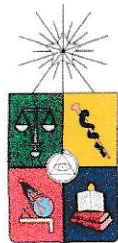


UCH-FG
DOC-BMCN
Z945
C.1



"Expresión de proteínas de respuesta a estrés celular y neurodegeneración en modelo de estudio de Degeneración Macular Relacionada a la Edad. Mecanismo alternativo de producción de autofluorescencia de lipofucsina en epitelio pigmentario retinal".

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Claudio Zúñiga Cossio

Agosto 2011

Director de Tesis Dr: Octavio Monasterio Opazo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Claudio Zúñiga Cossio

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de Marzo de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Jorge Babul (Presidente)

Dr. Juan Brunet.

Dr. Cristián González.

Dr. Neil Saldías.

Juan Merto

[Handwritten signatures in blue ink]



*ALLA COMPAGNA DI VITA, IL MIO AMORE CAROLA,
ALLA RAGIONE DEL NOSTRO VITE LEONE, ED
ALL'AMORE DEI NOSTRI GENITORI E FAMIGLIA.*

(A la compañera de vida, mi amor Carola,
a la razón de nuestras vidas, León
y al amor de nuestros padres y familia)



Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Octavio Monasterio y a la Dra. Rosalba Lagos por acogerme en su laboratorio, que es un centro en donde se han formado destacados estudiantes, algunos se han quedado cerca, otros se han ido lejos pero todos vuelven para las fiestas. El profesor Monasterio fue mi guía en este camino y formador de la rigurosidad en la formación como científico, le agradezco su confianza y por compartir su sabiduría.

A Maribel Lopéz, Jae Yen Shin, José Jaime Arbildúa y Esteban Nova por enseñarme los primeros pasos del trabajo en laboratorio. A César Díaz por su amistad y colaboración en el desarrollo de la técnica de separación de proteínas y fluorescencia, a Tomas Vega-Zúñiga por su colaboración en el desarrollo de nuevas técnicas en neurociencias, a Felipe Montecinos por ayudarme a comprender la termodinámica, a Luis Pouchucq por su apoyo y consejos en el tratamiento de los gradientes y ultracentrifugación, a Daniel Maturana por su apoyo en ultracentrifugación y espectrometría de masas, a David Weinstein y María José Gallardo por su ayuda en los estudios de dicroísmo circular, a Janet Araya, Sergio Salas, Alejandro Zúñiga y Alejandro Munizaga por compartir sus conocimientos y experiencia en microscopía electrónica, a Cristian Undurraga y Ricardo Fuentes por su apoyo en microscopía confocal.

Al apoyo permanente del equipo del laboratorio de biología estructural y molecular compuesto por Macarena Collao, Pedro Nuñez y Roselyn Orellana durante estos años han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A la comunidad de académicos y funcionarios de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por permitir desarrollar mi doctorado concomitantemente con mis actividades profesionales.

Finalmente, a Carola por su apoyo y amor permanente e incondicional.

Índice de materias



A. Introducción.....	1
1. Estructura del ojo.	1
Capa externa.....	1
Capa media.....	2
Capa interna.....	4
2. Mecanismos fotobiológicos.....	7
Absorción de la radiación por el ojo humano.....	8
Daño directo de la radiación solar en el ojo.....	10
Degeneración macular relacionada a la edad (AMD).....	10
Epitelio Pigmentario Retinal.....	13
3. Modelo de formación de lipofucsina.....	16
4. Proteínas cristalinas.....	24
5. Autofluorescencia de RPE.....	27
B. Hipótesis.....	31
Hipótesis alternativa.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	32
C. Materiales y métodos.....	33
Modelos para caracterizar la lipofucsina del epitelio pigmentario retinal.....	33

Modelo Humano	33
1. Epitelio pigmentario de globos oculares humanos enucleados	33
2. Modelo ARPE – 19.	35
<i>Octodon degus</i>	36
Técnica de anestesia general	37
Técnica de anestesia local peri bulbar	39
Técnica quirúrgica	40
Microscopía e histología	41
Microscopía de Epifluorescencia.	42
Microscopía confocal.....	42
Microscopía electrónica.	42
1. Microscopía electrónica de transmisión.	42
Purificación de lipofucsina.....	43
Purificación de Alfa cristalina humana	44
1. Separación de Alfa cristalina por tamaño molecular.	47
2. Separación por intercambio aniónico.	48
Desnaturación de Alfa cristalina.	49
Espectroscopia: dispersión de luz, dicroísmo circular y fluorescencia.	49
1. Dispersión de luz.	49
2. Dicroísmo circular (DC).....	49
3. Fluorescencia.	50
4. Curva de desnaturalación de Alfa cristalina.....	51
Electroforesis de proteína en SDS-PAGE y western blot.	51
1. Electroforesis en SDS-PAGE.....	51

2. Western blot con anticuerpo anti Alfa B cristalina.	52
Gradientes discontinuos de sacarosa.	53
Inmuno blot.	54
Microscopía electrónica de Alfa cristalina.	54
D. Resultados.	59
Capítulo I. Microscopía del Epitelio pigmentario retinal.	59
I.1. Fluorescencia de epitelio pigmentario retinal.	59
Microscopía de epitelio pigmentario retinal humano.	59
Microscopía de campo claro.	59
Microscopía de epifluorescencia.	63
Microscopía confocal.	69
Microscopía electrónica.	74
I.2. Microscopía de una línea celular de epitelio pigmentario retinal humano.	76
Microscopía de campo claro.	77
Microscopía de epifluorescencia.	78
Microscopía confocal.	80
I.3. Retina y epitelio pigmentario de <i>Octodon degus</i> como modelo de trabajo.	85
Histología.	85
Microscopía de epifluorescencia.	89
Microscopía confocal.	93
Microscopía electrónica.	99
Capítulo II. Purificación y autofluorescencia de lipofucsina del RPE de humano y <i>Octodon degus</i>.	102

II.2. Microscopía de epifluorescencia de los gránulos de lipofucsina humana.....	104
Microscopía de epifluorescencia de los gránulos de lipofucsina de Octodon degus .	109
II.3. Microscopía electrónica de gránulos de lipofucsina humana.....	111
II.4. Características espectroscópicas de los gránulos de lipofucsina.....	114
II. 5. Determinación de las proteínas presentes en lipofucsina de RPE.....	122
Detección de Alfa cristalina en lipofucsina de epitelio pigmentario retinal humano, ARPE- 19 y Octodon degus	125
Inmunomicroscopía electrónica de transmisión de lipofucsina de epitelio pigmentario retinal humano.....	126
Espectrometría de masas.....	129
Capítulo III. Alfa cristalina como proteína autofluorescente.....	134
III. 1. Fluorescencia de cristalino humano y de Octodon degus.....	134
III.2. Autofluorescencia de Alfa cristalina.....	138
III.3. Purificación de Alfa cristalina humana.....	139
III. 4. Alfa cristalina como chaperona molecular.....	143
III.5. Estudios espectroscópicos de Alfa cristalina humana.....	144
Autofluorescencia de Alfa cristalina humana es dependiente de la concentración. ..	146
Estructura de Alfa cristalina y emisión de fluorescencia.....	149
Fluorescencia intrínseca de triptófanos de Alfa cristalina.....	154
Dicroísmo circular de Alfa cristalina.....	155
III. 6. Estado de agregación y autofluorescencia de Alfa cristalina.....	159
Estados de agregación de Alfa cristalina a altas concentraciones.....	159

Autofluorescencia de los estados de agregación de Alfa cristalina a altas concentraciones. 164

 III.7. Estructura de Alfa cristalina.....167

E. Discusión..... 168

 Resultados capítulo I. Microscopía del epitelio pigmentario retinal.....170

 Resultados capítulo II. Purificación y autofluorescencia de lipofucsina del RPE de humano y Octodon degus.....174

 Resultados capítulo III. Alfa cristalina como proteína autofluorescente.176

F. Conclusiones..... 181

G. Referencias..... 182



Listado de figuras.

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DEL GLOBO OCULAR Y ANEXOS.	3
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA ANATOMÍA DE LA RETINA PERIFÉRICA DE PRIMATES.....	5
FIGURA 3. ESQUEMA DEL EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL (RPE) Y SEGMENTOS EXTERNOS DE FOTORRECEPTORES (ROS).	6
FIGURA 4. ABSORCIÓN ESQUEMÁTICA DE RADIACIÓN UV EN LOS MEDIOS OCULARES.	9
FIGURA 5. TRANSMISIÓN ESPECTRAL DEL CRISTALINO HUMANO EN FUNCIÓN DE LA EDAD.....	9
FIGURA 6. ESQUEMA DE CASCADA DE FOTO TRANSDUCCIÓN EN FOTORRECEPTORES DE VERTEBRADOS.	17
FIGURA 7. VÍA METABÓLICA DE LOS RETINOIDES EN RETINA Y EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL.	19
FIGURA 8. EL CICLO DEL RETINOIDE Y LA FORMACIÓN DE FLUORÓFOROS DE LIPOFUCSINA A2E, ISO- A2E, Y DÍMERO TODO-TRANS-RETINAL (ATR).	21
FIGURA 9. ESTRUCTURA DE DERIVADOS DEL RETINOIDE, A2E E ISO-A2E.....	22
FIGURA 10. OFTALMOSCOPIO CONFOCAL DE HEIDELBERG.	28
FIGURA 11. IMÁGENES OBTENIDAS CON EL OFTALMOSCOPIO CONFOCAL DE HEIDELBERG.	28
FIGURA 12. MANIPULACIÓN Y EXTRACCIÓN DE RPE DESDE OJOS HUMANOS.	34
FIGURA 13. <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1,5 AÑOS EN ETAPA PREVIA A INDUCCIÓN ANESTÉSICA.	37
FIGURA 14. SISTEMA DE ANESTESIA GENERAL PARA LAS FASES DE INDUCCIÓN Y MANTENCIÓN PARA <i>OCTODON DEGUS</i>	39
FIGURA 15. FOTOGRAFÍA DE PROCESO DE ANESTESIA LOCAL PERI BULBAR DE OJO DERECHO DE <i>OCTODON DEGUS</i>	40
FIGURA 16. EXTRACCIÓN DE GLOBO OCULAR DE <i>OCTODON DEGUS</i> BAJO ANESTESIA GENERAL.	41
FIGURA 17: ESQUEMA DE PURIFICACIÓN DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE EPITELIO PIGMENTARIO. ...	44

FIGURA 18: SECUENCIA PRIMARIA Y MASA MOLECULAR DE ALFA A Y B CRISTALINA HUMANAS.	45
FIGURA 19. ESTRUCTURA DE DE ALFA B CRISTALINA HUMANA Y HSP 16,9 DE LEVADURA.	46
FIGURA 20. ESTRUCTURA CUATERNARIA DE SHSP 16,9 DE LEVADURA.	47
FIGURA 21: ÍNDICES DE REFRACCIÓN DE LAS FRACCIONES DE LOS GRADIENTES DE SACAROSA EN GDMCL.	53
FIGURA 22. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO DE RETINA Y RPE HUMANO DE 40 AÑOS.	61
FIGURA 23. MAGNIFICACIÓN DIGITAL DE LA MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO DE RETINA Y RPE HUMANO DE 40 AÑOS.	62
FIGURA 24. FOTOGRAFÍA DE EPIFLUORESCENCIA DE RETINA HUMANA Y RPE DE OJO DE UN INDIVIDUO DE 42 AÑOS.	63
FIGURA 25. RETINA HUMANA Y GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO EN UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE VIDA.	65
FIGURA 26. RETINA HUMANA Y GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE VIDA.	67
FIGURA 27. A. MAGNIFICACIÓN DIGITAL DE RPE Y GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE VIDA.	68
FIGURA 28. FOTOGRAFÍAS CONFOCALES DE FLUORESCENCIA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 40 AÑOS.	70
FIGURA 29. FOTOGRAFÍAS CONFOCALES DE FLUORESCENCIA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS.	71
FIGURA 30. FOTOGRAFÍA DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA FLUORESCENCIA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS.	72
FIGURA 31. ULTRAESTRUCTURA DE LA RETINA Y DE LOS GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO.	75
FIGURA 32. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO DE CÉLULAS ARPE-19 DE UN AÑO DE CRECIMIENTO EN CULTIVO CELULAR CRECIDAS EN AUSENCIA DE SE.	77

FIGURA 33. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO Y CONTRASTE DE FASE DE UN CULTIVO DE ARPE-19 DE 6 MESES DE CULTIVO.	78
FIGURA 34. AUTOFLUORESCENCIA DE ARPE-19 DE 6 MESES DE CRECIMIENTO EN CULTIVO.	79
FIGURA 35. AUTOFLUORESCENCIA DE ARPE-19 DE 1 AÑO DE CRECIMIENTO EN CULTIVO.	80
FIGURA 36. MICROSCOPIA CONFOCAL DE ARPE-19 DE 1,5 AÑOS DE CULTIVO.	81
FIGURA 37. MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA AUTOFLUORESCENCIA DE ARPE-19 DE 1,5 AÑOS DE CULTIVO.	82
FIGURA 38. MICROSCOPIA CONFOCAL DE ARPE-19 DE 1,5 AÑOS DE CULTIVO LOS CUALES SE EXCITARON A 488 NM DESDE UN PLANO INFERIOR EN A HASTA UN PLANO SUPERIOR EN F.	83
FIGURA 39. HISTOLOGÍA DE LA RETINA CENTRAL DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1 AÑO DE VIDA.	86
FIGURA 40. HISTOLOGÍA DE LA RETINA ADYACENTE AL NERVIÓ ÓPTICO DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1 AÑO DE VIDA.	87
FIGURA 41. HISTOLOGÍA DE LA RETINA ESTRATIFICADA DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1 AÑO DE VIDA.	87
FIGURA 42. HISTOLOGÍA DE RPE DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1 AÑO DE VIDA. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO DE UNA PREPARACIÓN TEÑIDA CON HEMATOXILINA EOSINA.	88
FIGURA 43. AUTOFLUORESCENCIA DE EPITELIO PIGMENTARIO DE <i>OCTODON DEGUS</i>	89
FIGURA 44. AUTOFLUORESCENCIA DE EPITELIO PIGMENTARIO DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE TRES AÑOS DE VIDA.	91
FIGURA 45. AUTOFLUORESCENCIA DE LOS GRÁNULOS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE TRES AÑOS DE VIDA.	92
FIGURA 46. PLANO DE FLUORESCENCIA MÁXIMA DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL DEL EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL DE <i>OCTODON DEGUS</i>	94
FIGURA 47. PLANO DE FLUORESCENCIA MÁXIMA DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL DEL EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL DE <i>OCTODON DEGUS</i>	94
FIGURA 48. PLANOS CONFOCALES DE AUTOFLUORESCENCIA DEL EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1,5 AÑOS FIJADO.	96

FIGURA 49. MICROSCOPIA CONFOCAL DE AUTOFLUORESCENCIA DE RPE DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 1,5 AÑOS FIJADO.	97
FIGURA 50. MICROSCOPIA CONFOCAL DE AUTOFLUORESCENCIA DE RPE DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE 3 AÑOS FIJADO.	98
FIGURA 51. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE EPITELIO PIGMENTARIO RETINAL DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE UN AÑO DE VIDA.	100
FIGURA 52. ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA DE GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO.	103
FIGURA 53. AUTOFLUORESCENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE INDIVIDUOS ENTRE 65-70 AÑOS.	105
FIGURA 54. AUTOFLUORESCENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE INDIVIDUOS ENTRE 65-70 AÑOS.	107
FIGURA 55. AUTOFLUORESCENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE INDIVIDUOS ENTRE 65-70 AÑOS INCLUIDOS EN RESINA EPÓXICA.	108
FIGURA 56. AUTOFLUORESCENCIA DE GRÁNULOS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE <i>OCTODON DEGUS</i> DE TRES AÑOS DE VIDA.	110
FIGURA 57. ULTRAESTRUCTURA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO DE UN INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE VIDA.	112
FIGURA 58. ESPECTROS DE ABSORCIÓN LUZ DE LIPOFUCSINA Y MELANOLIPOFUCSINA HUMANA.	114
FIGURA 59. LOGARITMO NATURAL DE LA DENSIDAD ÓPTICA Y LONGITUD DE ONDA DE LIPOFUCSINA Y MELANOLIPOFUCSINA HUMANA.	115
FIGURA 60. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LIPOFUCSINA HUMANA (50 MG/ML) SUSPENDIDA EN PBS Y EXCITADA A 364 NM EN UN SISTEMA "FRONT FACE", A 25° C.	116
FIGURA 61. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LIPOFUCSINA HUMANA (50 MG/ML) SUSPENDIDA EN PBS AL EXCITAR A 488 NM EN UN SISTEMA "FRONT FACE", A 25° C.	117

FIGURA 62. ESPECTRO DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LIPOFUCSINA DE <i>OCTODON DEGUS</i> (50 MG/ML) SUSPENDIDA EN PBS AL EXCITAR A 488 NM EN UN SISTEMA “FRONT FACE”, A 25° C.	117
FIGURA 63. VÍAS METABÓLICAS DEL FLUORÓFORO TODO-TRANS-RETINAL (FISHKIN <i>ET AL.</i> , 2005).....	120
FIGURA 64. ESTRUCTURA QUÍMICA Y ABSORBANCIA MÁXIMA DE FLUORÓFOROS RETINALES EXTRAÍDOS DE LIPOFUCSINA (BUI <i>ET AL.</i> , 2006).	120
FIGURA 65. ESPECTRO DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE A2E Y A2PE REGISTRADOS AL EXCITAR A 488 NM (SPARROW <i>ET AL.</i> , 2010).	121
FIGURA 66. SDS-PAGE DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA SOLUBILIZADOS DE RPE HUMANO EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA 4-12%, SIN TEÑIR.....	123
FIGURA 67. SDS-PAGE DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA SOLUBILIZADOS DE EPITELIO PIGMENTARIO HUMANO EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA 4-12%, TEÑIDO CON PLATA.	124
FIGURA 68. WESTERN BLOT DE LIPOFUCSINA CON ANTICUERPO ANTI ÁLFA CRISTALINA.	125
FIGURA 69. INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE SECCIONES ULTRA FINAS DE LIPOFUCSINA HUMANA.	128
FIGURA 70. SDS-PAGE DE LIPOFUCSINA HUMANA SOLUBILIZADO EN AMORTIGUADOR LAEMMLI 4X CON UN GEL DE POLIACRILAMIDA 4-12% TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE.....	130
FIGURA 71. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA BANDA NÚMERO 7 DEL GEL SDS-PAGE DE LIPOFUCSINA HUMANA MOSTRADO EN LA FIGURA 70.	131
FIGURA 72. ANÁLISIS DE MASCOT PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA BANDA NÚMERO 7 DEL SDS-PAGE DE LIPOFUCSINA HUMANA.	132
FIGURA 73. RESULTADO DE ANÁLISIS DE MASCOT PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA BANDA NÚMERO 7 DEL SDS-PAGE DE LIPOFUCSINA HUMANA.	133
FIGURA 74. EMISIÓN DE AUTOFLUORESCENCIA DE CRISTALINO HUMANO Y CRISTALINO DE <i>OCTODON DEGUS</i>	134
FIGURA 75. EMISIÓN DE AUTOFLUORESCENCIA DE LAS CORTEZAS DE CRISTALINOS EN PBS Y NÚCLEOS DE LOS CRISTALINOS EN SUSPENSIÓN.....	136

FIGURA 76. ESPECTRO DE EMISIÓN DE AUTOFLUORESCENCIA DE ALFA CRISTALINA BOVINA (0.5 MG/ML) REGISTRADA ENTRE 550 Y 900 NM, CON LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN A 488 NM, A 25° C.	138
FIGURA 77. CROMATOGRAMA DE PURIFICACIÓN DE ALFA CRISTALINA HUMANA.....	139
FIGURA 78. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS ETAPA DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE ALFA CRISTALINA.....	140
FIGURA 79. WESTERN BLOT DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES DEL CROMATOGRAMA DE PURIFICACIÓN DE ALFA CRISTALINA HUMANA.....	140
FIGURA 80. A: SDS-PAGE DE ALFA CRISTALINA PURIFICADA DESDE CORTEZA DE CRISTALINOS HUMANOS.....	141
FIGURA 81. GRÁFICO DE ESTIMACIÓN DE MASA MOLECULAR RELATIVA SEGÚN MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA RELATIVA EN SDS-PAGE.....	142
FIGURA 82. AGREGACIÓN DE INSULINA REDUCIDA A 37° C EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ALFA CRISTALINA.....	143
FIGURA 83. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALFA CRISTALINA EN LA EMISIÓN DE AUTOFLUORESCENCIA AL ESTIMULAR CON 488 NM.....	146
FIGURA 84. DISPERSIÓN DE LUZ DE ALFA CRISTALINA HUMANA A DISTINTA CONCENTRACIÓN.....	147
FIGURA 85. DISPERSIÓN DE LUZ DE ALFA CRISTALINA HUMANA EN PRESENCIA DE AGENTE DESNATURANTE EN DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	148
FIGURA 86. EFECTO DE LA DESNATURACIÓN CON GDMCL DE ALFA CRISTALINA SOBRE LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA CON EXCITACIÓN A 488 NM.....	149
FIGURA 87. PRIMER PICO DE EMISIÓN DE ALFA CRISTALINA DESNATURADA EN GDMCL, EXCITACIÓN A 488 NM.....	150
FIGURA 88. SEGUNDO PICO DE EMISIÓN DE ALFA CRISTALINA DESNATURADA EN GDMCL, EXCITACIÓN A 488 NM.....	151

