. *Cell Tissue Res.* 2007a; 330(1):29-34.

- Dinet V, Ansari N, Torres-Farfan C, Korf HW. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J Pineal Res.* 2007; 42(1):83-91

- Dmitriev AV, Mangel SC. Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina. *J Neurosci*. 2001; 21: 2897-902.

- Dorenbos R, Contini M, Hirasawa H, Gustincich S, Raviola E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci*. 2007; 24(4):573-80.

- Dowling JE. Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system in the neuroscience. *Fourh Study Program.* Schmitt and Worden (eds.) 1979. Cambridge, Mass, MIT press.

- Doyle SE, Grace MS, McIvor W, Menaker M. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci*. 2002a;19(5):593-601.

- Doyle SE, McIvor WE, Menaker M. Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *J Neurochem.* 2002b; 83(1):211-9.

- Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One* 2008; 3(12):e3931.

- Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287(4):R735-41.

- Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96(2):271-90.

- Dunlap JC, Loros JJ. The neurospora circadian system. *J Biol Rhythms* 2004; 19(5):414-24.

- Eakins KE, Bhattacherjee P. Histamine, prostaglandins and ocular inflammation. *Exp Eye Res*. 1977; 24(3):299-305.

- Edmunds B, Thompson JR, Salmon JF, Wormald RP. The National Survey of Trabeculectomy. I. Sample and methods. *Eye* 1999; 13 (Pt 4):524-30.

- Faillace MP, Sarmiento MI, Siri LN, Rosenstein RE. Diurnal variations in cyclic AMP and melatonin content of golden hamster retina. *J Neurochem*. 1994; 62(5):1995-2000.

- Fang C, Jiang Z, Tomlinson DR. Expression of constitutive cyclo-oxygenase (COX-1) in rats with streptozotocin-induced diabetes; effects of treatment with evening primrose oil or an aldose reductase inhibitor on COX-1 mRNA levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56(2): 157-63.

- Fine BS, Yanoff M, Stone RA. A clinicopathologic study of four cases of primary open-angle glaucoma compared to normal eyes. *Am J Ophthalmol.* 1981; 91(1):88-105.

- Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W, Menaker M. Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*. 1991; 169(1):39-50.

- Francois J, Benozzi G, Victoria-Troncoso V, Bohyn W. Ultrastructural and morphometric study of corticosteroid glaucoma in rabbits. *Ophthalmic Res*. 1984; 16(3):168-78.

- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z, Foster R. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284: 502-504.

- Friedman WF, Molony DA, Kirkpatrick SE. Prostaglandins: physiological and clinical correlations. *Adv Pediatr*. 1978; 25:151-204.

- Fukuhara C, Dirden JC, Tosini G. Photic regulation of melatonin in rat retina and the role of proteasomal proteolysis. *Neuroreport* 2001; 12(17):3833-7.

- Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem*. 2004; 279(49):51172-81.

- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280(5369):1564-9.

- Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32:484-91.

- Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*. 2010; 90(3):1063-102.

- Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci*. 2003;23: 7093-106.

- Grace MS, Wang LM, Pickard GE, Besharse JC, Menaker M. The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Res*. 1996; 735(1):93-100.

- Granit R. Physiology of vision. *Annu Rev Physiol*. 1950;12:485-502.

- Green CB. Cryptochromes: tail-ored for distinct functions. *Curr Biol*. 2004;14: R847-849.

- Green CB, Besharse JC. Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14884-88.

- Grippo TM, Hood DC, Kanadani FN, Ezon I, Greenstein VC, Liebmann JM, Ritch R. A comparison between multifocal and conventional VEP latency changes secondary to glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47: 5331-6.

- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM. Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Exp Eye Res*. 2003; 77(1):27-33.

- Guido ME, Garbarino Pico E, and Caputto BL. Circadian regulation of phospholipid metabolism in retinal photoreceptors and ganglion cells. *J Neurochem*. 2001;76:835-45.

- Guler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao HW, Barnard AR, Cahill H, Badea TC, Zhao H, Hankins MW, Berson DM, Lucas RJ, Yau KW, Hattar S. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image forming vision. *Nature* 2008; 453: 102-5.

- Güldner FH. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp Brain Res*. 1983; 50(2-3):373-6.