FIGURA 89. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA DE EMISION DE AUTOFLUORESCENCIA DE AGREGADOS DE ALFA CRISTALINA.	153
FIGURA 90. EFECTO DE LA DESNATURACION CON GDMCL DE ALFA CRISTALINA SOBRE LA EMISION DE FLUORESCENCIA DE TRIPTOFANOS.	155
FIGURA 91. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GDMCL SOBRE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ALFA CRISTALINA HUMANA.	156
FIGURA 92. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE UREA SOBRE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ALFA CRISTALINA HUMANA.	157
FIGURA 93. DESNATURACION DE ALFA CRISTALINA HUMANA CON UREA SEGUIDA POR LA FLUORESCENCIA DE TRIPTOFANOS Y POR DICROISMO CIRCULAR.	158
FIGURA 94. INMUNO DOT BLOT DE DOT BLOT DE LAS FRACCIONES DE LOS GRADIENTES DE SACAROSA.	160
FIGURA 95. DIAGRAMA DE TRABAJO EN DOT BLOT ANALYZER DE IMAGE J.	161
FIGURA 96. DISTRIBUCION DE ALFA CRISTALINA EN LAS FRACCIONES DE LOS GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA CON GDMCL.	163
FIGURA 97. AUTOFLUORESCENCIA DE ALFA CRISTALINA PRESENTE EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LOS GRADIENTES DE SACAROSA DISCONTINUOS CON UN AUMENTO PROGRESIVO DE LA CONCENTRACION DE AGENTE DESNATURANTE EXCITADA A 488 NM.	166
FIGURA 98. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE ALFA CRISTALINA HUMANA (1MG/ML). .	167
FIGURA 99. DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE RPE HUMANO DE MUESTRA DE INDIVIDUO DE 42 AÑOS DE EDAD.	170
FIGURA 100. DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE NÚCLEOS DE CÉLULAS DE RPE HUMANO DE MUESTRA DE INDIVIDUO DE 42 AÑOS DE EDAD.	171
FIGURA 101. DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA DE RPE HUMANO DE MUESTRA DE INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE EDAD.	171

FIGURA 102. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE NÚCLEOS DE CÉLULAS DE RPE HUMANO DE MUESTRA DE INDIVIDUO DE 72 AÑOS DE EDAD.....	172
FIGURA 103. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA POR CÉLULA DE RPE HUMANO SEGÚN LA EDAD.....	172

Listado de ilustraciones y tablas

ILUSTRACIÓN 1. UBICACIÓN ANATÓMICA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS DEL OJO UTILIZADOS PARA ESTUDIO DE MICROSCOPIA.....	60
ILUSTRACIÓN 2. MODELO DE AUTOFLUORESCENCIA DE ALFA CRISTALINA Y SU RELACIÓN CON LA AUTOFLUORESCENCIA DE LIPOFUCSINA.....	178
TABLA 1. EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LIPOFUCSINA HUMANA Y DE <i>OCTODON DEGUS</i> PURIFICADA MEDIANTE GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA.....	118

Listado de símbolos y abreviaturas

Cantidades y símbolo de las unidades de medida

Longitud:	Metro m, mm, μm , nm.
Volumen	litro L, ml, μl .
Tiempo	Hora h, min, s.
Masa kilogramo	Kg, g, mg, μg .
Concentración	mol/l M, mM, μM .
Masa molecular	daltons Da, kDa.
Tamaño molecular	pares de bases Pb, Kpb.
Temperatura	grados Celsius $^{\circ}\text{C}$.

Abreviaturas y convenciones

A2E	metabolito oxidado de retinal.
AMD	degeneración macular relacionada a la edad.
ARPE-19	línea celular de epitelio pigmentario retinal humano.
CSLO	oftalmoscopio confocal laser de muestreo.
DC	dicroísmo circular.
GdmCl	cloruro de guanidinio.
PBS	amortiguador fosfato.
ROS, SE FR	segmentos externos de fotorreceptores.
RPE	epitelio pigmentario retinal.
U.A.	unidades arbitrarias.
UV	radiación ultravioleta.

Técnicas

SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida.
Western blot	inmunodetección de proteína.
Inmuno blot	inmunodetección de proteína.

Resumen

La degeneración macular relacionada a edad (AMD) es una enfermedad caracterizada por la pérdida del epitelio pigmentario retinal (RPE) y la consiguiente muerte del fotorreceptor, es la principal causa de ceguera en los países desarrollados. Recientemente mediante el uso de oftalmoscopia confocal laser (CSLO) se ha observado un aumento en la señal de autofluorescencia de las células del RPE en estudios en humanos "in vivo" al ser estimulados con luz azul (488 nm). Esta señal proviene de gránulos de lipofucsina presentes en el RPE y se ha atribuido su origen a la acumulación de fluoróforos derivados desde el retinal presente en el fotorreceptor. El objetivo de esta tesis es demostrar la emisión de autofluorescencia de una pequeña proteína de estrés celular (Alfa cristalina) como corresponsable de la emisión de autofluorescencia de la lipofucsina del RPE. Para esto se realizó experimentos en el RPE y en la lipofucsina de ojos humanos, de *Octodon degus* y de células ARPE-19. Determinando el efecto del envejecimiento en la emisión de autofluorescencia, la demostración de la presencia de Alfa cristalina en la lipofucsina de los tejidos examinados y el análisis espectroscópico de esta proteína autofluorescente. Se concluyó que esta proteína está presente en los gránulos de lipofucsina y que su autofluorescencia es dependiente del estado de agregación, que parece aumentar conforme aumenta el estrés oxidativo

medido indirectamente por el envejecimiento. La autofluorescencia de Alfa cristalina al interior de los gránulos de lipofucsina constituye un marcador de decaimiento celular que puede ser considerado para terapias de reemplazo celular del RPE en el futuro.

Summary

Age related macular degeneration (AMD) is an eye disease characterized by the lost of the retinal pigment epithelium (RPE) and consequently death of photoreceptor, is the main cause of blindness in developed countries. Recently by using confocal scanning laser ophthalmoscopy (CLSO) was noted an increasing of autofluorescence signaling of the RPE cells "in vivo" from humans when they are stimulated with blue light (488 nm). This signal comes from lipofuscin granules within RPE and was attributed to the increasing amount of retinal derived fluorophores from photoreceptor. The aim of this thesis is to demonstrate the autofluorescence emission of a small heat shock protein (Alpha crystallin) as part of the autofluorescence emission from lipofuscin of the RPE. For that objective were realized experiments in RPE and in lipofuscin from human, Octodon degus and ARPE-19 cells. Determine the aging effect on autofluorescence emission, the presence demonstration of Alpha crystallin in the lipofuscin from investigated tissues and the spectroscopic analysis of this autofluorescent protein. In conclusion this protein is present inside the lipofuscin

granules and the autofluorescence depend on the aggregation state of the protein, that increasing in relation to oxidative stress indirectly measured by aging. The autofluorescence of Alpha crystallin inside lipofuscin granules is a hallmark of cellular damage that could be considered in next therapies of cellular replacement for RPE cells of the human retina in the future.

A. Introducción.

1. Estructura del ojo.

El globo ocular está ubicado profundamente en una cavidad ósea llamada órbita, la que lo protege contra el daño mecánico y sirve como defensa frente a la radiación que incide sobre la cabeza. Los párpados superior e inferior contribuyen a la protección al servir como cortinas contra agresiones físicas y la radiación del ambiente.

El globo ocular está compuesto de varias capas: externa, media e interna (Figura 1).

Capa externa

Está compuesta por córnea y esclera, sobre ésta última se encuentra la conjuntiva.

- La esclera tiene por función proteger el globo ocular, es un tejido resistente, grueso y opaco formado de fibras de colágeno ordenadas en láminas.
- La córnea es la porción anterior transparente del globo ocular y posee múltiples capas. La superficie esta revestida por un epitelio que se continúa con la superficie epitelial de la conjuntiva. Las células epiteliales están renovándose constantemente y provienen de células troncales que se diferencian a epitelio corneal, estas se expresarian en el limbo córneo escleral, sobre la membrana de Bowman.

El recambio es rápido y una vez que la célula alcanza la superficie, tiene una vida media de 48 horas. El componente mayoritario de la córnea es el estroma, compuesto por fibras colágenas altamente organizadas en un patrón que permite a la córnea ser transparente. La capa más profunda es el endotelio, corresponde a una capa de células con sistemas de bombas iónicas $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ que mantienen deshidratado el estroma. Este es un factor importante para el carácter transparente de la cornea. La córnea, finalmente enfoca haces de fotones en el cristalino. Sobre la córnea y conjuntiva se encuentra el film lagrimal que permite: la lubricación, defensa antimicrobiana y le proporciona nutrientes, entre otras funciones. Está compuesto por capas, la interna es una capa proteica hidratada donde se encuentran en solución diversos componentes. Sobre ella se aplica una película oleosa aportada por glándulas sebáceas modificadas, como las glándulas de Meibomio que se encuentran en el párpado.

Capa media

Contiene el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. Conocida también como "úvea", esta región contiene células pigmentarias (células que producen pigmentos como melanina). La apertura anterior del iris se denomina pupila, la cual se contrae o dilata dependiendo de la intensidad del flujo de fotones. El iris está formado de células pigmentarias de varias densidades, vasos sanguíneos y fibras musculares lisas radiales y circunferenciales generando el dilatador y esfínter de la pupila respectivamente.

La coroides consiste de un trabeculado de vasos sanguíneos, nervios y células pigmentarias que contribuyen a la nutrición de la retina y soportan las funciones nutritivas de las capas más externas de la retina donde se encuentran los foto receptores y el inicio de la red neuronal. El iris y cristalino están en contacto con el humor acuoso, fluido que mantiene la presión intraocular (PIO), contiene varios antioxidantes y permite el transporte de nutrientes hacia el cristalino. El cristalino se ubica detrás del iris y sus funciones son enfocar la radiación visible en la retina y filtrar la radiación ultravioleta.

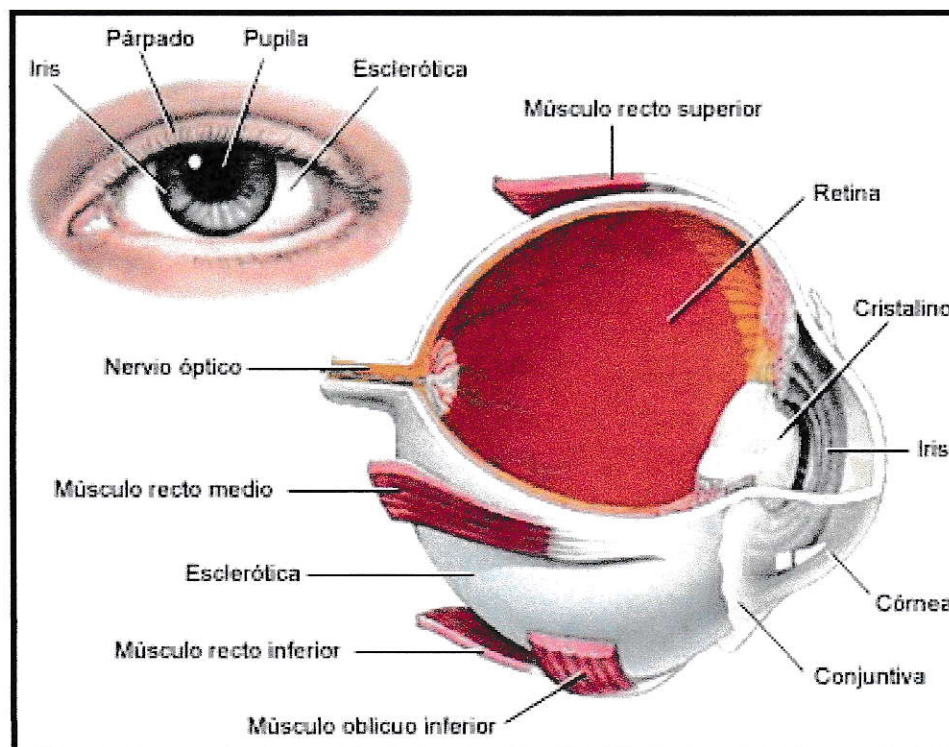


Figura 1. Representación del globo ocular y anexos.

El cristalino proviene embriológicamente del ectodermo y está compuesto de células cristalinas elongadas que están encerradas por una cápsula. Constantemente se forman células en el denominado ecuador cristalino y se desplazan a través del centro del lente. El cristalino está suspendido desde el cuerpo ciliar por finos ligamentos que conforman la zónula. La forma del lente puede cambiar por contracción o relajación de los músculos en el cuerpo ciliar, esta modificación permite el enfoque de los fotones en la retina, constituyendo la acomodación. El cristalino es avascular y obtiene sus nutrientes desde el humor acuoso que está ubicado por delante o del cuerpo vítreo que llena la cavidad posterior.

Detrás del cristalino se ubica el humor vítreo, estructura con características de un gel, el cual también contiene antioxidantes y los transporta hacia el cristalino y la retina, es un remanente embriológico de la arteria hialoidea central, la que colabora en el desarrollo cristalino y el polo ocular anterior.

Capa interna

En ésta capa se encuentra la retina que está compuesta por células fotorreceptoras (conos y bastones) que se estimulan cuando en sus segmentos externos reciben fotones de luz y también por una porción neural (células bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares) que traducen el estímulo luminoso a través de la retina al nervio óptico.

Detrás de las células foto receptoras están las células del epitelio pigmentario de la retina, la membrana de Bruch, coriocapilaris y coroides. Las células

fotorreceptoras son avasculares y los nutrientes requeridos son aportados por las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), éstos son transportados al epitelio pigmentario a través de la coriocapilaris pasando por la membrana de Bruch (Figura 2).

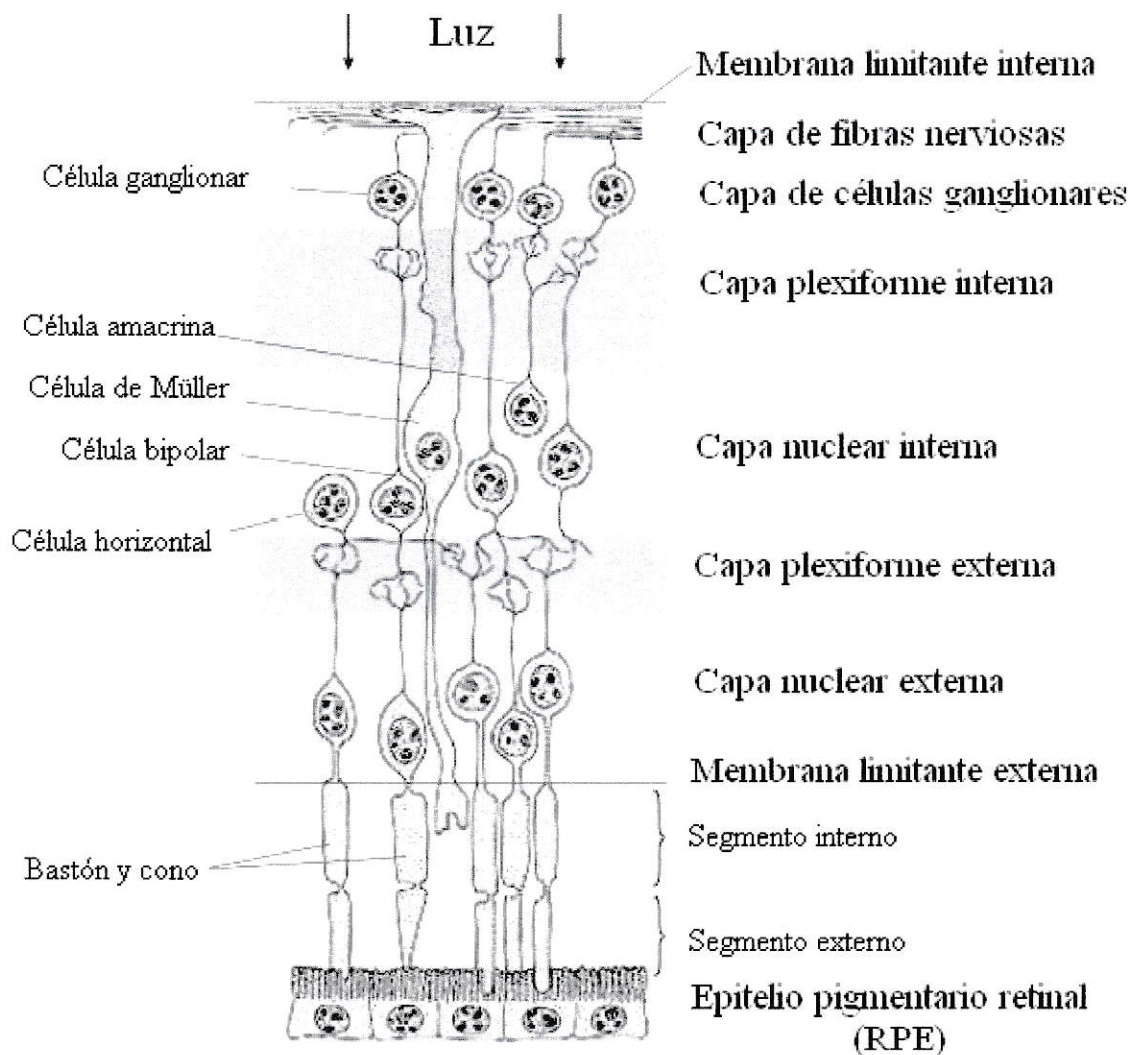


Figura 2. Esquema de la anatomía de la retina periférica de primates.

Los fotorreceptores, los bastones y conos, constituyen los receptores primarios de luz. Los bastones funcionan con bajas densidades de flujo de fotones (visión escotópica) y los conos con alta (visión fotópica). Así, los bastones poseen mayor sensibilidad retiniana, mientras los conos permiten la visión de colores, agudeza visual de alta resolución y percepción del movimiento y fijación. El epitelio pigmentario retinal, es esencial para la mantención del metabolismo de los fotorreceptores incluyendo el transporte, almacenaje y regeneración de los pigmentos visuales (Figura 3).

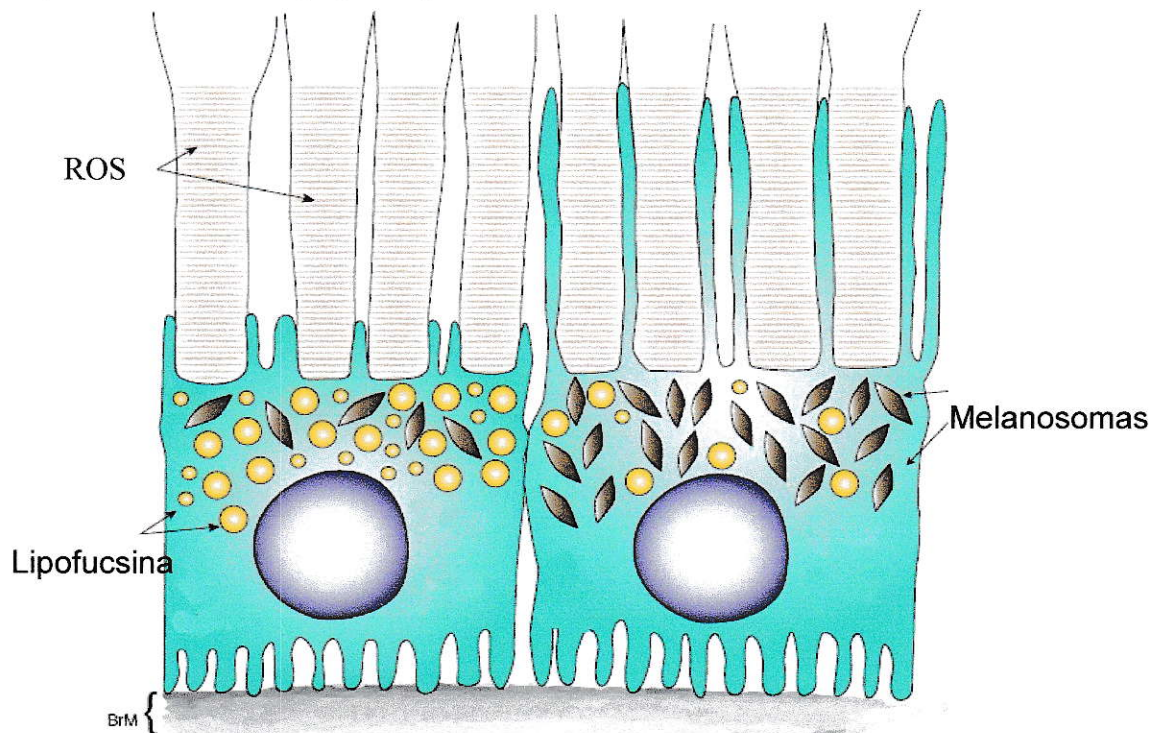


Figura 3. Esquema del epitelio pigmentario retinal (RPE) y segmentos externos de fotorreceptores (ROS).

En el citoplasma de RPE destacan la presencia de gránulos de lipofucsina y de melanosomas, BM: membrana basal de RPE (Burke *et al.*, 2005).

2. Mecanismos fotobiológicos

La luz visible (400-760 nm) incidente en el ojo humano es fuertemente refractada por la córnea, es transmitida a través del humor acuoso en la cámara anterior al cristalino donde es nuevamente refractada.

Después de la transmisión vía cuerpo vítreo, ésta radiación alcanza finalmente los fotorreceptores de la retina. Éstas estructuras son las que primariamente son alcanzadas por radiación UV y visible. Las capas neuronales desempeñan la compleja función de procesar la información, la señal visual primaria es transformada y transmitida a la corteza visual y áreas de asociación en el cerebro, generándose la imagen vista en el ojo.

Mucha de la radiación UV incidente (< 400 nm) es absorbida en la capa lagrimal, la córnea y cristalino. El cristalino y los tejidos de la porción anterior del ojo pueden ser expuestos a radiación UV sobre 295 nm y a la retina sólo llegará una pequeña fracción de la radiación UV incidente. La absorción de los medios oculares ha sido estudiada ampliamente. Sliney & Wolbarsht en el año 1980 y Boettner & Wolter en el año 1962 midieron la transmisión de la radiación UV en la córnea, humor acuoso, cristalino y vítreo en ojos humanos frescos enucleados. La córnea absorbe toda la radiación menor a 300 nm, mientras sobre 300 nm se transmite a través de ésta. Alrededor del 60% de radiación UV de 320 nm y 80% de 380 nm es transmitida a través de la córnea. El humor acuoso transmite mucha de la radiación UV incidente (90% transmisión en 400 nm) sin evidencias de dispersión.

En el segmento anterior, el epitelio pigmentario y los melanocitos del iris absorben y bloquean radiación visible y UV. Este es un efecto fotoprotector; en el segmento posterior el epitelio pigmentario retinal (RPE) localizado detrás de la retina provee fotoprotección por absorción de la radiación reflejada.

Barker y Brainard cuantificaron el cambio en la transmitancia del cristalino con la edad. Los estudios demuestran disminución de la transmitancia, con el avance de la edad, en el rango visible.

Absorción de la radiación por el ojo humano

Para que la radiación visible llegue a la retina se debe absorber el resto de las longitudes de onda, cada rango de longitud de onda podría afectar diferentes áreas del ojo. La radiación ambiental que proviene del sol contiene diversas cantidades de radiación UV y visible.

El ojo del primate humano tiene características de filtro únicas. La córnea impide el paso de las longitudes de onda menores a 295 nm, entonces filtra todo el rango UV-C y parte del rango UV-B natural o de fuentes artificiales. En el adulto, el cristalino absorbe el resto de la UV-B y toda la UV-A (295-400 nm). Entonces, sólo la fracción visible puede llegar a la retina.

Existen estudios donde se demuestra que el cristalino del humano joven permite el paso de una pequeña parte de la UV-B (320 nm) a la retina, por otro lado en el cristalino de los mayores se filtra aún más la fracción azul del visible (Boettner EA, 1962; Sliney DH, 1980; Brainard, (1993)). En ausencia del cristalino, condición llamada afaquia, y en ciertas formas de ceguera hay

algunos cambios en las longitudes de ondas características que llegan a la retina, lo que potencialmente podría dañarla. En las Figuras 4 y 5 se observan las características descritas.

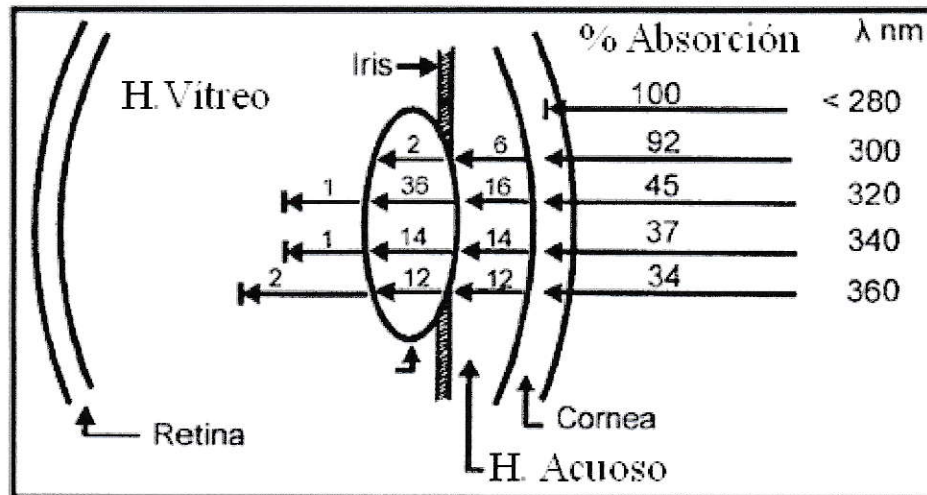


Figura 4. Absorción esquemática de radiación UV en los medios oculares.

Los valores representan el porcentaje de diferentes longitudes de onda en el UV, incidentes desde la superficie corneal, que son absorbidas por las estructuras del ojo.

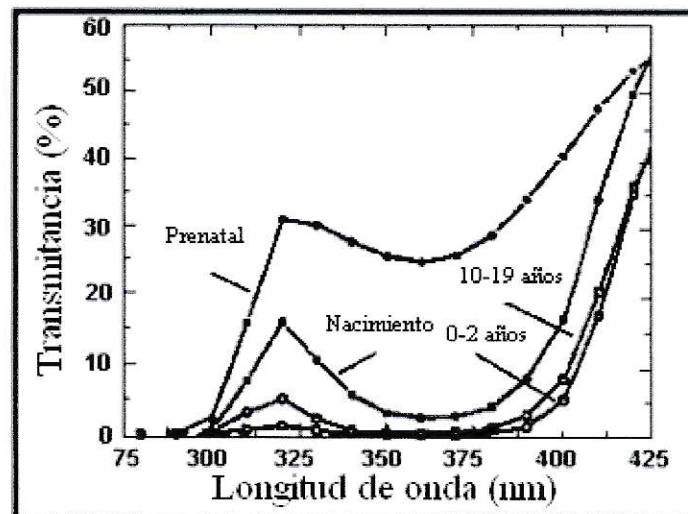


Figura 5. Transmisión espectral del cristalino humano en función de la edad.

(<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm>).

Daño directo de la radiación solar en el ojo

La exposición de la córnea a radiaciones de longitudes de onda corta causa una reacción inflamatoria. Esta puede ser muy dolorosa y es similar a una quemadura solar en la piel, fenómeno conocido como queratitis. Sin embargo, la córnea puede no sufrir un daño permanente. El daño de la radiación UV sobre el cristalino y el daño de la radiación visible sobre la retina son indoloros, acumulativos y permanentes. Esto puede llevar a la formación de cataratas (corregible por cirugía) y a degeneración macular relacionada a la edad (primera causa de ceguera en países desarrollados) ocasionando ceguera permanente puesto que hasta el momento no existe tratamiento para esta enfermedad.

Degeneración macular relacionada a la edad (AMD)

Corresponde a una enfermedad caracterizada por la pérdida de células del epitelio pigmentario y atrofia de los fotorreceptores de la región macular de la retina central (Tarita-Nistor *et al.*, 2006). Las células del epitelio pigmentario se van cargando con gránulos de lipofucsina y característicamente aparecen cuerpos residuales llamados “drusas” por debajo del epitelio pigmentario retinal (RPE) y por sobre su membrana basal denominada membrana de Bruch (Katz, 2002).

Es importante analizar y caracterizar esta enfermedad no sólo por sus profundos efectos en la visión central de los pacientes añosos, sino también por la potencial asociación con otros desordenes sistémicos. Es la primera causa de defecto visual en USA en personas mayores de 65 años de edad. La condición AMD hoy cobra vital importancia debido al incremento en el envejecimiento de la población, se estima que la baja visión afecta aproximadamente 1 de cada 28 estadounidenses sobre 65 años, para el año 2020 el número de individuos que padezcan de AMD aumentará en 50%, mientras que diversas líneas de evidencia que incluyen estudios en gemelos y agregación de población, han implicado un componente hereditario en el desorden, otros factores como la dieta, tabaco, obesidad y enfermedades vasculares subyacentes pueden ser importantes (Slakter *et al.*, 2005).

Genéticamente se ha asociado un mayor riesgo de desarrollo de AMD con variantes de secuencias de DNA en el factor de complemento inmune “Gen Factor H (HF1/CFH)”, una proteína íntimamente involucrada en procesos inflamatorios-inmunes mediados por complemento (Hageman *et al.*, 2005). La identificación de factores genéticos que predisponen al desarrollo de AMD confiere un efecto protector o de diagnóstico pre sintomático (Anand *et al.*, 2005).

Como su nombre lo dice, esta enfermedad compromete a la mácula y su entorno, sin afectar al resto de la superficie retinal y se caracteriza por una baja de la agudeza visual central. Sus manifestaciones son variadas, pero

básicamente se expresa en dos formas: un tipo atrófico o “seco” que constituye aproximadamente el 85% de los casos, y una forma exudativa o “húmeda”, responsable del 15% restante. El compromiso ocular es generalmente bilateral, aunque su manifestación puede no ser simultánea y de la misma severidad (Bird *et al.*, 1995).

La lipofucsina corresponde a cuerpos de almacenaje lisosomales que se acumulan en muchos tejidos durante el envejecimiento, se supone que la acumulación de estos gránulos juega un papel en el proceso de envejecimiento, sin embargo no se ha establecido una relación causal entre acumulación de lipofucsina y cambios funcionales asociados a la edad (Katz, 2002; de Grey *et al.*, 2005).

Las lipofuscinas tienen tres características primarias:

- Consisten en lisosomas secundarios intracelulares.
- Presentan una emisión “autofluorescente” amarilla cuando son excitados por fotones del rango ultravioleta cercano o de luz azul.
- Se acumulan durante el envejecimiento normal.
-

Las lipofuscinas se acumulan en varios tejidos animales como el corazón, piel, hígado, cerebro y músculos. El más estudiado es la lipofucsina que se acumula en el RPE del ojo mamífero (Katz *et al.*, 2002).

Epitelio Pigmentario Retinal

El RPE consiste de una mono capa de células que revisten aproximadamente los dos tercios posteriores del globo ocular de los mamíferos, esta justo por detrás de la retina neural y esta interpuesto entre las células fotorreceptoras y su flujo sanguíneo mantenedor a nivel de coroides. Así, la lámina de células del RPE forma el equivalente a la barrera hemato cerebral entre los capilares coroides y los fotorreceptores (Boulton, 2004).

EL RPE desarrolla una serie de funciones que son esenciales para mantener la función normal y la supervivencia del fotorreceptor. Todos los nutrientes y productos de desecho entre las células fotorreceptoras y la coroides son coordinados por el RPE, además participa en el recambio de los segmentos externos de los foto receptores, estos consisten de proyecciones tipo cono y tipo bastones que provienen de los cuerpos celulares de las células fotorreceptoras que se proyectan hacia el exterior del ojo (Burke *et al.*, 2005).

El extremo de los fotorreceptores está inmerso en la superficie apical del RPE. Periódicamente los fragmentos apicales son removidos desde los segmentos externos, estos son fagocitados y degradados por el RPE. La inhibición de esta función ha dado como resultado la degeneración de la célula fotorreceptora (Katz, 2002). Otra función del RPE es aportar el cromóforo derivado de la

vitamina A (11-cis-retinaldehído) requerido para la síntesis del pigmento visual por las células fotorreceptoras (Thompson *et al.*, 2003).

La lipofucsina se acumula en el RPE durante la senescencia. Como otras células, el RPE muestra un progresivo aumento en el contenido de lipofucsina durante el envejecimiento, esto es efectivo en cada especie de mamífero examinada (Katz, 2002).

El RPE tiene un número de características que lo hacen un excelente tipo celular para estudiar los mecanismos de formación de lipofucsina, dentro de las razones destacan:

1. Se conoce bastante acerca del metabolismo de RPE lo que puede ser relevante en la formación de lipofucsina.
2. El RPE es un tejido compuesto de una mono capa.
3. El RPE puede ser aislado del tejido circundante anatómica y fisiológicamente con relativa facilidad.

Estas características han hecho que el RPE sea el tejido celular formador de lipofucsina más extensamente estudiado (Katz *et al.*, 2002).

Se sabe que si la degradación de los segmentos externos de los fotorreceptores es inhibida, los fagosomas no degradados rápidamente desarrollan autofluorescencia parecida a lipofucsina y que si se retira la capa de fotorreceptores en estadíos tempranos del ciclo vital la acumulación de lipofucsina es disminuida.

Estos argumentos apoyan la idea que la lipofucsina es generada casi exclusivamente a partir de los segmentos externos de los fotorreceptores (Sundelin *et al.*, 2001). Se sabe que incluso gránulos de melanina pueden ser incorporados en gránulos de lipofucsina (Sundelin *et al.*, 2001).

La oxidación no enzimática pareciera estar involucrada en la formación de lipofucsina por el RPE. El estrés oxidativo parece estar involucrado en promover la acumulación de gránulos de lipofucsina en el RPE (Winkler *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2006).

La vitamina A tiene un rol en la formación de lipofucsina al permitir el ciclo visual de los retinoides, pues al menos uno de los fluoróforos de la lipofucsina del RPE (A2E) ha sido involucrado en mecanismos de fotooxidación (Shaban *et al.*, 2002; Dillon *et al.*, 2004).

3. Modelo de formación de lipofucsina.

La lipofucsina, a veces llamado el fluoróforo de la edad, hoy se entiende como un material fuertemente oxidado compuesto de proteínas covalentemente entrecruzadas, lípidos y oligosacaridos (Jung *et al.*, 2010). En el RPE del ojo se ha asumido que gran parte de la actividad como fluoróforo de la lipofucsina es debida a los metabolitos del retinal que acompaña a la rodopsina en el proceso de foto transducción que ocurre en el fotorreceptor.

Fototransducción:

El proceso de foto transducción involucra la llegada de energía como estímulo luminoso a una proteína acoplada a un pigmento visual (retinal), el fotón absorbido induce un cambio en la conformación de la proteína de membrana que contiene el retinal (rodopsina) y esto activa un proceso de transducción de señales intracelular. El mecanismo molecular consiste en la activación de una proteína G, que causa la estimulación de una fosfodiesterasa de GMP cíclico (cGMP), que aumenta la hidrólisis de cGMP por lo que la concentración citoplasmática de cGMP se reduce en la vecindad del fotón absorbido. Consecuentemente los canales dependientes de cGMP en la región no permanecen abiertos y una reducción localizada en el flujo de cationes ocurre (Na^+ y Ca^{2+} principalmente) al interior del segmento externo del fotorreceptor (Figura 6).

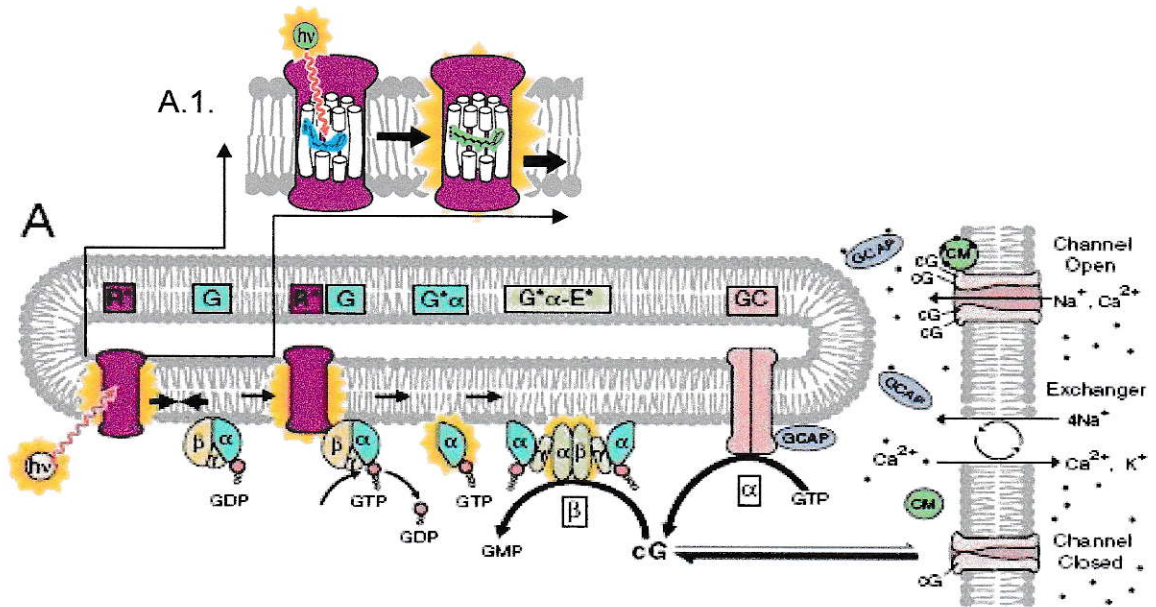
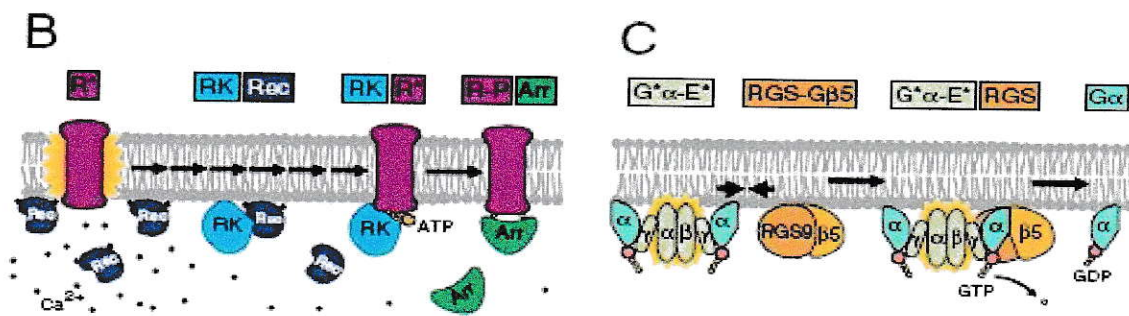


Figura 6. Esquema de cascada de foto transducción en fotorreceptores de vertebrados.

A. Después de la absorción de un fotón ($h\nu$), se produce la activación de la rodopsina (R^*) (A.1) esta contacta moléculas de proteínas G, catalizando el intercambio de GDP por GTP generando la forma activa G^* ($G\alpha$ -GTP). Dos subunidades G^* se unen a dos subunidades γ inhibitorias de la fosfodiesterasa (E), activando las subunidades catalíticas α y β de la fosfodiesterasa formando E^* la que cataliza la hidrólisis de cGMP. La reducción de la concentración plasmática de cGMP lleva al cierre de los canales que éste regula, bloqueando la entrada de Na^+ y Ca^{2+} ; un intercambiador $Na^+/Ca^{2+}, K^+$ continúa sacando calcio por lo que este disminuye en el citoplasma, activando mecanismos de retroalimentación de calcio (1 y 2). 1. Liberación de calcio por proteína activadora de guanilil ciclasa (GCAP) se une a dominio citoplasmático de guanilil ciclasa (GC), incrementando su actividad; 2. Liberación de Ca^{2+} desde calmodulina (CM) causando que se disocie de los canales bajando la sensibilidad de estos por cGMP.



Figuras 6 B y C. Esquema de cascada de foto transducción en fotorreceptores de vertebrados (continuación).

B. Inactivación of R^* . En la oscuridad la concentración de Ca^{2+} esta principalmente unida a recoverina (Rec) y es en esta forma que se une a la membrana; Rec-2 Ca forma un complejo con la rodopsina quinasa (RK), bloqueando su actividad. Así en nivel de Ca^{2+} de reposo, pocas moléculas de RK están disponibles para interactuar con R^* . Cuando la concentración de Ca^{2+} cae durante la respuesta a la luz, Rec libera su Ca^{2+} , y se disocia de RK. La concentración elevada de RK libre aumenta la frecuencia de interacción entre R^* y RK, permitiendo una más rápida fosforilación de R^* . Arrestina (Arr) sustancialmente apaga la actividad de R^* . C. Inactivación de $G^*\alpha-E^*$. G^* es inactivado cuando el fosfato terminal de su unión a GTP es hidrolizado. Mientras la proteína G tiene una actividad GTPasa intrínseca, su capacidad sólo está permitida cuando G^* está unida a PDE γ y cuando además, la proteína aceleradora de GTPasa (o factor GAP) RGS9- $G\beta\delta$ también se une. El complejo tetra molecular resultante $G^*\alpha$ -PDE γ -RGS9- $G\beta\delta$, rápidamente hidroliza el GTP a GDP, resultando la subunidad $G\alpha$ en su forma inactiva. El $G\alpha$ -GDP inactivo se disocia desde la PDE, por lo que E^* y G^* son inactivados simultáneamente (DeGrip *et al.*, 2000).

El retinoide derivado de la vitamina A es incorporado en una vía metabólica en el fotorreceptor y en el epitelio pigmentario retinal. (Figura 7).