- Hankins MW, Lucas RJ. The primary visual pathway in humans is regulated according to long-term light exposure through the action of a nonclassical photopigment. *Curr Biol*. 2002; 12: 191-8.

- Hankins MW, Peirson SN, and Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*. 2008; 31: 27-36.

- Hanna N, Peri KG, Abran D, Hardy P, Doke A, Lachapelle P, Roy MS, Orquin J, Varma DR, Chemtob S. Light induces peroxidation in retina by activating prostaglandin G/H synthase. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23(6):885-97.

- Hannibal J, Hindersson P, Ostergaard J, Georg B, Heegaard S, Larsen PJ, Fahrenkrug J. Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 4202-9.

- Hannibal J, Fahrenkrug J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 2004; 15(15):2317-20.

- Harms E, Kivimäe S, Young MW, Saez L. Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J Biol Rhythms*. 2004;19(5):361-73.

- Harooni M, Freilich JM, Abelson M, Refojo M. Efficacy of hyaluronidase in reducing increases in intraocular pressure related to the use of viscoelastic substances. *Arch Ophthalmol*. 2000; 118: 445-6.

- Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Schmedt C, Jegla T, Panda S. Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS ONE* 2008;3: e2451.

- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295(5557):1065-70.

- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003; 424(6944):76-81.

- Hayasaka S, Sears ML. Distribution of acid phosphatase, glucuronidase, and lysosomal hyaluronidase in the anterior chamber of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978; 17:982-7.

- Hayasaka N, LaRue SI, Green CB. In vivo disruption of Xenopus CLOCK in the retinal photoreceptor cells abolishes circadian melatonin rhythmicity without affecting its production levels. *J Neurosci*. 2002; 22(5):1600-7.

- Hoang N, Schleicher E, Kacprzak S, Bouly JP, Picot M, Wu W, Berndt A, Wolf E, Bittl R, Ahmad M. Human and Drosophila cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biol*. 2008; 6(7):e160.

- Hubbard WC, Johnson M, Gong H, Gabelt BT, Peterson JA, Sawhney R, Freddo T, Kaufman PL. Intraocular pressure and outflow facility are unchanged following acute and chronic intracameral chondroitinase ABC and hyaluronidase in monkeys. *Exp Eye Res*. 1997; 65(2):177-90

- Hubel D.H. Eye, brain and vision. Scientific American Library, W.H. Freeman (ed.), *serie # 22, New York* 1988.

- Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res*. 2005; 24(4):433-56.

- Ivanova TN, Iuvone PM. Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res*. 2003a; 973(1):56-63.

- Ivanova TN, Iuvone PM. Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells. *Brain Res*. 2003b; 991(1-2):96-103.

- Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 2005;171: 313-25.

- Jaliffa CO, Lacoste FF, Llomovatte DW, Sarmiento MI, Rosenstein RE. Dopamine decreases melatonin content in golden hamster retina. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 293(1):91-5.

- Jaliffa CO, Saenz D, Resnik E, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Res*. 2001; 912(2):195-202.

- Jarmak A, Zawilska JB, Nowak JZ. The effect of various wave lengths of light and various duration of impulse times on suppression of n-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *Klin Oczna*. 1998;100(2):77-80.

- Jean-Louis G, Zizi F, Lazzaro DR, Wolintz AH. Circadian rhythm dysfunction in glaucoma: A hypothesis. *J Circadian Rhythms* 2008; 6:1.

- Johnson M. 'What controls aqueous humour outflow resistance? *Exp Eye Res*. 2006; 82(4):545-57.

- Johnson MA, Drum BA, Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR. Pattern-evoked potentials and optic nerve fiber loss in monocular laser-induced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989; 30: 897-907.

- Jongebloed WL, Kalicharan D, Los LI, Worst JG. The Morgagnian and Brunescens cataract morphology studied with with SEM and TEM. *Eur J Morphol*. 1993; 31(1-2):97-102.

- Ju WK, Neufeld AH. Cellular localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the normal mouse, rat, and human retina. *J Comp Neurol*. 2002; 452: 392-9.

- Jurgens I, Matheu A, Castilla M. Ocular hypertension after cataract surgery: a comparison of three surgical techniques and two viscoelastics. *Ophthalmic Surg Lasers* 1997; 28:30-6.

- Kaback MB, Podos SM, Harbin TS, Jr, Mandell A, Becker B. The effects of dipivalyl epinephrine on the eye. *Am J Ophthalmol*. 1976;81(6):768-72.

- Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 330(1):18-26.

- Kandel E. Principios de neurociencia, McGraw-Hill Interamericana de España, 2001.

- Kanski JJ. Clinical Ophthalmology, 4d edition, *Elsevier Health Sciences*. 2005.

- Klein R, Moss SE, Klein BE. New management concepts for timely diagnosis of diabetic retinopathy treatable by photocoagulation. *Diabetes Care*. 1987; 10(5): 633-8.

- Klein D, Moore RY, Reppert SM. (Eds.). Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. Oxford University Press, Oxford. 1991.

- Klein BE, Klein R, Jensen SC. Open-angle glaucoma and older-onset diabetes. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1994; 101(7):1173-7.

- Knepper PA, Farbman AI, Telser AG. Exogenous hyaluronidases and degradation of hyaluronic acid in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984; 25(3):286-93.

- Knepper PA, Collins JA, Frederick R. Effects of dexamethasone, progesterone, and testosterone on IOP and GAGs in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26(8):1093-100.

- Knepper PA, Goossens W, Palmberg PF. Glycosaminoglycan stratification of the juxtacanalicular tissue in normal and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37(12):2414-25.

- Knepper PA, Fadel JR, Miller AM, Goossens W, Choi J, Nolan MJ, Whitmer S. Reconstitution of trabecular meshwork GAGs: influence of hyaluronic acid and chondroitin sulfate on flow rates. *J Glaucoma* 2005; 14(3):230-8.

- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 2005; 17(6):675-89.

- Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2006 (suppl. 2);15:R271.

- Ko GY, Ko ML, Dryer SE. Circadian regulation of cGMP-gated cationic channels of chick retinal cones. Erk MAP Kinase and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neuron* 2001; 29(1):255-66.

- Ko GY, Ko ML, Dryer SE. Circadian regulation of cGMP-gated channels of vertebrate cone photoreceptors: role of cAMP and Ras. *J Neurosci*. 2004; 24: 1296-304.

- Kohn AN, Moss AP, Podos SM. Relative afferent pupillary defects in glaucoma without characteristic field loss. *Arch Ophthalmol*. 1979; 97(2):294-6.

- Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2007; 18(1): 4-11.

- Kolker AE, Hetherington J Jr. Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas, 5th ed. St Louis, CV Mosby, 1981.

- Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV, Antoch MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev*. 2003;17(15):1921-32.

- Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971; 68(9):2112-6.

- Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC, Loewy AD. CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 2002;110(1):73-92.

- Kulkarni PS. Arachidonic acid metabolism in human and bovine retina. *J Ocul Pharmacol*. 1991 Summer; 7(2):135-9.

- LeDay AM, Kulkarni KH, Opere CA, Ohia SE. Arachidonic acid metabolites and peroxide-induced inhibition of [3H]D-aspartate release from bovine isolated retinae. *Curr Eye Res*. 2004; 28(5):367-72

- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 2001;107(7):855-67.

- Lerner LE, Polansky JR, Howes EL, Stern R. Hyaluronan in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38(6):1222-8.

- Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP. Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113(7):918-24.

- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 402-10.

- Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, New-Some DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210:1267-9.

- Li RS, Chen BY, Tay DK, Chan HH, Pu ML, So KF. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are more injury-resistant in a chronic ocular hypertension model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(7):2951-8.

- Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(41):16009-14.

- Liu JH. Circadian variations of prostaglandins in the rabbit aqueous humor. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2000; 16: 49–54.

- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000; 288(5465):483-92.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.

- Lozano-Elizondo D. Prolífico genio en oftalmología: Albrecht Von Graefe (1828-1870). *Rev Mex Oftalmol*. 2010; 84(2):132-6.

- Lucas RJ, Foster RG. An in vivo comparison of retinal and pineal melatonin production in C3H mice with normal and degenerate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38: S54.

- Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez JM, Foster RG. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284: 505-7.

- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003; 299: 245-7.

- Macknight AD, McLaughlin CW, Peart D, Purves RD, Carre DA, Civan MM. Formation of the aqueous humor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(1-2):100-6.

- Maihöfner C, Tegeder I, Euchenhofer C, deWitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G. Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience* 2000;101(4):1093-108.