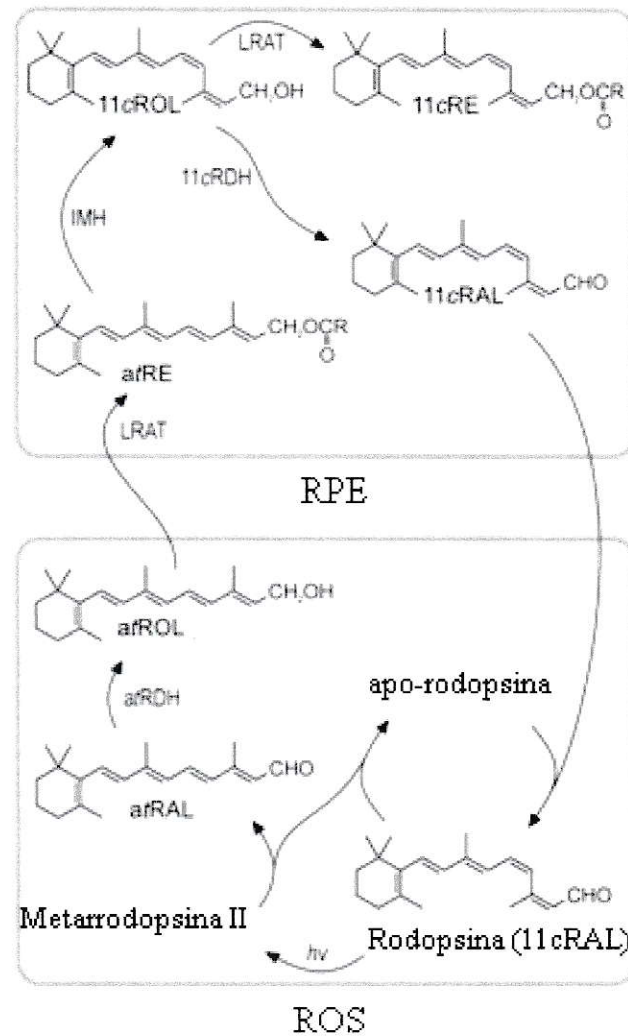


Figura 7. Vía metabólica de los retinoides en retina y epitelio pigmentario retinal.

(Radu *et al.*, 2003)

El ciclo visual se mantiene mediante la regeneración de la rodopsina. La absorción de un fotón ($h\nu$) por una molécula de rodopsina en un disco de un ROS de fotorreceptor induce foto isomerización del cromóforo 11cRAL,

activándose en meta rodopsina II. Después de algunos segundos, meta-rodopsina II decae en apo-rodopsina y *atRAL* libre. La eliminación de *atRAL* desde el interior de los discos de ROS es facilitado por un transportador ABCR. El *atRAL* es reducido a *atROL* (vitamina A) por la deshidrogenasa *atROL* (*atRDH*). El *atROL* es liberado desde el ROS y captado por una célula del RPE, donde es esterificado por la lecitina retinol acil transferasa (LRAT) para formar un éster *all-trans*-retinil (*atRE*).

La isomerización química es efectuada por isómero-hidrolasa (IMH), que usa *atRE* como sustrato. El 11cROL resultante es oxidado por 11cRDH a la forma cromófora 11cRAL. 11cRDH es inhibido por isotretinoína. 11cROL puede también servir como sustrato a LRAT para formar 11cRE. El paso final es la recombinación de 11cRAL con apo-rodopsina en el ROS para formar una nueva molécula de rodopsina sensible a la luz (Radu *et al.*, 2003).

La molécula de todo-trans-retinal generado en el segmento externo de los foto receptores durante la saturación luminosa del pigmento visual puede reaccionar con moléculas que contienen aminas en los segmentos externos para generar inicialmente bases amino-retinales de Schiff (Sparrow *et al.*, 2003). Fluoróforos de lipofucsina en el RPE son entonces generados por modificaciones posteriores para generar fluoróforos mayores. Así cualquier efecto que haga aumentar los niveles de todo-trans-retinal o aumentar su vida media podría promover la formación de lipofucsina. Mucho del todo-trans-retinal generado es

apagado rápidamente, reducido a todo-trans-retinol por la deshidrogenasa todo-trans-retinol de los segmentos externos de los fotorreceptores (Katz *et al.*, 2002).

Este retinoide es metabolizado a través de una serie de pasos que involucran a los fotorreceptores y al RPE para que el 11-cis-retinaldehído se combine con la apo-proteína visual (rodopsina) y de este modo regenerar un pigmento visual funcional, esto se conoce como el ciclo visual (Katz *et al.*, 1995; Redmond *et al.*, 1998).

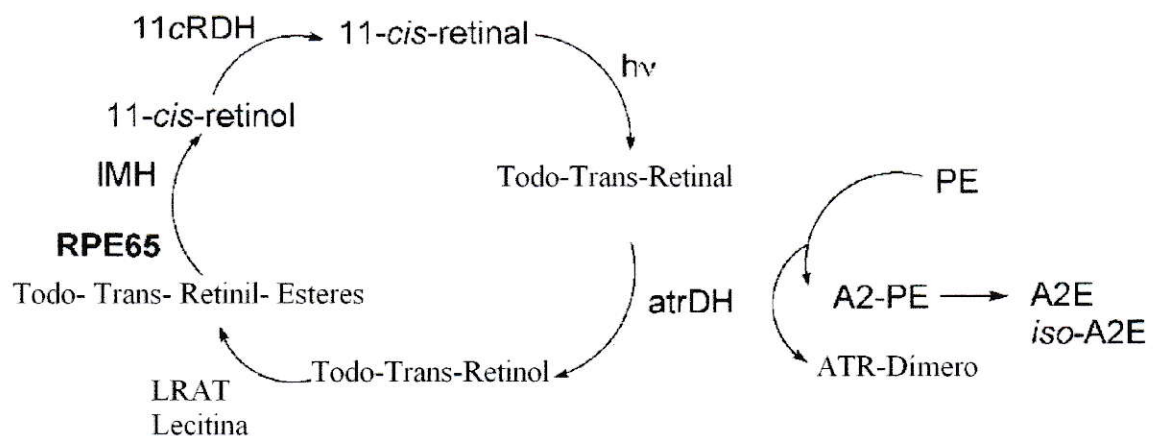


Figura 8. El ciclo del retinoide y la formación de fluoróforos de lipofucsina A2E, iso-A2E, y dímero todo-trans-retinal (ATR).

Bajo la foto isomerización de 11-cis-retinal, todo-trans-retinal es liberado desde la rodopsina y reducido a todo trans retinol por la enzima todo trans retinol

deshidrogenasa (atrDH). La enzima Lecitina retinol acetil-transferasa (LRAT) genera todo-*trans*-retinil ésteres desde todo-*trans*-retinol, y RPE65 presenta retinil ésteres a isómero-hidrolasa (IMH) para procesar a 11-*cis*-retinol. 11-*cis*-retinol es entonces oxidado por 11-*cis*-retinol deshidrogenasa (11-cRDH) para regenerar 11-*cis*-retinal. Todo-*trans*-retinal que evade la reducción reacciona con fosfatidiletanolamina (PE) (2:1) para generar el precursor A2-PE, desde donde deriva A2E, iso-A2E, ATR dímero (Kim *et al.*, 2004) (Figura 8).

En la figura 9 se observan las estructuras de A2E e iso-A2E. Estos pigmentos se interconvierten bajo la influencia de la luz (Kim *et al.*, 2004)

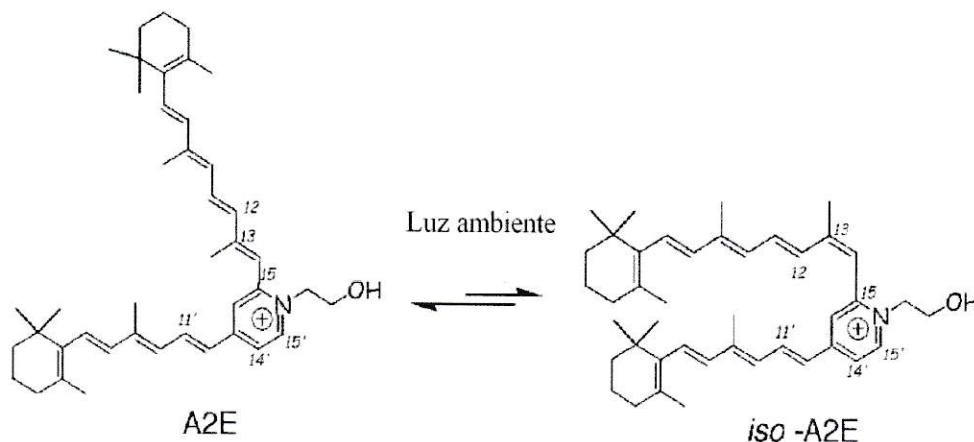


Figura 9. Estructura de derivados del retinoide, A2E e iso-A2E.

El estrés oxidativo induce acumulación de fluoróforos en el RPE encontrados en la lipofucsina presente en la retina. Este modelo resulta del efecto de depleción de NADPH inducido por la oxidación, que es necesario para reducir al todo-

trans-retinal a todo-trans-retinol, así la acumulación de sus derivados promovería la formación del fluoróforo de lipofucsina. El resultado final es la acumulación de un material lipoproteico parcialmente soluble al interior de los gránulos de lipofucsina del RPE (Katz *et al.*, 2002)

Estudios recientes han intentado develar los componentes de la lipofucsina del RPE y de las drusas. Por intermedio de experimentos proteómicos analizados por espectrometría de masas se ha encontrado una serie de componentes proteicos que estarían involucrados, donde destacan proteínas de estrés celular como alfa cristalinas presentes tanto en la lipofucsina como en las drusas del RPE (Crabb *et al.*, 2002; Schutt *et al.*, 2002; Warburton *et al.*, 2005; Nordgaard *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010). Su papel en estas estructuras ha permanecido sin una clara respuesta. La expresión de Alfa cristalinas se ha asociado al rescate de células de RPE que están en vías de apoptosis. La expresión se hizo induciendo con fuentes luminosas intensas incidentes sobre la retina murina (Sakaguchi *et al.*, 2003). Este daño fotooxidativo ha sido utilizado frecuentemente como modelo de estudio de daño fotónico homologable al daño acumulativo existente en AMD (Rozanowska *et al.*, 1995; King *et al.*, 2004). Existe evidencia en estudios de cristalino en donde es posible visualizar proteínas Alfa cristalinas fotooxidadas y aparición de fluorescencia (Teesalu *et al.*, 1997; Siik, Seppo, 1999; Bron *et al.*, 2000). Un interesante trabajo desarrollado en la Universidad de Oulu, demuestra un aumento de la

autofluorescencia del cristalino humano adulto cuando es excitado con una longitud de onda de alrededor de 495 nm (Siik, Seppo, 1999).

4. Proteínas cristalinas.

Corresponden a un grupo de proteínas que se aislaron inicialmente de las células epiteliales y en las fibras cristalinas, posteriormente se encontraron en otros tejidos del ojo como iris, retina, RPE, músculo ciliar, endotelio corneal y trabéculo corneal. Además se expresan también en otros tejidos, como piel, corazón, músculo esquelético, cerebro médula espinal y pulmón. Son proteínas solubles en agua clasificadas primariamente según su patrón migratorio en un campo eléctrico (electroforesis). Actualmente se dividen en Alfa cristalinas; que comprenden Alfa A y alfa B, β cristalinas divididas en β_H (heavy) y β_L (light) y las γ cristalinas que poseen 6 subtipos humanos: γA , γB , γC , γD , γE , γF . Las β y γ cristalinas se consideran como miembros de la misma familia en base a su función. Se ha postulado que las Alfa cristalinas se relacionan con "Heat shock proteins" (Narberhaus, 2002). Existen 2 genes de Alfa cristalina, Alfa A y Alfa B que codifican proteínas con un 60% de identidad (Bloemendal *et al.*, 1991). Ambas contienen el dominio Alfa cristalina característico de "small heat shock proteins (sHsps)" (de Jong *et al.*, 1998).

La Alfa B cristalina está más ampliamente expresada y abundante en cerebro, músculo y corazón (van Rijk *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 2003). Estas proteínas se encuentran en el cristalino y su síntesis es controlada durante la diferenciación en las células fibrilares del cristalino (McAvoy, 1980; van Leen *et al.*, 1987). Se ha visto que la pérdida de la estructura cuaternaria oligomérica de Alfa cristalina no afecta mayormente su función de chaperona molecular (Horwitz *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2004), aunque existe un estudio que dice lo contrario (Klymchenko *et al.*, 2004), incluso después de condiciones de estrés las Alfa A y B cristalinas no se encuentran en el mismo estado macromolecular (Wang *et al.*, 2004). Se ha observado una interesante actividad de chaperona molecular del péptido DFVIFLDVKHFSPEDLTVK de Alfa A cristalina que puede inhibir la fibrillogénesis y la toxicidad del amiloide beta “in vitro” (Santhoshkumar *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2006).

La Alfa B cristalina reconoce dominios proteicos específicos en homogeneizados de células cristalinas durante estrés térmico, siendo los filamentos intermedios los que son protegidos contra la desnaturación bajo condiciones de estrés termal medio (Liang *et al.*, 1997; Muchowski *et al.*, 1999; Hoehenwarter *et al.*, 2005), así, las mutaciones en el gen de Alfa B cristalina se han asociado a miopatía y catarata (Paulin *et al.*, 2004; Perng *et al.*, 2004). Estos datos muestran un rol protector de la Alfa B cristalina sobre el citoesqueleto. En estudios en líneas celulares “Knock out” para Alfa A cristalina

se vio que al expresar la Alfa A aumentaba el crecimiento y resistencia al estrés causado por UV-A (Andley *et al.*, 1998).

Además se ha evidenciado, el rol protector de Alfa A y B cristalinas durante la inducción de apoptosis “in vitro”, al analizar su participación en la activación inducida por UV-A de la vía RAF/MEK/ERK (Liu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Existe evidencia concordante entre la elevación de los niveles de la chaperona “housekeeping” clásica Hsp 70 y el estrés térmico. Asimismo la elevación de los niveles de Alfa cristalina inducida por estímulos luminosos intensos ha sido documentada (Sakaguchi *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2004).

Es importante considerar que en el cristalino las longitudes de onda entre 320 y 1500 nm, que afectan al globo ocular humano, producen una irradiación focal que genera un aumento en la temperatura local, según un modelo matemático desarrollado por Okuno y Sliney (Okuno *et al.*, 2005) al ocupar fuentes de iluminación ocular. Si esto es correcto, es posible pensar que lo mismo puede ocurrir “in vivo” al interior del globo ocular cuando es expuesto a fuentes de radiación electromagnética en este rango, por lo tanto un incremento en la temperatura intraocular producto de transferencia de energía podría ser considerada como “estrés térmico” sobre el cristalino y de expresión de Alfa cristalinas (Attanasio *et al.*, 2009).

5. Autofluorescencia de RPE.

En los últimos años se ha logrado visualizar la autofluorescencia del RPE en relación a envejecimiento. En una primera etapa de degeneración macular asociada a la edad, los patrones de fluorescencia iniciales conllevan la aparición de autofluorescencia de intensidad creciente y posteriormente la desaparición de ella con pérdida de células del RPE asociadas. Estos estudios inicialmente se realizaron utilizando técnicas convencionales de histología de tejidos humanos, descritos inicialmente por Allan Bird en el instituto de oftalmología del Moorfields Eye Hospital en Londres.

En la actualidad es posible realizar mediciones “in vivo” en humanos mediante el uso del “oftalmoscopio confocal de Heidelberg”. Este es un sistema óptico confocal equipado con un láser de una longitud de onda de 488 nm, diseñado para la adquisición de imágenes del polo posterior del ojo. Permite la evaluación cuantitativa de la topografía de las estructuras oculares y el seguimiento preciso de cambios topográficos en el tiempo (Figura 10). Cuenta con filtros de emisión para obtener imágenes de fluorescencia mediante el uso de sondas extrínsecas como fluoresceína o de autofluorescencia del RPE (Figura 11).



Figura 10. Oftalmoscopio confocal de Heidelberg.

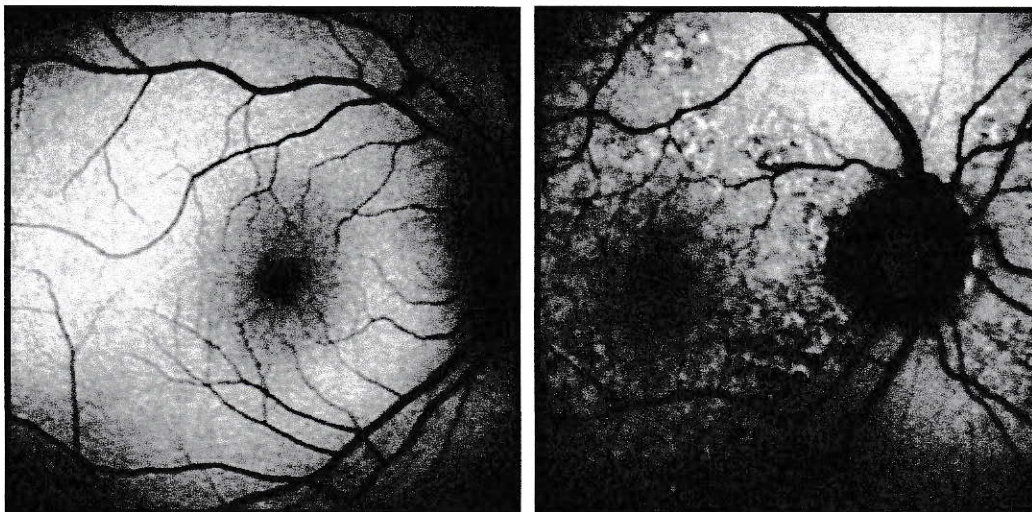


Figura 11. Imágenes obtenidas con el oftalmoscopio confocal de Heidelberg.
A .Fotografía de retina sana, D. Fotografía de retina de paciente con AMD. En ambas se aprecia autofluorescencia del RPE.

Hasta la fecha no ha sido posible explicar cabalmente la razón del aumento de la autofluorescencia del epitelio pigmentario sometido a estrés o envejecimiento. En un estudio realizado por F. Delori se demostró que esta fluorescencia proviene de gránulos de lipofucsina al interior del RPE (Delori *et al.*, 1995), en un reciente reporte M. Han describe la aparición de fluorescencia de RPE mediante microscopía confocal de doble fotón, en donde se observa que el comportamiento de los fluoróforos existentes al interior de los gránulos de lipofucsina experimentan un corrimiento hacia longitudes de onda de más alta energía, al utilizar muestras de tejido ocular humano en edades crecientes (Han *et al.*, 2006).

Considerando los efectos fototóxicos y oxidativos a los que se expone la retina en la región macular, es posible pensar que el epitelio pigmentario retinal, que mantiene las funciones básicas de los fotorreceptores de la retina, se sobrecargue de proteínas de estrés celular tales como Alfa cristalina para enfrentar los daños oxidativos, dados por el medio ambiente en que se encuentra. Estudios en cristalino expuesto a daño fotooxidativo directo, han demostrado la propiedad de autofluorescencia de un depósito agregado lipoproteico (catarata) compuesto por Alfa cristalina en cerca de un 50% de su masa proteica. La formación de depósitos extracelulares insolubles consistentes de proteínas mal plegadas agregadas, constituyen el sello de muchas enfermedades neurodegenerativas (Luibl *et al.*, 2006). Estos depósitos

extracelulares están también presentes en ojos humanos envejecidos y en aquellos afectados por degeneración macular relacionada a la edad, estos reciben el nombre de drusas y se encuentran bajo la membrana basal del epitelio pigmentario y la capa interna de la membrana de Bruch. A pesar de la relación bien establecida entre la presencia de lipofucsina y drusas en AMD la causa principal de la formación de éstas y su rol en la degeneración de fotorreceptores y RPE permanece velada. El propósito de este trabajo es encontrar una relación que explique el aumento de la autofluorescencia del RPE y la presencia de proteínas Alfa cristalinas en base a la composición proteica de la lipofucsina del RPE, en un modelo animal de estudio de AMD y en RPE de ojos humanos enucleados.

B. Hipótesis.

El aumento de la autofluorescencia de lipofucsina en el epitelio pigmentario retinal, se relaciona a la expresión de Alfa cristalinas de estrés celular en el epitelio pigmentario retinal y en la retina.

Hipótesis alternativa

El aumento de la autofluorescencia de lipofucsina en el epitelio pigmentario retinal, se debe a la acumulación de productos no degradados de la célula del epitelio pigmentario retinal.

Objetivo general

Determinar el efecto del estrés oxidativo celular retiniano producto de la edad sobre la expresión de proteínas Alfa cristalinas y su relación con el aumento de la autofluorescencia de lipofucsina y sus componentes, en el epitelio pigmentario retinal.

Objetivos específicos

1. Determinar la autofluorescencia de retinas - RPE normales y retinas - RPE expuesta a fotooxidación y oxidación química producto de la edad "in vivo" e "in vitro".
2. Determinar el patrón diferencial de expresión proteico en lipofucsina de RPE expuesta a fotooxidación y oxidación química producto de la edad "in vivo" e "in vitro".
3. Demostrar la presencia de Alfa cristalina en lipofuscinas de retinas - RPE normales y retinas - RPE expuesta a fotooxidación y oxidación química producto de la edad "in vivo" e "in vitro".
4. Determinar la autofluorescencia de lipofucsina aislada de RPE expuesta a daño oxidativo y relacionarlo con la autofluorescencia de Alfa cristalina.

C. Materiales y métodos.

Modelos para caracterizar la lipofucsina del epitelio pigmentario retinal.

Para determinar la génesis y las características estructurales de la lipofucsina del epitelio pigmentario, se utilizaron dos modelos de trabajo en humanos y uno que se evaluó como modelo animal experimental en *Octodon degus*.

Modelo Humano.

1. Epitelio pigmentario de globos oculares humanos enucleados

Método:

El RPE fue aislado desde retinas de ojos humanos obtenidos desde el banco de ojos San Diego Eye Bank, San Diego, California, USA. La técnica de extracción y cultivo del RPE humano se adaptó al uso de 'cylinder technique' descrita por (Boulton *et al.*, 1982). Brevemente los pasos consistieron en separar el segmento anterior del globo ocular (córnea, limbo córneo escleral, esclera iris y cristalino) y el cuerpo vítreo del segmento posterior (retina, coroides y resto de esclera.) Posteriormente se realizó la separación del RPE del cuerpo vítreo y de la retina neural. Una vez separada la retina, se disectó en segmentos de cilindros de acero de 10 mm, llenos con una solución de tripsina al 0,25%, se

incubaron por 1 h a 37° C y s desprendieron con movimientos de pipeta suaves (Figura 12).

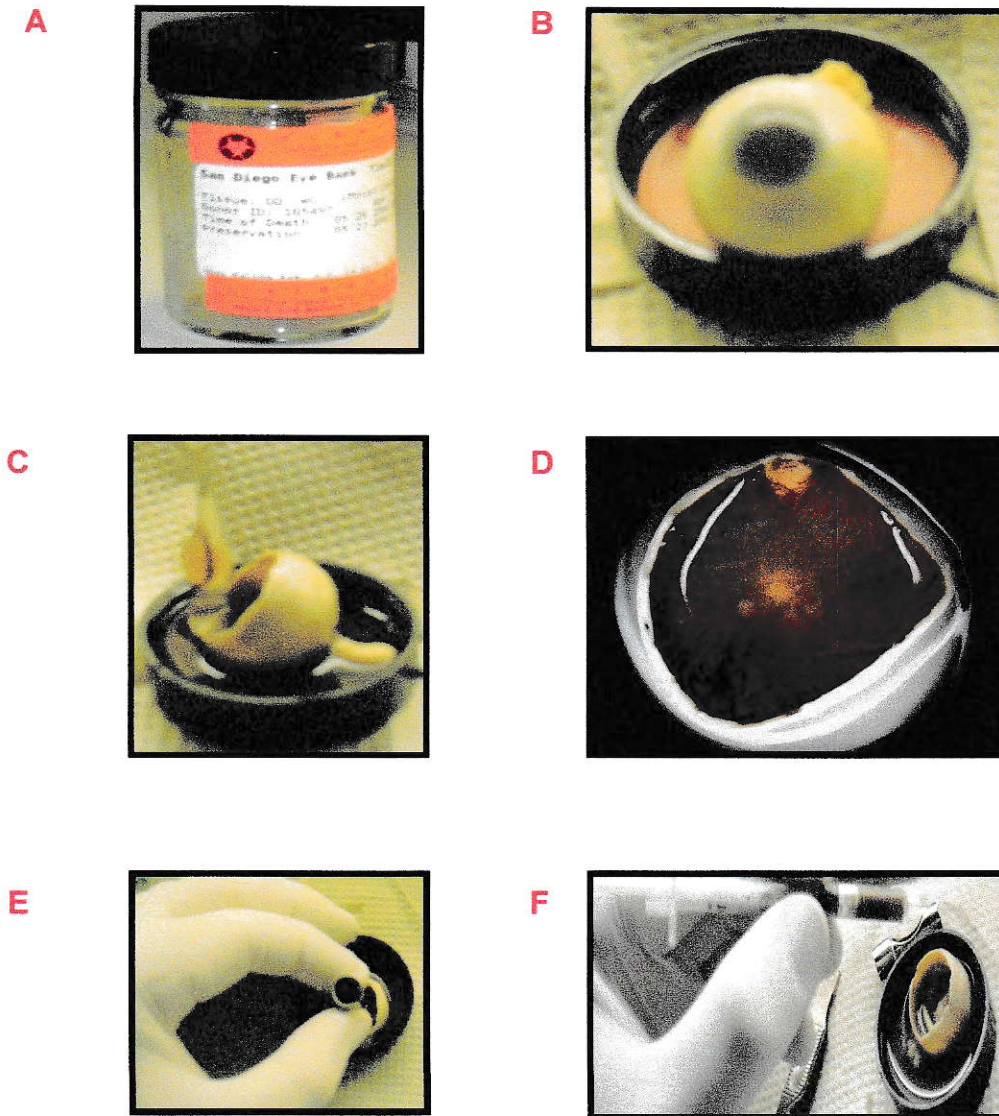


Figura 12. Manipulación y extracción de RPE desde ojos humanos.

A y B Globo ocular humano abierto antes de extraer epitelio pigmentario, C. separación de segmento anterior (córnea-iris) y cristalino. D. visión del polo posterior del globo ocular. E: Marcación de epitelio pigmentario con un trépano de 8 mm, F: Recuperación de células de epitelio pigmentario humano.

2. Modelo ARPE – 19.

Método.

Se utilizó la línea celular diploide de RPE humano ARPE-19 (Dunn *et al.*, 1996). ARPE-19 proviene de un cultivo primario obtenido de un dador masculino de 19 años. La línea celular se purificó por tripsinización de un cultivo de RPE y se obtuvo una población uniforme de células epiteliales que exhibieron características morfológicas, estructurales y funcionales similares a RPE *in vivo* y una distribución polarizada de marcadores de superficie (Dunn *et al.*, 1998). Este método se ha convertido en una herramienta importante para estudios “*in vitro*” de la fisiología del RPE.

Las células se crecieron en tubos de cultivo Falcon de plástico, que contenían medio de cultivo F10 de HAM suplementado con 20 % suero fetal bovino, 0,4 % de glucosa y antibióticos (penicilina (150 µg/ml), estreptomycin (0,375 µg/ml) y anfotericina (0,012% en solución salina), mantenidos a 37° C en un incubador suplementado con CO₂ (95% aire / 5% CO₂). La manipulación de los cultivos se llevó a cabo bajo cámara de cultivo y con técnica de procesamiento de material estéril.

Modelo animal

Octodon degus

Es un roedor de hábito diurno en invierno, y diurno-crepuscular en verano, se localiza sobre la superficie terrestre y posee ritmos circadianos como los humanos (Lee, 2004). Este se ha relacionado con patologías neurodegenerativas como Alzheimer y cataratas (Inestrosa *et al.*, 2005; van Groen *et al.*, 2009).

Debido a sus características especiales es que lo usamos como modelo para la formación de lipofucsina como parte del estudio de AMD, dado que hasta la fecha no se ha encontrado un modelo animal que permita transferir los resultados al humano (Chan *et al.*, 2008; Hirata *et al.*, 2009)

Octodon degus (Degú) es de un tamaño moderado, precoz pero de maduración lenta, roedor histricomorfo de Chile central, tienen características fundamentales de funciones circadianas lo que lo diferencia de los roedores nocturnos, como ratas o hámster.

En el laboratorio el ciclo de vida del Degú es al menos de 3 años y algunos pueden llegar a los 5-7 años. Sin embargo, la reproducción femenina cae después de los 4 años. Aquí proponemos las bases para el estudio de la degeneración retiniana asociada a la edad (modelo AMD), considerando su ciclo de vida, hábitos diurnos y enfermedades neurodegenerativas descritas previamente.



Figura 13. *Octodon degus* de 1,5 años en etapa previa a inducción anestésica.

Usamos *Octodon degus* de 12 a 36 meses de vida, y de diferentes pesos, (promedio 250 gramos). Los animales se criaron desde el nacimiento en las mismas condiciones, alimentados y crecidos “ad libitum” (Figura 13).

Técnica de anestesia general

Etapa de inducción.

Se preparó el área quirúrgica y sala a 25° Celsius. Usamos Isoflurano y un vaporizador lo que permitió mantener concentraciones controladas del gas anestésico, este se acopló a una fuente constante de oxígeno de 0,5 l/min.

El animal se mantuvo en un recipiente plástico hermético de 10 cm de alto, 15 cm de ancho y 25 cm de longitud, el que se conectó mediante un tubo de silicona al sistema de anestesia con Isoflurano.

La anestesia se indujo con 5% de Isoflurano como dosis de carga durante 10 minutos, después de esto cuando la respuesta del animal a estímulos mecánicos decayó y el reflejo corneal se abolió, terminó la fase de inducción. (Figura 14)

Etapa de mantención.

En esta fase la dosis de Isoflurano disminuye al 2% de la concentración del vaporizador, mientras tanto el tiempo de anestesia permitió manipular al animal con libertad por cerca de 30 minutos.

La profundidad de la anestesia de mantención se monitorizó mediante la frecuencia respiratoria, la cual disminuye según el grado de anestesia

Después del procedimiento quirúrgico el animal consiguió recuperarse de la anestesia general y las capacidades de movimiento y autoalimentación se lograron alrededor de una hora después.

Es muy importante controlar la frecuencia respiratoria por la relación directa entre el Isoflurano y la depresión del centro respiratorio.



Figura 14. Sistema de anestesia general para las fases de inducción y mantención para *Octodon degus*.

Técnica de anestesia local peri bulbar

Se utilizó esta técnica anestésica complementaria para asegurar que el animal tuviese el mínimo de dolor posible en el momento quirúrgico y posteriormente se utilizó un anestésico local común combinado con otro de larga vida media, con el mismo objetivo.

Durante la fase de mantención se aplicó al animal la inyección de anestesia local compuesta de una mezcla de 1,5 ml de lidocaína, bupivacaína y hialuronidasa en el espacio peri bulbar con una jeringa de tuberculina (Figura 15).

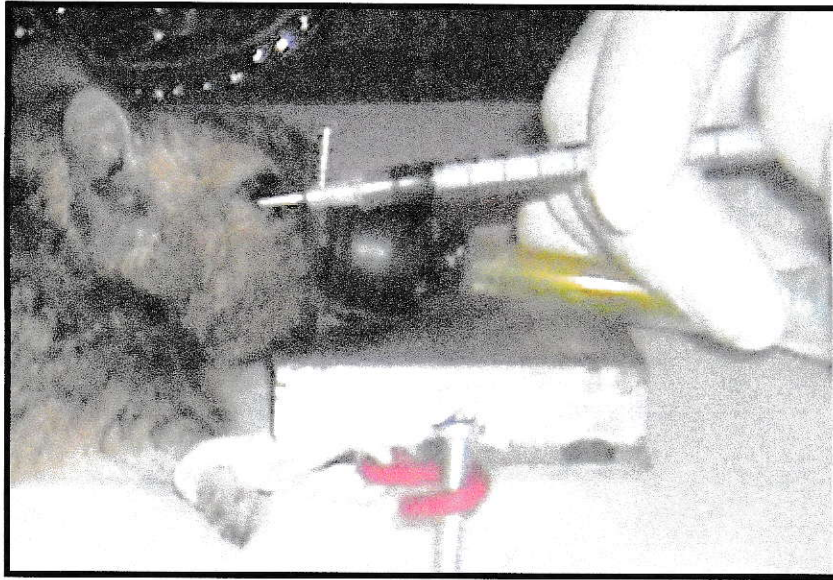


Figura 15. Fotografía de proceso de anestesia local peri bulbar de ojo derecho de *Octodon degus*.

Técnica quirúrgica

Después de la anestesia el globo ocular elegido se removió con una pinza de 0,2 mm y una tijera de micro disección Wescott mediante una peritomía conjuntival en 360 grados. El ojo se rotó hacia la parte nasal hasta alcanzar los músculos extra oculares con la pinza, que se desinsertaron de las fijaciones esclerales, todo esto bajo microscopio quirúrgico. Una vez liberados los músculos, se seccionó el nervio óptico y los vasos del polo posterior y después de la enucleación, el ápex y los vasos orbitarios se comprimen con una esponja hemostática por cinco minutos. Posteriormente una gota de cianoacrilato se instiló en la cavidad orbitaria seguida de dos puntos separados de vycryl 7-0

(Figura 16). El globo ocular se mantuvo en solución salina balanceada hasta su uso posterior.

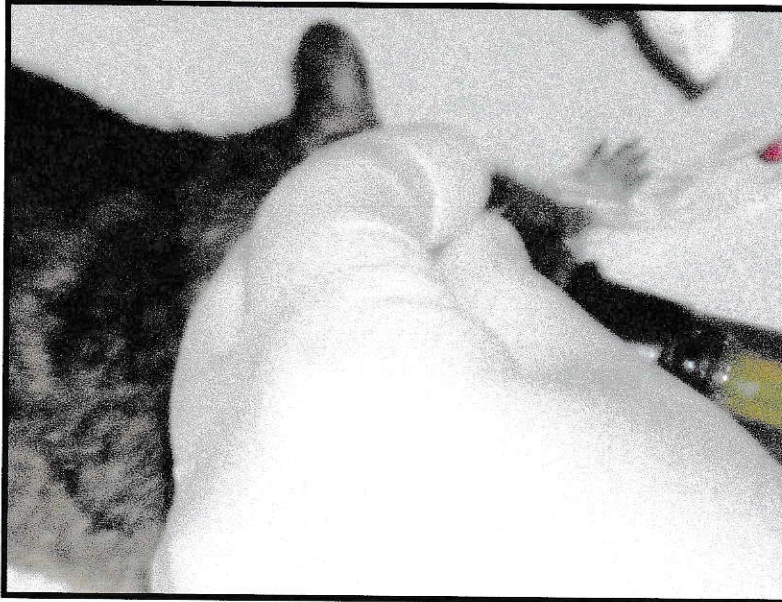


Figura 16. Extracción de globo ocular de *Octodon degus* bajo anestesia general.

Microscopía e histología

Campo claro:

El globo ocular se fijó con formaldehído 5% y trató con alcohol en concentraciones crecientes para deshidratarlo e incluirlo en resina epóxica. Después de la inclusión se seccionó utilizando un ultramicrotomo Reichert, cada sección se visualizó con un microscopio Ortoplan de Leitz.

Microscopía de Epifluorescencia.

Las células del epitelio pigmentario retinal se separaron de la retina neural bajo el microscopio y se visualizaron directamente para evitar el efecto de algún agente de fijación como formaldehído y asegurar el registro de fluorescencia del tejido, que se visualizó con un microscopio de epifluorescencia Nikon equipado con filtros de emisión de fluorescencia de 360-380, 470-490 y 550-570 nm.

Microscopía confocal.

Las células del epitelio pigmentario se separaron de la retina neural bajo el microscopio y se visualizaron directamente para evitar el efecto del formaldehído u otro fijador. Se registraron y visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM con un láser de excitación a 488 nm y filtros de emisión de 505-550 y 560-615 nm. Conjuntamente se observaron las placas fijadas y usadas en microscopía de campo claro sin el uso de alguna sonda extrínseca fluorescente.

Microscopía electrónica.

1. Microscopía electrónica de transmisión.

Los globos oculares se fijaron en formaldehído 2,5 % y Tetróxido de Osmio 1 % y se incluyeron en resina epóxica (Araldita). Después de la inclusión la pieza se seccionó con un ultramicrotomo Reichert. Las secciones ultra finas se tiñeron con acetato de uranilo y se visualizaron con un microscopio electrónico FEI.

Purificación de lipofucsina

Las células del RPE se separaron de la retina neural y se aislaron mediante tripsinización y se recuperaron bajo un microscopio quirúrgico. Estas se sonicaron por 5 ciclos de 20 seg espaciados por 40 seg de intervalo en amortiguador PBS sumergido en hielo. Los restos celulares se removieron por centrifugación a 60 x g durante 7 min.

El líquido sobrenadante se centrifugó a 6000 x g por 10 minutos para sedimentar los gránulos, el precipitado se resuspendió en sacarosa 0,3 M y se ultracentrifugó en un rotor con “swinging buckets” a 103000 x g por una hora, en un gradiente discontinuo de sacarosa preformado (2, 1,8, 1,6, 1,55, 1,5, 1,4, 1,2 y 1 M) (Figura 17). Los gránulos colectados de la centrifugación se secaron en una “Speed Vac” (concentrador evaporativo) y se pesaron en una microbalanza para determinar su masa total.

Después de pesar los gránulos de lipofucsina la proteína se cuantificó solubilizando 380 µg de lipofucsina (alrededor de 150 µg de proteína lipofucsina) en 30 µl de 1% (w/v) SDS y se cuantificó con el método de Bradford “BCA Protein Assay” (Bio-Rad).

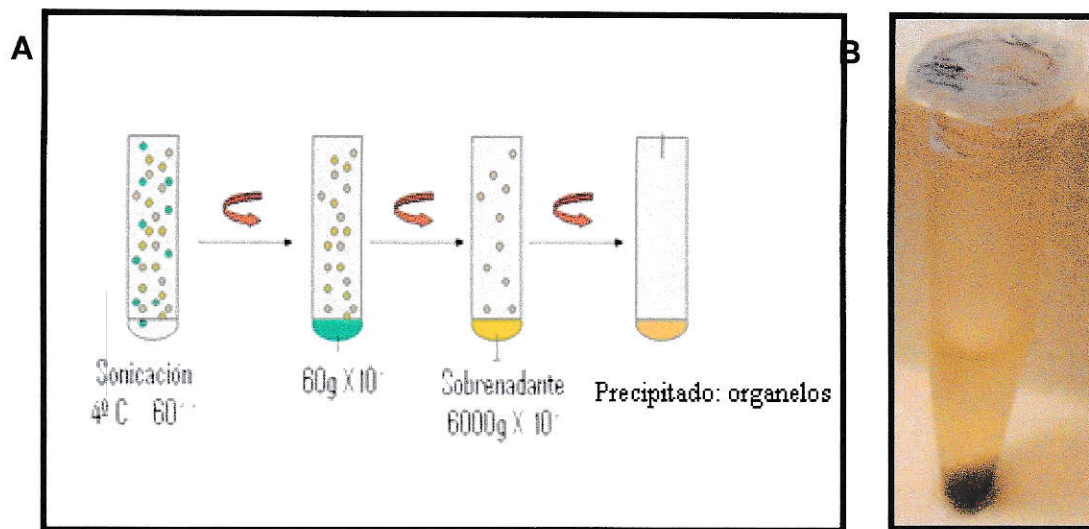


Figura 17: Esquema de purificación de gránulos de lipofucsina de epitelio pigmentario.

A. Después de sonicar las células del RPE se centrifugaron para separar los gránulos intracelulares. B. Precipitado obtenido después de la centrifugación diferencial, sus componentes son separados mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa preformado.

Purificación de Alfa cristalina humana

Alfa cristalina posee dos isoformas cuyos genes comparten un 60 % de identidad, estas dos isoformas no pueden ser separadas en condiciones nativas.

En las siguientes figuras se muestra la secuencia primaria y la masa molecular de ambas Alfa cristalina humanas (Figura 18).

Alfa A:

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
P02489-1 [UniParc]. Last modified October 1, 1996. Version 2. Checksum: 81804A8439837D50	FASTA	173	19,909
<input type="text" value="Blast"/>			

```

      10      20      30      40      50      60
MDVTIQHPWF KRTLGPFYPS RLFDOFFGEG LFEYDLLPFL SSTISPYRQ SLFRTVLDSG

      70      80      90     100     110     120
ISEVRSRDRK FVIFLDVKHF SPEDLTVKVV DDFVEIHGKH NERQDDHGYI SREFHRRYRL

     130     140     150     160     170
PSNVDQSALS CSLSADGMLT FCGPKIQTGL DATHAERAIP VSREEKPTSA PSS
    
```

Alfa B:

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
P02511-1 [UniParc]. Last modified January 1, 1990. Version 2. Checksum: AE08BED46B7849CB	FASTA	175	20,159
<input type="text" value="Blast"/>			

```

      10      20      30      40      50      60
MDIAIHHPWI RRPFFPFHSP SRLFDQFFGE HLLSDLFPT STSLSPFYLR PPSFLRAPSW

      70      80      90     100     110     120
FDTGLSEMRL EKDRFSVMLD VKHFSPEELK VKVLGDVIEV HGKHEERQDE HGFISREFHR

     130     140     150     160     170
KYRIPADVDP LTITSSLSSD GVLTVNGPRK QVSGPERTIP ITREEKPAVT AAPKK
    
```

Figura 18: Secuencia primaria y masa molecular de Alfa A y B cristalina humanas.

El modelo tridimensional parcial de Alfa B cristalina humana se generó recientemente utilizando la técnica de “proteínas truncadas” desde el residuo 68 al 162 (Laganowsky *et al.*) (Figura 19-20).