- Manglapus MK, Iuvone PM, Underwood H, Pierce ME, Barlow RB. Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. *J Neurosci*. 1999; 19(10): 4132-41.

- Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 2001a; 4(9):877-86.

- Masland RH. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*. 2001b; 11(4): 431-6.

- Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*. 2003; 15(4):329-34.

- McDougal DH, Gamlin PD. The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex. *Vision Res*. 2010; 50(1):72-87.

- Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*. 1989; 69(3):671-707.

- Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS, Prata JA Jr, Rao NA. Aqueous humor dynamics in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1996; 234 Suppl 1: S198-203.

- Menaker M. Circadian rhythms: Circadian photoreception. *Science* 2003; 299(5604):213-4.

- Milch FA, Yannuzzi LA. Medical and surgical treatment of aphakic cystoid macular edema. *Int Ophthalmol Clin*. 1987 Fall;27(3):205-17.

- Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6097-102.

- Miyazaki K, Mesaki M, Ishida N. Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(19): 6651-9.

- Miyazaki K, Nagase T, Mesaki M, Narukawa J, Ohara O, Ishida N. Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts. *Biochem J*. 2004; 380(Pt 1):95-103.

- Moga MM, Moore RY. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1997; 389(3):508-34.

- Moore CG, Epley D, Milne ST, Morrison JC. Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye. *Curr Eye Res*. 1995;14(8):711-7.

- Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the organization of CNS circadian rhythm. *Trends Neurosci*. 1983; 5: 404-7.

- Moore RY, Card JP. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Ann N Y Acad Sci*. 1985; 453:123-33.

- Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*. 1996; 73:125-130.

- Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sánez DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(6):803-12.

- Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, Sande PH, Campanelli J, Jaliffa CO, Benozzi J, Rosenstein RE. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*. 2005; 81(1): 71-80.

- Morgan JL, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inductible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Physiol*. 1991; 14: 421-51.

- Morin LP. The circadian visual system. *Brain Res Brain Res Rev*. 1994;19(1):102-27.

- Morin LP, Blanchard JH, Provencio I. Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol*. 2003; 465(3):401-16.

- Morin LP, Allen CN. The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*. 2006; 51(1):1-60.

- Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69:165-75.

- Morrison JC, Dorman-Pease ME, Dunkelberger GR, Quigley HA. Optic nerve head extracellular matrix in primary optic atrophy and experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108(7):1020-4.

- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*. 1997; 64(1):85-96.

- Mrosovsky N. Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int*. 1999; 16(4):415-29.

- Mrosovsky N, Hattar S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int*. 2003; 20: 989-99.

- Muñoz E, Brewer M, Baler R. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *J Biol Chem*. 2002; 277(39):36009-17.

- Muscat L, Morin LP. Intergeniculate leaflet: contributions to photic and non-photic responsiveness of the hamster circadian system. *Neuroscience* 2006;140(1):305-20.

- Nakahata Y, Akashi M, Trcka D, Yasuda A, Takumi T. The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol Biol*. 2006; 16:7:5.

- Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina. *Neurosci Lett*. 1999; 271(1):1-4.

- Namihira M, Honma S, Abe H, Masubuchi S, Ikeda M, Honmaca K. Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *Neuroreport* 2001; 12(3):471-5.

- Nelson RJ, Zucker I. Photoperiodic control of reproduction in olfactorybulbectomized rats. *Neuroendocrinology* 1981; 32: 266-71.

- Newman GC, Hospod FE. Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. *Brain Res*. 1986; 381(2):345-50.

- Niki T, Hamada T, Ohtomi M, Sakamoto K, Suzuki S, Kako K, Hosoya Y, Horikawa K, Ishida N. The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Comm*. 1998; 248: 115-20.

- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*. 2002; 309(1):47-56.

- Oshima T, Yoshimoto T, Yamamoto S, Kumegawa M, Yokoyama C, Tanabe T. cAMP-dependent induction of fatty acid cyclooxygenase mRNA in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). *J Biol Chem*. 1991; 266(21):13621-6.

- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 2002; 298: 2213-16.

- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 2003;301(5632):525-7.

- Pandey HP, Ram A, Matsumura H, Satoh S, Hayaishi O. Circadian variations of prostaglandins D2, E2, and F2 alpha in the cerebrospinal fluid of anesthetized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 213: 625-9.

- Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol*. 1980; 87(1):89-93.

- Papst N, Bopp M, Schnaudigel OE. Pattern electroretinogram and visually evoked cortical potentials in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1984; 222: 29-33.

- Pérez-Rico C, de la Villa P, Blanco R, Germain F, Paz-Moreno J, Arribas-Gómez I. Alterations in nocturnal melatonin secretion in patients with optic neuropathies. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009; 84(5):251-7.

- Pérez Rico C, de la Villa P, Blanco R. Multifocal Erg and light-induced melatonin suppression evaluation of the functional integrity of the retinohypothalamic tract in advanced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51: E-Abstract 5490.

- Pierce ME, Besharse JC. Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J Gen Physiol* 1985;86: 671-89.

- Pittendrigh C Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Simposia on Quantitative Biology* 1960; 25:159-82.

- Pittendrigh CS Circadian systems: Entrainment. In: Handbook of behavioural neurobiology: Biological rhythms, J Aschoff, ed, pp 95-124, Plenum Press, New York, 1981a.

- Pittendrigh CS Circadian systems: General Perspective. In: Handbook of behavioural neurobiology: Biological rhythms, J Aschoff, ed, pp 57-80, Plenum Press, New York, 1981b

- Pozdeyev NV, Lavrikova EV. Diurnal changes of tyrosine, dopamine, and dopamine metabolites content in the retina of rats maintained at different lighting conditions. *J Mol Neurosci*. 2000; 15(1):1-9.

- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110(2):251-60.

- Preud'homme Y, Demolle D, Boeynaems JM. Metabolism of arachidonic acid in rabbit iris and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26: 1336-42.

- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 2002; 415(6871):493.

- Prywes AS. Unilateral afferent pupillary defects in asymmetric glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1976; 94(8):1286-8.

- Quigley HA, Enger C, Katz J, Sommer A, Scott R, Gilbert D. Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112(5):644-9.

- Ralph M, Lehman M. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hipothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci*. 1991;14:362-6.

- Raviola G. Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: An electron microscope study on Macaca mullata using horseradish peroxidase as a tracer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1974; 13: 828.

- Raviola G. The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp Eye Res*. 1977; 25 Suppl:27-63.

- Reppert SM, Weaver DR. Forward genetic approach strikes gold: cloning of a mammalian clock gene. *Cell* 1997; 89(4):487-90.

- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418(6901):935-41.

- Revell VL, Skene DJ. Light-induced melatonin suppression in humans with polychromatic and monochromatic light. *Chronobiol Int*. 2007; 24(6):1125-37.

- Richler M, Werner EB, Thomas D. Risk factors for progression of visual field defects in medically treated patients with glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 1982; 17(6):245-8.

- Ribeiro ML, Farina M, Franchi A. Effects of *in vivo* administration of epidermal growth factor (EGF) on uterine contractility, prostaglandin production and timing of parturition in rats. *Reproduction* 2003;126: 459-68.

- Robinson GA, Madison RD. Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res*. 2004; 44: 2667-74.

- Rohen JW, van der Zypen E. The phagocytic activity of the trabecularmeshwork endothelium. An electron-microscopic study of the vervet (Cercopithecus aethiops). *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1968; 175(2):143-60.

- Rohen JW. Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. *Ophthalmology* 1983; 90(7):758-65.

- Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9703-8.

- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002; 298: 2211-3.

- Sacca GB, Sáenz DA, Jaliffa CO, Minces L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Photic regulation of heme oxygenase activity in the golden hamster retina: involvement of dopamine. *J Neurochem*. 2003; 85(2):534-42.

- Sadeh A, Hauri PJ, Kripke DF, Lavie P. The role of actigraphy in the evaluation of sleep disorders. *Sleep* 1995;18(4):288-302.

- Sáenz DA, Cymeryng CB, De Nichilo A, Sacca GB, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Photic regulation of L-arginine uptake in the golden hamster retina. *J Neurochem*. 2002; 80(3):512-9.

- Sakamoto K, Ishida N. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett*. 1998a; 245(2):113-6.

- Sakamoto K, Ishida N. Molecular cloning of serotonin N-acetyltransferase gene from the mouse and its daily expression in the retina. *Neurosci Lett*. 1998b; 250(3):181-4.