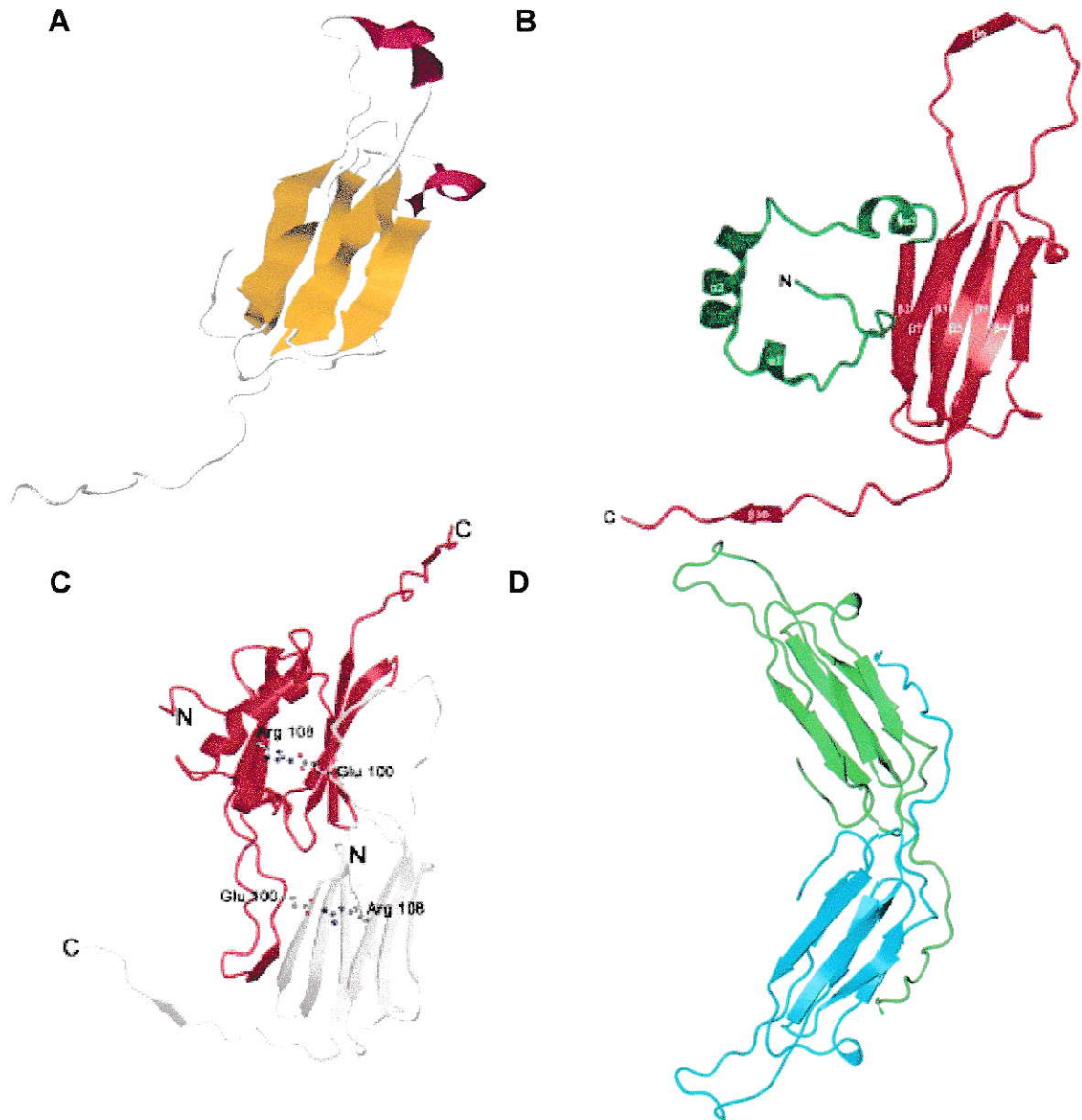


Figura 19. Estructura de de Alfa B cristalina humana y HSP 16,9 de levadura.

A. Estructura 3D de Alfa B cristalina (3L1G) (Laganowsky *et al.*). **B.** Modelo 3D sHSP 16,9 de levadura (Van Montfort (van Montfort *et al.*, 2001). **C** y **D.** Dímero resuelto de ambas estructuras.

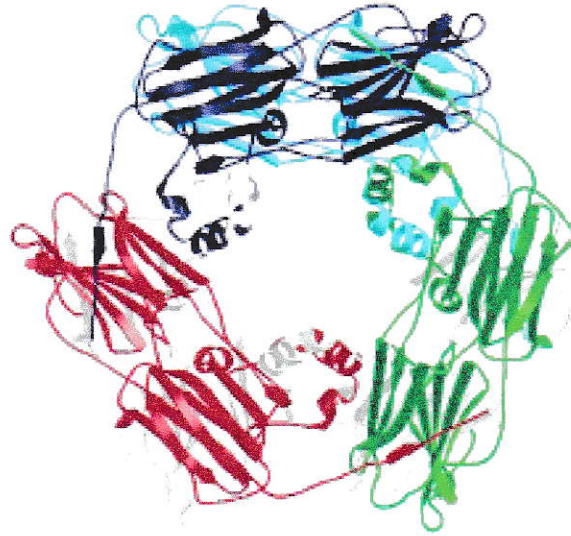


Figura 20. Estructura cuaternaria de sHSP 16,9 de levadura.

Van Montfort R (van Montfort *et al.*, 2001), en el mismo color se representan dímeros como unidades estructurales.

1. Separación de Alfa cristalina por tamaño molecular.

Se realizó una extracción de las fibras del cristalino desde la corteza de cristalinos humanos sometidos a cirugía de catarata senil, no se consideró los cristalinos con catarata congénita, ni asociada a trauma ocular o catarata secundaria. Los fragmentos de cristalino se separaron en su porción cortical descartándose el núcleo del cristalino, se sonicó con un sonicador Virtis, en

PBS. Se centrifugó a 15000 x g por 15 minutos a 4° C y se eliminó el precipitado y se filtró el sobrenadante en un filtro de 0,2 µm. Se dializó toda la noche a 4° C con una membrana de diálisis con poro de 25.000 D en PBS. El PBS recuperado se analizó por electroforesis SDS-PAGE y se identificó la Alfa cristalina mediante inmuno detección “western blot”.

2. Separación por intercambio aniónico.

Después de la homogenización del tejido, se centrifugó a 7000 x g por 20 min, se descarto el precipitado y se eluyó el sobrenadante en una columna de Q sefarosa “high performance” (Amersham Bioscience), equilibrada con buffer TE (50 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 7,5).

Alfa cristalina se encuentra en los cristalinos de mamíferos en una relación de 3 Alfa A cristalina por 1 Alfa B cristalina, según los estudios publicado por Joseph Horwitz (Buchner *et al.*, 2005)

El punto isoeléctrico (PI) de Alfa A cristalina es de 5,77 y el de Alfa B cristalina de 6,76. Por lo que teóricamente se considera un PI de 6,02 para Alfa cristalina de cristalino humano.

La elusión se realizó utilizando una gradiente de NaCl para liberar la proteína retenida en la columna, la que se identificó mediante western blot del resultado de la electroforesis SDS-PAGE de los picos obtenidos en los cromatogramas de purificación.

La fracción del cromatograma que contenía la Alfa cristalina fue dializada contra PBS pH 7,5 y se almacenó a - 80 °C en glicerol al 5%. Para determinar la concentración de la proteína purificada se midió la absorbancia a 280 nm, se utilizó el método de Bradford y Qubit (Invitrogen).

Desnaturación de Alfa cristalina.

Espectroscopia: dispersión de luz, dicroísmo circular y fluorescencia.

1. Dispersión de luz.

Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B para determinar la dispersión de luz asociada a la formación oligómeros. Para las mediciones se usó una longitud de onda de excitación de 350 nm y atenuadores de 1%. La concentración de proteína varió entre 0,3 mg/ml (0,015 mM) hasta 5 mg/ml (0,25 mM). Se utilizó cubetas de cuarzo de 500 µl para las mediciones.

2. Dicroísmo circular (DC).

Se usó como agentes desnaturantes cloruro de guanidinio (GdmCl) y urea. En los experimentos de desnaturación, la proteína fue incubada por una hora en hielo a una concentración final de 0,3 mg/ml en distintas soluciones de PBS pH 7,5 con concentraciones de GdmCl que iban desde 0 hasta 6 M y de urea en concentraciones entre 0 M hasta 7 M. Las muestras provenientes de la

desnaturación se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, y se midió en un espectro polarímetro JASCO J-600. Se hicieron tres barridos por muestra en el UV-lejano (190 nm hasta 260 nm) a una velocidad de 20 nm/min, con una sensibilidad de 20 mdeg (milésimas de grado). Los espectros de las proteínas nativas se obtuvieron a partir de la medición de las soluciones que poseían 0 M de GdmCl y de urea. Para la curva de desnaturalación se graficó la elipticidad a una longitud de onda de 220 nm en cada espectro en función de la concentración de agente desnaturalante.

3. Fluorescencia.

Las muestras de proteínas desnaturaladas se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente previa a las mediciones. Para medir se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50. En cada medición se usó una longitud de onda de excitación de 295 nm, y para los espectros de emisión se hizo tres barridos desde 260 nm hasta 600 nm, También se determinó la misma fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 488 nm y se realizó tres barridos desde 450 nm hasta 900 nm. Se utilizó generalmente un ancho de banda de excitación y emisión de 5,0 nm y una velocidad de barrido de 140 nm/min. Los espectros de la proteína se registraron en soluciones de PBS pH 7,5.

4. Curva de desnaturación de Alfa cristalina.

La curva de desnaturación, se hizo a partir de los datos de intensidad de fluorescencia o elipticidad (DC) de cada muestra a la longitud de onda correspondiente en función de la concentración de agente desnaturante. El cálculo de la diferencia de energía libre de desplegamiento se hizo de acuerdo al método de extrapolación lineal (Santoro *et al.*, 1988), mediante la expresión de la intensidad de fluorescencia o elipticidad en función del agente desnaturante ($f(x)$).

$$f(x) = (F_N(x) + F_D(x) \cdot \exp(-(\Delta G^\circ_{0[M],D-N} + M \cdot x)/RT)) / (1 + \exp(-(\Delta G^\circ_{0[M],D-N} + M \cdot x)/RT))$$

donde $\Delta G^\circ(x)_{D-N} = -RT \cdot \ln K_{eq} = -RT \cdot \ln [(F_N(x) - F)/(F - F_D(x))]$

$$\Delta G^\circ(x)_{D-N} = \Delta G^\circ_{0[M],D-N} + m_G \cdot [x] \quad \text{y} \quad [x] = [\text{agente desnaturante}]$$

Electroforesis de proteína en SDS-PAGE y western blot.

1. Electroforesis en SDS-PAGE.

La electroforesis de proteínas se hizo en una cámara XCell Sure-Lock de Invitrogen que en el depósito superior (cátodo) tenía un amortiguador 1

(concentrador: Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8) y en el depósito inferior (ánodo) amortiguador 2 (Separador: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8) el gel poseía en ambos depósitos acrilamida en porcentajes diferentes, en la parte superior el gel concentrador 4 % y abajo el separador 12 %.

Las muestras se suspendieron en amortiguador de muestra (1X: Tris-HCl 62, 5 mM, pH 6,8 - SDS 2 % - Glicerol 10 % beta mercaptoetanol 5 % - Azul de bromo fenol 0, 01%) y se calentaron por 15 min a 85 °C. Una vez cargadas las muestras a los pocillos, se corrieron en amortiguador de corrida (Tris-HCl 25 mM - glicina 192 mM - SDS 0, 1% a 120 V hasta la caída del frente de corrida. El gel se tiñó con azul de Coomassie (0,25 g de azul de Coomassie brillante en una solución de 90 % de metanol : agua (1:1 v/v) y 10 % de ácido acético) durante media hora con agitación y se destiñó con la solución de desteñido (45 % de metanol y 10 % de ácido acético).

2. Western blot con anticuerpo anti Alfa B cristalina.

Las proteínas separadas en los geles SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en un accesorio para inmuno detección ("western blot") a 4 ° C (Invitrogen), toda la noche a 20 V. Después de bloquear la membrana de nitrocelulosa con caseína al 12%, se incubó con anticuerpo primario monoclonal anti Alfa B cristalina humana (StressGen: también presenta actividad contra Alfa A cristalina) por 1 h. El anticuerpo secundario se agregó en el kit Vectastain ABC-AmP (Vector Laboratories) que produce quimioluminiscencia y fluorescencia al usar el sustrato Duolux (Vector Laboratories).

Gradientes discontinuos de sacarosa.

Los estados de agregación de la proteína Alfa cristalina, se resolvieron en gradientes discontinuos de sacarosa y la relación entre la emisión de fluorescencia y su estado de agregación, se analizó en cada fracción en presencia de diferentes concentraciones de GdmCl. Los gradientes discontinuos de sacarosa (0,3 - 2,0 M) se prepararon en tubos de ultracentrifugación con concentraciones crecientes del agente desnaturalante (GdmCl desde 0 M a 6 M). En la figura 21 se muestran los índices de refracción para la concentración de sacarosa a diferentes concentraciones de GdmCl. Las fracciones del gradiente se analizaron en un equipo mediante "dot blot" (Bio-Dot® SF aparato de micro filtración de Bio-Rad).

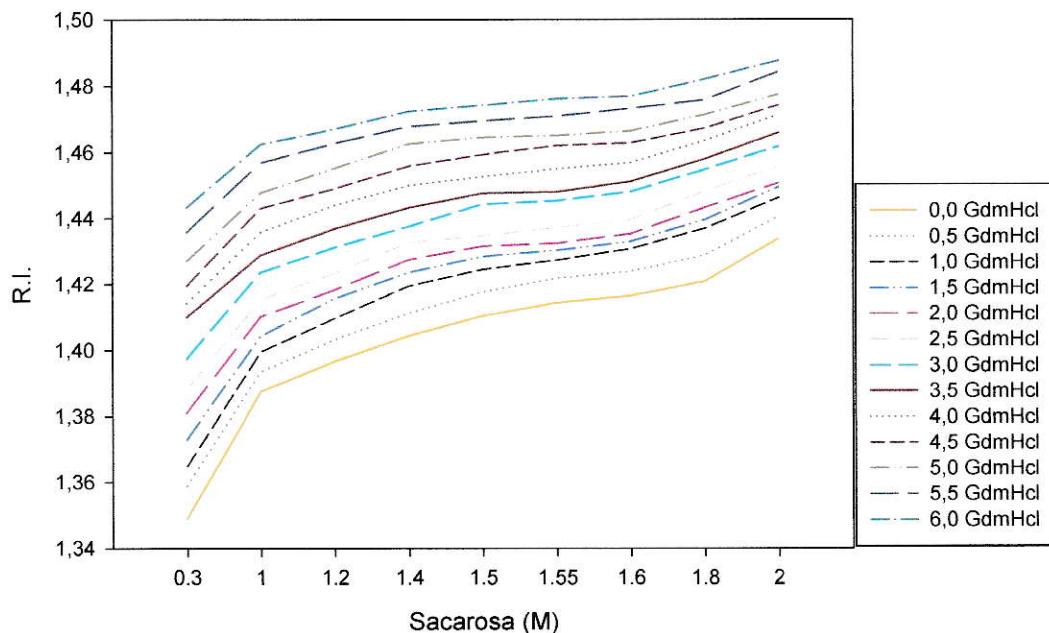


Figura 21: Índices de refracción de las fracciones de los gradientes de sacarosa en GdmCl.

Inmuno blot.

Para mostrar la presencia de la proteína se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti Alfa B cristalina (Stressgen). Se utilizó un anticuerpo secundario monoclonal de ratón del kit Vectastain-ABC-AmP (Vector Labs). La intensidad de fluorescencia de las muestras se analizó mediante el programa "Image J" usando el subprograma "Dot Blot Analyzer". Los puntos analizados se corrigieron de acuerdo a su fondo y se ajustaron según la intensidad máxima del "inmuno dot blot".

Los resultados se graficaron como el porcentaje de fluorescencia máxima de cada fracción del gradiente de sacarosa, en concentraciones crecientes del agente desnaturalante.

Microscopía electrónica de Alfa cristalina.

Microscopía electrónica de transmisión.

Los polímeros de Alfa cristalina, se revelaron con tinción negativa de las proteínas adheridas a las grillas. Con este propósito 50 μ l de la muestra se colocaron sobre una grilla (cubierta con formvar y tratada con carbón) durante 20 s. Una vez adherida la muestra a la grilla, se lavó 4 veces y se tiñó durante 2 min con una solución de acetato de uranilo al 1,5 %. Una vez preparadas se analizó en microscopio electrónico de transmisión Jeol a 120000 aumentos.

Inmunomicroscopía electrónica de Alfa cristalina en lipofucsina humana.

La lipofucsina obtenida por ultracentrifugación se fijó en formaldehído al 2,5 % y se incluyó en resina acrílica. Después de la inclusión la pieza se seccionó con un ultramicrotomo. Las secciones ultra finas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti Alfa cristalina (StressGen) y se visualizó por anticuerpo secundario conjugado con oro de 20 nm y se visualizaron con un microscopio electrónico Tecnai.

Espectrometría de masas de Alfa cristalina y lipofucsina.

Preparación de muestras:

A partir de muestras de proteínas separadas mediante SDS - PAGE se obtuvo diversas bandas de proteínas. Las bandas de interés se cortaron del gel eliminando al máximo el exceso de poliacrilamida. Las bandas se lavaron tres veces con agua nanopura durante 15 min a temperatura ambiente, luego se removió el azul de Coomassie con bicarbonato de amonio 200 mM preparado en acetonitrilo 50 % v/v durante 30 min a 37° C. A continuación las bandas se incubaron con ditiotreitól 10 mM preparado en bicarbonato de amonio 200 mM durante 30 min a 37°C. Luego se alquilaron con yodoacetamida 55 mM preparada en bicarbonato de amonio 200 mM durante 30 min a 37°C (en

oscuridad). Las bandas se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se colocaron en hielo. Se agregó tampón de proteólisis bicarbonato de amonio 50 mM/acetonitrilo 10% v/v que contenía 0.3 µg/µL de tripsina (Promega Corp., WI-USA) y se incubó en hielo durante 45 min. Luego, se adicionó tampón de proteólisis (sin tripsina) de modo de sumergir completamente la banda y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se recuperó el sobrenadante, se realizaron dos extracciones con acetonitrilo 60% v/v/ácido fórmico 0.1% v/v y una extracción con acetonitrilo. Se combinaron el sobrenadante y las extracciones y se llevaron a sequedad en SpeedVac a temperatura ambiente. Las muestras concentradas se re suspendieron en 15 µL de ácido fórmico 0.1% v/v y metanol 3% v/v.

Obtención de espectros.

Para la obtención de espectros se mezcló cada muestra con la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA; preparado a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0.1% v/v 1:1. Esta matriz se utiliza de preferencia para péptidos y/o proteínas de masa molecular menor a 10.000 Da) y se depositó 2 µL de cada mezcla en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 1.000-3.000 Da (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Los espectros finales corresponden a la suma de 15 barridos de 30 disparos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra.

Análisis de espectros e identificación de proteínas.

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa flexAnalysis versión 2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la detección de las señales m/z mono isotópicas se utilizó el algoritmo SNAP (sophisticated numerical annotation procedure). Una vez generadas las listas de señales m/z mono isotópicas se realizó una calibración interna utilizando las señales producto de auto proteólisis de la tripsina, las que se removieron de las listas y las señales restantes se exportaron a Excel. Adicionalmente, las listas de masas de cada muestra se examinaron por medio del programa Peak Erazor versión 2.0.1 (Lighthouse data, Odense, Dinamarca) en búsqueda de señales provenientes

de la contaminación de las muestras con queratina las que también se removieron de las listas.

Para la identificación de las muestras y su corroboración se utilizaron dos bases de datos:

- Mascot
(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)
- MS-Fit
(<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>)

Para la identificación se utilizaron las listas procesadas de señales m/z (intervalo m/z 600-4000). Se consideraron las siguientes restricciones: enzima de proteólisis, tripsina; pérdida de cortes, 1; modificación fija, carbamidometilación (alquilación con yodoacetamida); modificación variable, oxidación de metionina; masa, mono isotópica; tolerancia de masa, 0.1-0.5 Da. Se realizaron búsquedas acotando taxonomía a *Homo sapiens*.

D. Resultados.

Capítulo I. Microscopía del Epitelio pigmentario retinal.

I.1. Fluorescencia de epitelio pigmentario retinal.

El origen de la autofluorescencia del epitelio pigmentario retinal (RPE) proviene de los gránulos de lipofucsina del RPE (Delori *et al.*, 1995), se desarrolló una estrategia de preparados histológicos de tejido retinal de individuos de distintas edades. Para demostrar la presencia de autofluorescencia en los gránulos al interior del RPE.

Microscopía de epitelio pigmentario retinal humano.

Microscopía de campo claro.

Se prepararon cortes histológicos de globos oculares con nivel de sección en la porción posterior del globo ocular, para visualizar el RPE. Como se explica en la ilustración 1.