- Sakamoto K, Oishi K, Shiraishi M, Hamano S, Otsuka H, Miyake Y, Ishida N. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport*. 2000; 11(18):3995-7.

- Sakamoto K, Liu C, Tosini G. Circadian rhythms in the retina of rats with photoreceptor degeneration. *J Neurochem*. 2004; 90(4):1019-24.

- Sampaolesi R. Glaucoma, Editorial médica Panamericana. 2. ª edición. Buenos Aires 1991.

- Sawaguchi S, Yue BY, Yeh P, Tso MO. Effects of intracameral injection of chondroitinase ABC in vivo. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(1):110-7.

- Schibler U. Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. *Prog Brain Res*. 2006; 153:271-82.

- Schwartz WJ, Aronin N, Takeuchi J, Bennett MR, Peters RV. Towards a molecular biology of the suprachiasmatic nucleus: photic and temporal regulation of c-*fos* gene expression. *Semin Neurosci*. 1995;7: 53-60.

- Sears ML. Regulation of aqueous flow by the adenylate cyclase receptor complex in the ciliary epithelium. *Am J Ophthalmol*. 1985; 15;100(1):194-8.

- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*. 1995. 61(3):379-82.

- Shin DH, Beker B, Kolker AE. Family history in primary open angle glaucoma. *Arch Ophtalmol*. 1977; 95:598.

- Siepka SM, Yoo SH, Park J, Lee C, Takahashi JS. Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:251-9.

- Siminoff R, Bito LZ. The effects of prostaglandins and arachidonic acid on the electroretinogram: evidence for functional cyclooxygenase activity in the retina. *Curr Eye Res*. 1981-1982;1(11):635-42.

- Smith RS, Rudt LA. Ultrastructural studies of the blood-aqueous barrier: II. The barrier to horseradish peroxidase in primates. *Am J Ophthalmol*. 1973; 76:937.

- Smith RF, Konopka RJ. Circadian clock phenotypes of chromosome aberrations with a breakpoint at the per locus. *Mol Gen Genet*. 1981;183(2):243-51.

- Stamper R. Aqueous humor: Secretion and dynamics. In Tasman W, Jaeger E (eds): Duane's *Foundations of Clinical Ophthalmology*, Vol 2, Philadelphia, JB Lippincott 1992.

- Stjernschantz J, Nilsson SF, Astin M. Vasodynamic and angiogenic effects of eicosanoids in the eye. *Prog Clin Biol Res*. 1989; 312:155-70.

- Storch KF, Paz C, Signorovitch J, Raviola E, Pawlyk B, Li T, Weitz CJ. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* 2007; 130(4):730-41.

- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell* 1997; 90(6):1003-11.

- Takahashi JS. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:531–553.

- Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (Eds.). Circadian Clocks. Series: Handbooks of Behavioral Neurobiology, Vol. 12. Hardcover, 2001, 794 p.

- Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(10):764-75.

- Takahata K, Katsuki H, Kume T, Nakata D, Ito K, Muraoka S, Yoneda F, Kashii S, Honda Y, Akaike A.. Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(4): 1760-1766.

- Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K, Takamatsu K. Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci*. 2000; 20(20):7525-30.

- Tamm ER, Carassa RG, Albert DM, Gabelt BT, Patel S, Rasmussen CA, Kaufman PL. Viscocanalostomy in rhesus monkeys. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(12):1826-38.

- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* 1997; 389(6650):512-6.

- Tennant JL. IOLAB intraocular lenses: adverse effects. *J Am Intraocul Implant Soc*. 1978; 4(4):210.

- Terman JS, Remé CE, Terman M. Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1993; 605(2):256-64.

- Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol*. 2001; 535: 261-267.

- Thompson CL, Bowes Rickman C, Shaw SJ, Ebright JN, Kelly U, Sancar A, Rickman DW. Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 4515-21.

- Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA*. 1991; 266(3):369-74.

- Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112(1):69-73.

- Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. Science. 1996; 272(5260):419-21.

- Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 1998; 789: 221-8.

- Tosini G, Fukuhara C. The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res*. 2002; 309(1):119-26.

- Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J*. 2007a; 21(14):3866-71.

- Tosini G, Kasamatsu M, Sakamoto K. Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 2007b; 1159:134-40.

- Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays* 2008; 30(7):624-33.

- Towle VL, Moskowitz A, Sokol S, Schwartz B. The visual evoked potential in glaucoma and ocular hypertension: effects of check size, field size, and stimulation rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24:175-183.

- Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Nishida E. Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO Rep*. 2005; 6(3):256-61.

- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol*. 1998; 42: 337-44.

- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002; 418(6897):534-9.

- Uhm KB, Shin DH. Positive family history of glaucoma is a risk factor for increased IOP rather than glaucomatous optic nerve damage (POAG vs OH vs normal control). *Korean J Ophthalmol*. 1992; 6(2):100-4.

- Valdez DJ, Nieto PS, Garbarino-Pico E, Avalle LB, Díaz-Fajreldines H, Schurrer C, Cheng KM, Guido ME. A nonmammalian vertebrate model of blindness reveals functional photoreceptors in the inner retina. *FASEB J*. 2009; 23(4):1186-95.

- Van Buskirk EM, Brett J. The canine eye: in vitro dissolution of the barriers to aqueous outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978; 17(3):258-71.

- Van Buskirk EM, Cioffi GA. Glaucomatous optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 1992; 113(4):447-52.

- Van Gelder RN, Wee R, Lee JA, and Tu DC. Reduced pupillary light responses in mice lacking cryptochromes. *Science* 2003; 299: 222.

- VanNewkirk MR, Nanjan MB, Wang JJ, Mitchell P, Taylor, HR, McCarty C, A. The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology* 2000; 107: 1593-1600.

- van Soest S, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen AA. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol*. 1999; 43(4):321-34.

- Vegge T, Ringvold A. The ultrastructure of the extracellular components of the trabecular meshwork in the human eye. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1971;115(3):361-76.

- Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG. The uniform field and pattern ERG in macaques with experimental glaucoma: removal of spiking activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:2797-810.

- Wagner HJ, Behrens UD, Zaunreiter M, Douglas RH. The circadian component of spinule dynamics in teleost retinal horizontal cells is dependent on the dopaminergic system. *Vis Neurosci*. 1992; 9: 345-351.

- Wang HZ, Lu QJ, Wang NL, Liu H, Zhang L, Zhan GL. Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chin Med J* (Engl). 2008;121(11):1015-9.

- Wee R, Van Gelder RN. Sleep disturbances in young subjects with visual dysfunction. *Ophthalmology* 2004;111: 297-302; discussion 302-293.

- Welsh JH, Osborne CM. Diurnal changes in the retina of the catfish. *J Comp Neurol*. 1937; 66: 349-60.

- Wirostko E, Bhattacherjee P, Eakins KE, Manski W. Cellular aspects of conjunctival inflammation induced by the synergistic action of histamine and prostaglandins. *Immunopharmacology* 1978;1(1):49-56.

- Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, Yan L, Johnson M, Zhang DQ, McMahon D, Silver R. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003; 23(20):7670-6.

- Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Schlingensiepen KH, Herdegen T. Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci*. 1995; 7(3):388-93.

- Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol*. 2004;5:18.

- Yoshimura T, Ebihara S. Spectral sensitivity of photoreceptors mediating phase-shifts of circadian rhythms in retinally degenerate CBA/J (rd/rd) and normal CBA/N (+/+)mice. *J Comp Physiol A*. 1996; 178: 797-802.

- Yoshimura T, Suzuki Y, Makino E, Suzuki T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Namikawa T, Ebihara S. Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000; 78(1-2):207-15.

- Yosipovitch G, Yosipovitch Z, Harell D, Ashkenazi I, Erman A. Diurnal rhythm of prostanoid secretion from bone/marrow organ in the rat. *Bone* 1995; 17:79-83.

- Yu HS, Pang SF, Tang PL. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *J Endocrinol*. 1981; 91(3):477-81.

- Yujnovsky I, Hirayama J, Doi M, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(16):6386-91.

- Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic Drosophila melanogaster. *Cell* 1984; 39(2 Pt 1):369-76.

- Zhu MD, Cai FY. Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1992; 20: 225-34.

- Zhu H, Green CB. Three cryptochromes are rhythmically expressed in Xenopus laevis retinal photoreceptors. *Mol Vis*. 2001;7:210-5.

- Zhu H, LaRue S, Whiteley A, Steeves TD, Takahashi JS, Green CB. The Xenopus clock gene is constitutively expressed in retinal photoreceptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000; 75(2):303-8.