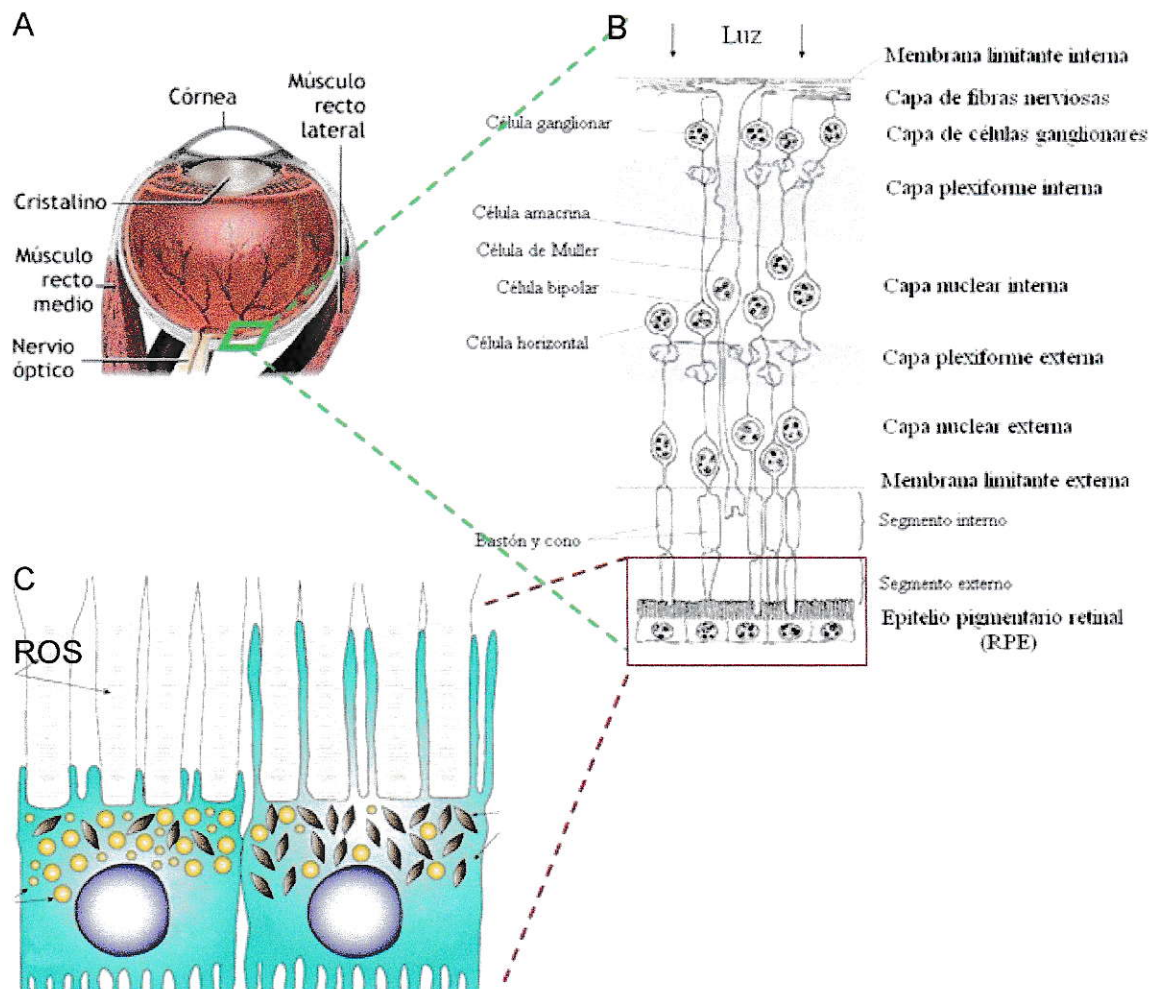


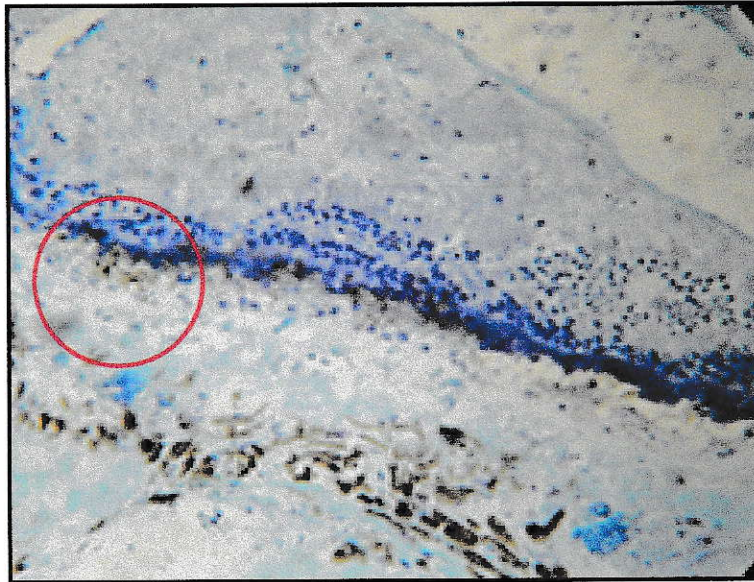
Ilustración 1. Ubicación anatómica de los cortes histológicos del ojo utilizados para estudio de microscopía.

A: globo ocular completo, B: retina y C: segmentos externos de fotorreceptores y epitelio pigmentario retinal.

Los cortes se tiñeron con azul de toluidina (tinción azul) para visualizar mejor los núcleos celulares. En la Figura 22 se observa en detalle el RPE humano y los segmentos externos de los fotorreceptores, en el panel B se aprecia una imagen cercana al núcleo compatible con gránulos de escasa pigmentación

asociados a gránulos pigmentarios que progresan en número hasta los segmentos externos de los fotorreceptores que se observan en la Figura 23.

A



B

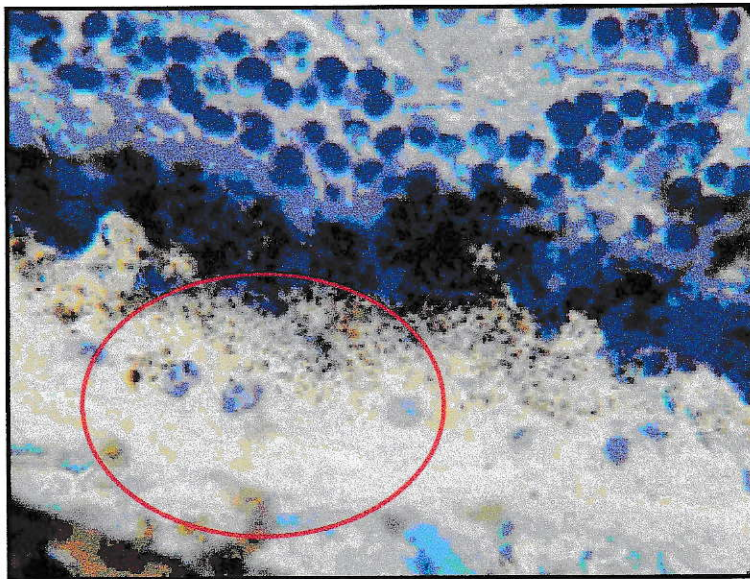


Figura 22. Microscopía de campo claro de retina y RPE humano de 40 años.

Panel A. Retina (600 x) y RPE, B. Epitelio pigmentario retinal y gránulos de epitelio pigmentario, en círculo rojo se aprecian núcleos celulares y gránulos de RPE (1000 x).

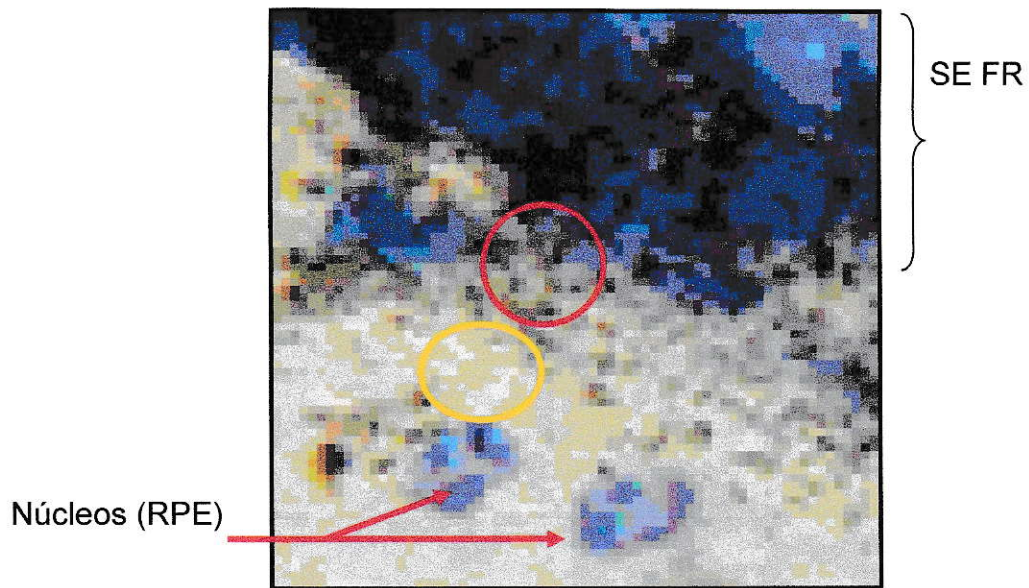


Figura 23. Magnificación digital de la microscopía de campo claro de retina y RPE humano de 40 años.

Flecha roja muestra núcleos celulares de RPE, segmentos externos de fotorreceptores (SE FR), en círculo rojo se aprecian gránulos de pigmento de RPE y en círculo amarillo gránulos compatibles con lipofuscina.

Para evaluar si los gránulos del RPE eran capaces de generar autofluorescencia, se hizo un análisis microscópico mediante epifluorescencia y microscopía confocal.

Microscopía de epifluorescencia.

El tejido que se muestra en la Figura 18 A se observó en un microscopio de epifluorescencia usando una fuente de excitación de 360-380 nm (Figura 20). La señal de fluorescencia proveniente del epitelio pigmentario se destaca en una escala de grises (Figura 24).

**Emisión
de autofluorescencia**



Figura 24. Fotografía de epifluorescencia de retina humana y RPE de ojo de un individuo de 42 años.

Epifluorescencia con excitación a 360-380 nm, con un aumento de 600 X.

Para corroborar que la señal de fluorescencia aumenta en relación a la edad (Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2009) y considerando que la retina está permanentemente expuesta a oxidación por fotones de alta energía

(fotooxidación) y oxidación química por los procesos oxidativos celulares como la oxidación mitocondrial (química). Se consideró a la edad del tejido examinado como factor de oxidación del globo ocular.

El factor de la edad del tejido es una variable comúnmente utilizada en estudios de autofluorescencia del RPE considerando que no es posible aplicar experimentalmente otras fuentes de oxidación en individuos humanos. Aun cuando existen diferencias entre las muestras examinadas, se realizó una observación del RPE de la retina central de los ojos estudiados para estandarizar las muestras.

En las siguientes figuras se demuestra que el origen de la autofluorescencia del RPE proviene de los gránulos del citoplasma celular y se discriminan dentro de la población de gránulos algunos autofluorescentes, otros de coloración oscura que no fluorescen y una diversa distribución de tamaños entre ellos.

En la figura 25 A se aprecia el RPE de un individuo de 72 años bajo microscopía de campo claro donde el material perinuclear granular no pigmentado es distinto al encontrado hacia el ápice de la célula que está cargado de gránulos con pigmento (gránulos más oscuros). En la figura 25 B se observa una señal de emisión sobre 400 nm al aplicar epifluorescencia con excitación ultravioleta a 360-380 nm. Esta señal es intensa y proviene del área perinuclear de las células del RPE.

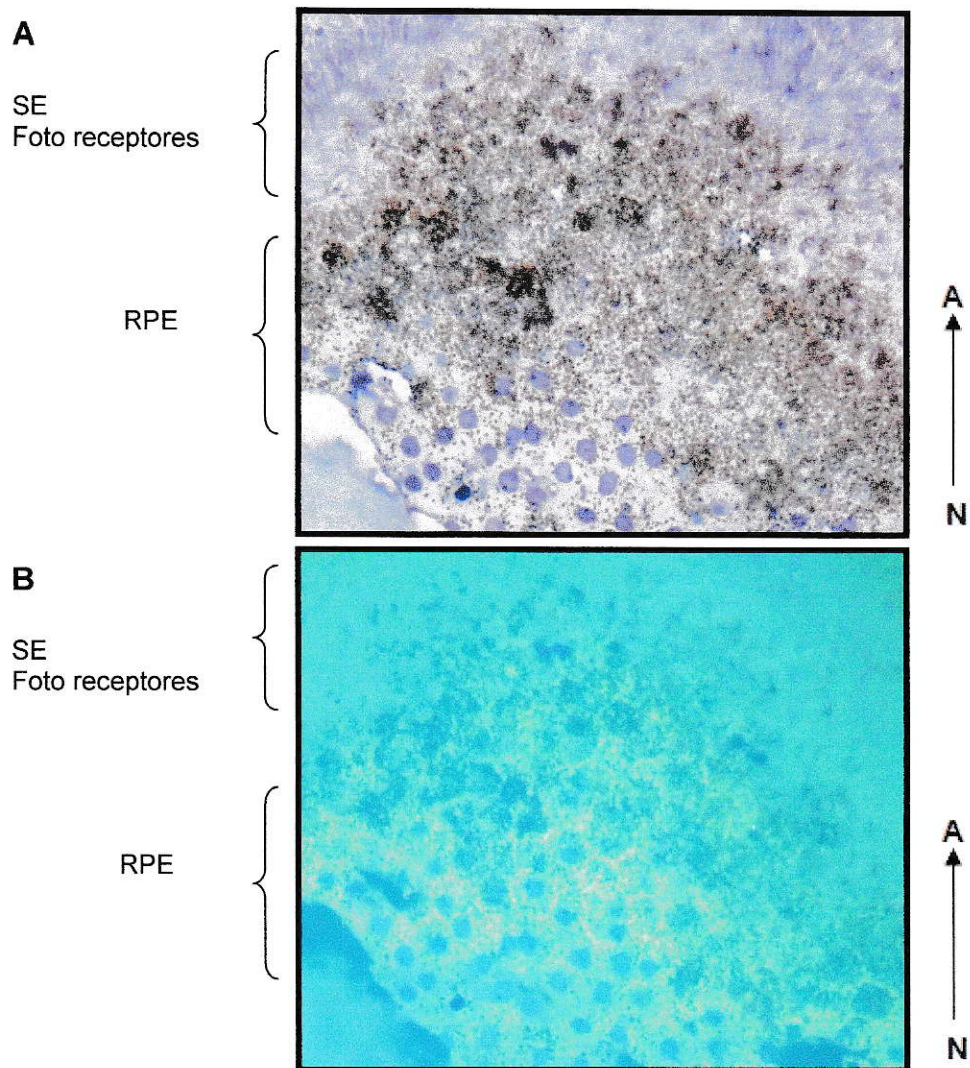


Figura 25. Retina humana y gránulos de epitelio pigmentario humano en un individuo de 72 años de vida.

A. Microscopía de campo claro. B. Epifluorescencia con excitación a 360-380 nm, ambas con un aumento de 1000 X. SE (segmentos externos de fotorreceptores). A: ápice celular de RPE, N: núcleo celular de RPE. Tinción de hematoxilina eosina.

En la figura 26 se muestra la emisión de autofluorescencia de los gránulos perinucleares al excitar a 488 nm. Al resaltar digitalmente el color del material perinuclear se define el origen de la señal de autofluorescencia (Figura 26 B), sobre éstos gránulos se muestran gránulos de pigmento no fluorescentes que se mezclan con los segmento externos de los fotorreceptores presentes hacia el ápice de la célula.

En las figuras analizadas destaca que la señal de autofluorescencia parece ser más intensa en la medida que el tejido examinado tiene mayor edad, lo que tiene una contraparte fisiológica considerando la actividad fagocítica del RPE sobre los segmentos externos de los fotorreceptores. Esta fagocitosis y posterior degradación es llevada a cabo en el interior de las vesículas lisosomales del RPE durante toda la vida del RPE.

En las vesículas lisosomales se encuentran enzimas proteolíticas que degradan el material fagocitado desde los fotorreceptores. Este proceso continuo de degradación intracelular y reciclado de vesículas, está afectado por el proceso de oxidación presente durante el envejecimiento, lo que aparentemente genera un almacenamiento de material incompletamente degradado al interior de las vesículas lisosomales que reciben el nombre de lipofuscinas cuando éstas autofluorescen al ser estimuladas con luz azul.

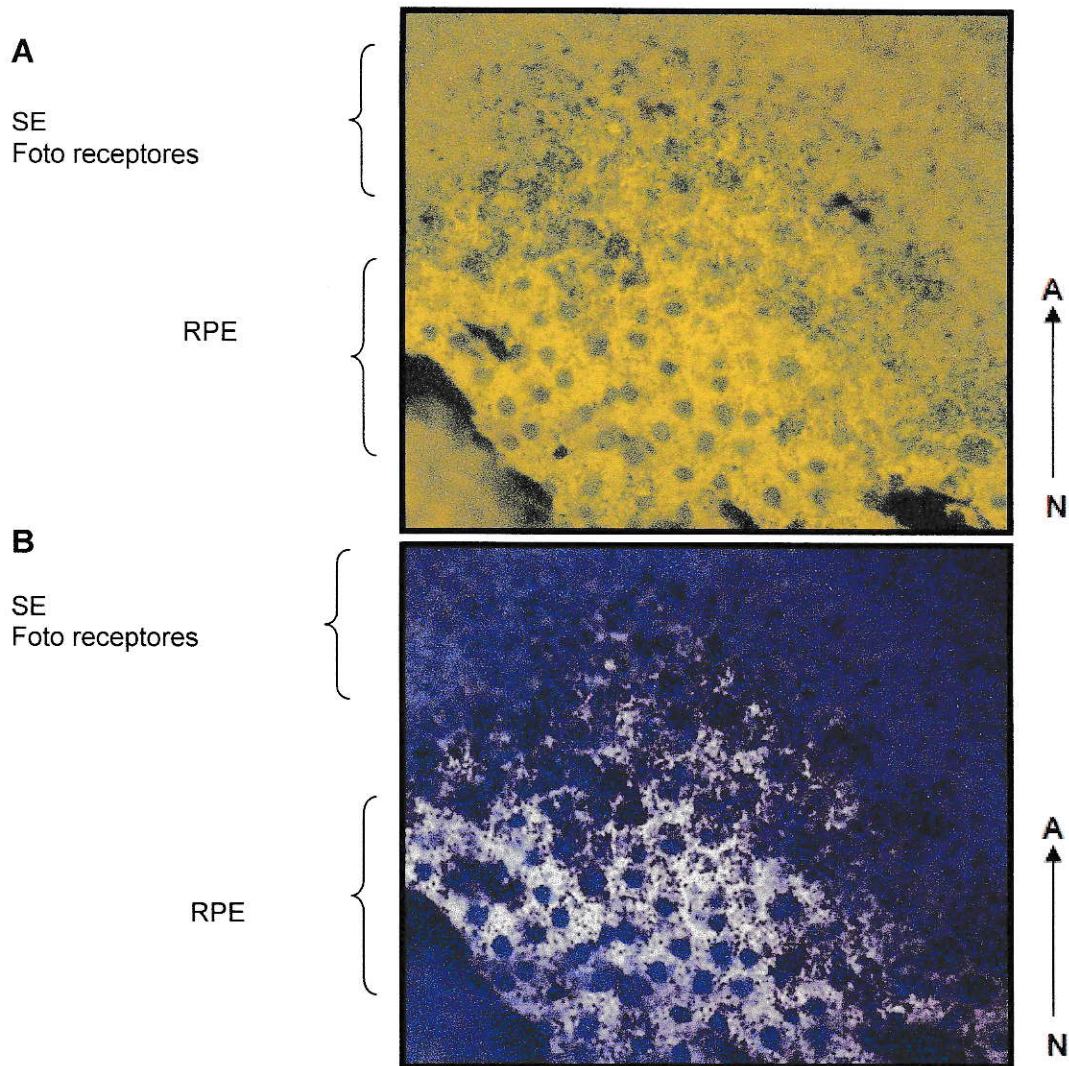


Figura 26. Retina humana y gránulos de epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años de vida.

A. Evaluado por epifluorescencia con excitación a 470-490 nm. B. Contraste de material perinuclear de RPE en imagen de color falso. Ambas imágenes en aumento de 1000 x. SE (segmentos externos de fotorreceptores). A: ápice celular de RPE, N: núcleo celular de RPE. Tinción de hematoxilina eosina.

En la magnificación digital de la muestra se observa la presencia de dos poblaciones granulares definidas, unas fluorescentes y otras de coloración oscura no fluorescentes, estas características se mantienen tanto con excitación en el rango del ultravioleta como en el rango del azul (Figura 27).

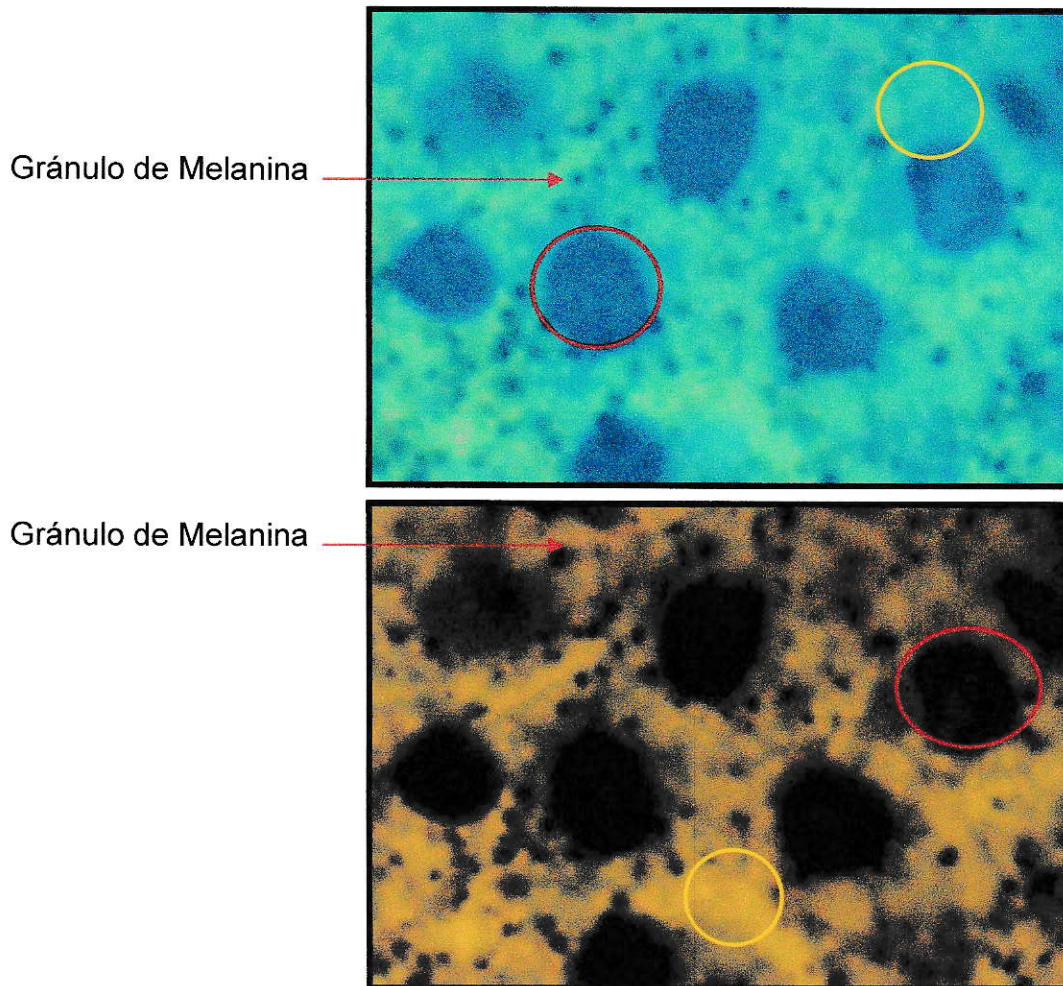


Figura 27. A. Magnificación digital de RPE y gránulos de epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años de vida.

A. Evaluado por epifluorescencia con excitación a 360-380 nm. B la misma imagen del panel A con excitación a 470-490 nm. Ambas imágenes con un aumento de 1000 X.

Círculos rojos corresponden a núcleos celulares del RPE, círculos amarillos muestran áreas de gránulos autofluorescentes (lipofucsina).

Los gránulos autofluorescentes encontrados al interior del RPE corresponden a cuerpos de almacenaje lisosomal descritos para el RPE y otros tejidos que son característicos de envejecimiento celular (lipofucsinas (Terman *et al.*, 2004)).

Para evaluar la ubicación de los gránulos autofluorescentes presentes dentro del RPE se utilizó microscopia confocal con una fuente de excitación de luz azul (488 nm).

Microscopía confocal.

En estas imágenes se observan con mejor detalle las características encontradas en las figuras obtenidas con las técnicas anteriores, un espacio perinuclear con granos autofluorescentes asociados a gránulos oscuros en concentración creciente hasta alcanzar el límite superior de la célula (Figura 28).

En la imagen de la figura 28 se observa, un espacio perinuclear con pocos gránulos de lipofucsina autofluorescentes en la base nuclear (Figura 28 A), que al ascender en altura del plano confocal se asocian a gránulos de melanina (oscuros) en concentración creciente hasta alcanzar el límite superior de la célula (Figura 28 D).

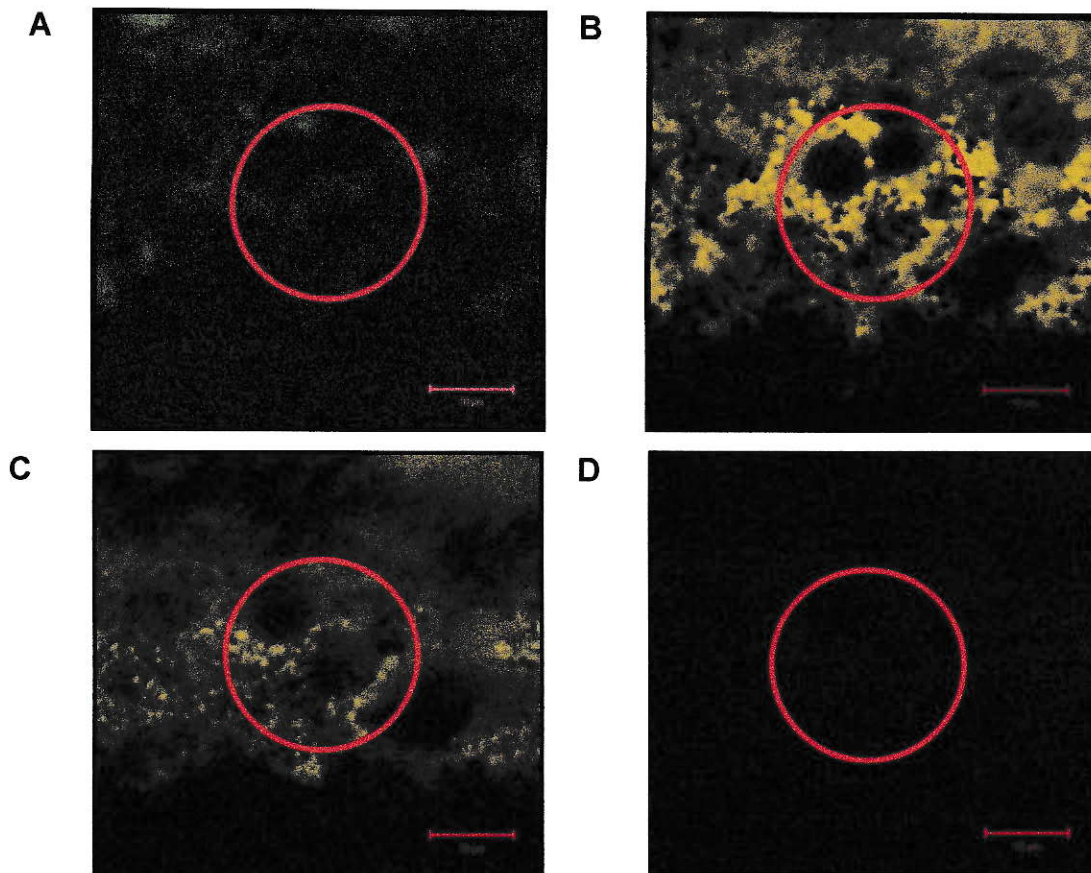


Figura 28. Fotografías confocales de fluorescencia de epitelio pigmentario humano de un individuo de 40 años.

Excitación a 488 nm desde el plano inferior en A hasta un plano superior en D. El círculo en rojo señala la ubicación de lipofuscina perinuclear y como aumenta la señal granular fluorescente al aumentar la altura del plano confocal (distancia de planos $0,49 \mu\text{m}$, la barra roja corresponde a $10 \mu\text{m}$).

En la Figura 29 se observa el RPE de un individuo de 72 años que muestra un aumento en la densidad de los gránulos de lipofuscina, al compararse con los resultados observados en la Figura 28, para un individuo de 40 años.

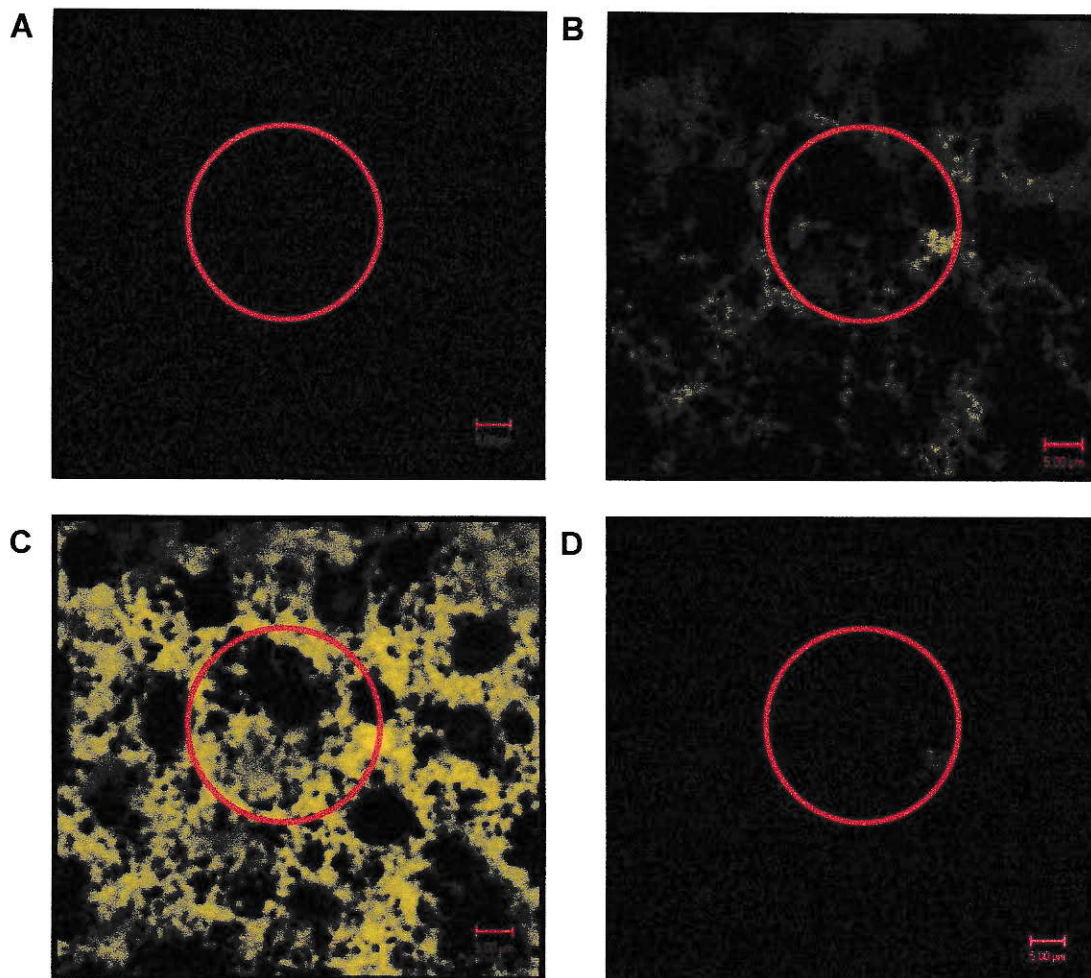


Figura 29. Fotografías confocales de fluorescencia de epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años.

Excitación a 488 nm desde un plano inferior en A hasta un plano superior en D. El círculo en rojo señala la ubicación de lipofucsina perinuclear y como aumenta la señal granular fluorescente al aumentar la altura del plano confocal (distancia de planos 0,98 μm , la barra roja señala 5 μm).

Es interesante destacar la altura del plano confocal que es el doble para la muestra de un individuo de 72 años respecto al de 40 años. Esto indica que el volumen celular ha aumentado casi al doble al aumentar la cantidad de lipofucsina.

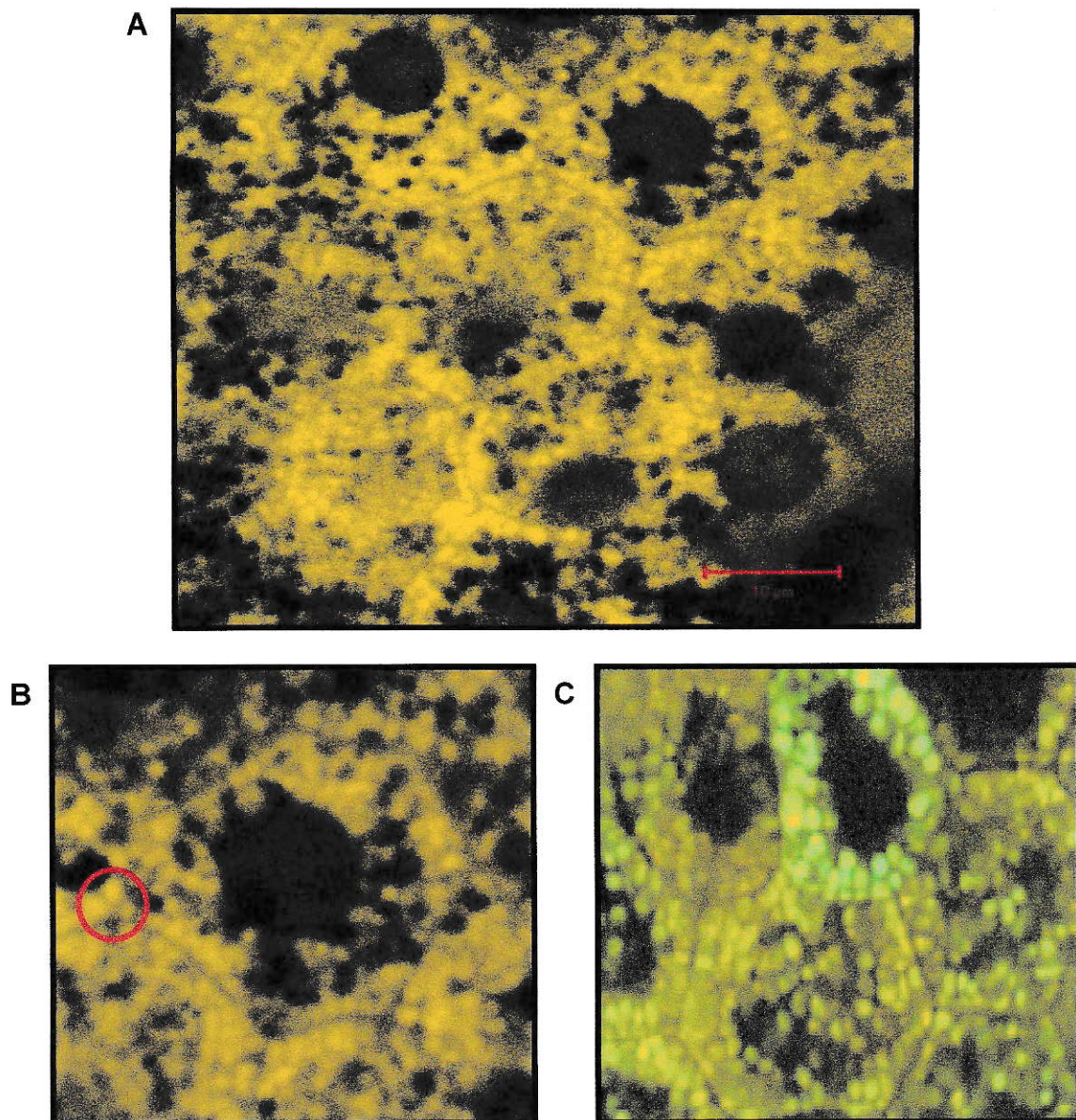


Figura 30. Fotografía de microscopía confocal de la fluorescencia de epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años.

A. Excitación a 488 nm. B. Magnificación digital de A. C. Magnificación digital de RPE de un individuo de 80 años en microscopio confocal de doble fotón 800 nm (equivale a 400 nm en microscopio confocal convencional, "Max Planck Institute", Heidelberg, Alemania). Círculo en rojo señala gránulo de lipofucsina de casi 2 μm).

En la figura 30 se observa una sección del RPE, que se aumentó digitalmente para observar los gránulos de hasta 2 μm (Figura 30 B). Al comparar esta figura con los obtenidos en un microscopio confocal de doble fotón, con una excitación a 800 nm se observa una mejor resolución que permite observar con nitidez la estructura de los gránulos de lipofucsina (Figura 30 C).

Los resultados en su conjunto muestran que el tamaño de los gránulos fluorescentes son variable dependiendo de la edad de las muestras de los individuos examinados, asimismo la señal de fluorescencia en un microscopio confocal convencional, no permite precisar exactamente los límites de los gránulos del RPE, situación que consecuentemente mejora al utilizar el sistema láser de excitación de doble fotón (Han *et al.*, 2007).

Por tal motivo el tamaño granular promedio dependiente de la edad es controversial, debido al error que obtendríamos de acuerdo a lo observado en las muestras evaluadas. Es posible explicar las diferencias entre los dos sistemas confocales a través del valor de "point spread function" (PSF) que de acuerdo a la longitud de onda y fuente de excitación láser utilizado es diferente para cada sistema de microscopía confocal.

Con la finalidad de definir la ultraestructura del RPE humano y describir con más detalle la morfología y distribución de los componentes encontrados en su interior, se utilizó microscopía electrónica.

Microscopía electrónica.

En la Figura 31 A se observa la ultraestructura del RPE y de los segmentos externos de los fotorreceptores, alrededor del núcleo se aprecian gránulos pigmentados (melanosomas) estos gránulos se diferencian al ser alargados en un eje y circulares en el eje perpendicular a este, asimismo presentan una tinción más intensa que los elementos adyacentes al interior de la célula cuando son contrastados con metales pesados. Estos se agrupan hacia la superficie celular en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores.

En el espacio alrededor del núcleo celular (como se destaca en círculo rojo en la Figura 31 A, B y C) se muestran gránulos más pequeños y redondos que corresponden a lipofucsina del RPE. Al comparar los resultados de microscopía electrónica con los resultados de epifluorescencia (Figura 31 B y C: magnificación digital de Figura 25 A y 26 B, respectivamente), se observa una concordancia entre ambas imágenes en donde los gránulos de lipofucsina se observan alrededor del núcleo y en la medida que se acerca hacia los segmentos externos de los foto receptores se apaga la señal de fluorescencia (Figura 31 círculos amarillos) y aparecen los melanocitos del RPE (Figura 31 círculos verdes).

Estos resultados muestran la concordancia entre las muestras analizadas mediante microscopía de campo claro, confocal y la arquitectura celular del RPE de acuerdo a la microscopía electrónica (Figura 31).

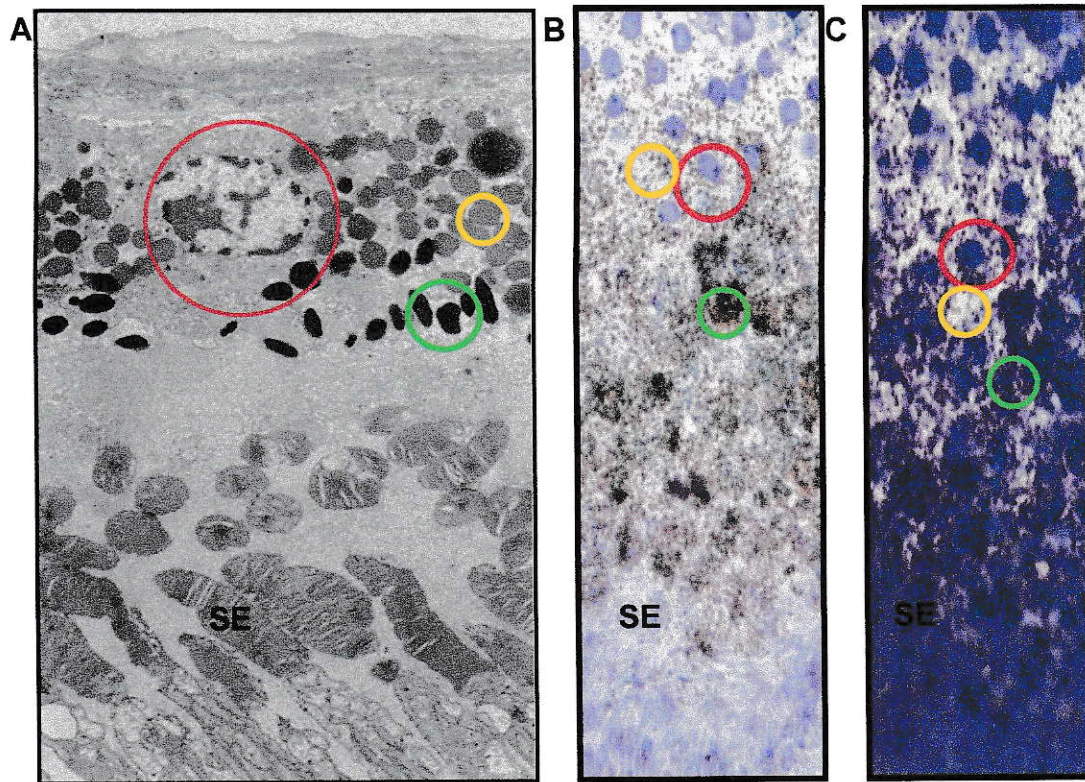


Figura 31. Ultraestructura de la retina y de los gránulos de epitelio pigmentario humano.

A. Microscopía electrónica de la retina humana y gránulos del epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años. B. Microscopía de campo claro que corresponde a una magnificación digital de la figura 25 A. C. Magnificación digital de Imagen en colores falsos de microscopía de epifluorescencia de la figura 26 B, al excitar a 488 nm. Círculo rojo, espacio perinuclear; círculo verde, melanosoma; círculo amarillo, lipofucsina; SE, Segmentos externos de fotorreceptores.

I.2. Microscopía de una línea celular de epitelio pigmentario retinal humano.

La línea celular ARPE-19 es una línea celular diploide de RPE humano ARPE-19 (Dunn *et al.*, 1996), que proviene de un cultivo primario obtenido de un dador masculino de 19 años. Las células se crecieron en tubos de cultivo Falcon de plástico, que contenían medio de cultivo F10 de HAM suplementado con 20 % suero fetal bovino, 0,4 % de glucosa y antibióticos (penicilina (150 µg/ml), estreptomycin (0,375 µg/ml) y anfotericina (0,012% en solución salina), mantenidos a 37° C en un incubador suplementado con CO₂ (95% aire/5% CO₂). Éstas se suplementaron con segmentos externos de fotorreceptores (SE). Este punto es crucial dado que según la literatura sólo es posible generar gránulos auto fluorescentes en ARPE-19 si ésta es suplementada con los SE de las retinas de porcino o vacuno. Se postula que los SE contienen la molécula de retinal fotooxidada en su interior, junto a rodopsina entre otras proteínas que son fagocitadas e incorporadas a endosomas de las células del RPE. De acuerdo a esto, la acumulación de metabolitos de retinal oxidado (como A2E) en ARPE-19 y RPE serían responsables de la autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina.

Para demostrar la hipótesis que las células de ARPE-19 generan gránulos autofluorescentes a partir del SE, se analizó por microscopia de las células de ARPE-19 mantenidas en cultivo por más de un año en ausencia de SE. En cuyo

caso, si la hipótesis es correcta, no deberá observarse fluorescencia en las preparaciones.

Microscopía de campo claro.

Como se observa en la Figura 32 A, las células crecen de manera epitelial derivados de un clon central y se expanden en la superficie de cultivo. A medida que crecen y alcanzan una mayor superficie logran pigmentarse alrededor del día 90 de cultivo. Estas muestras se analizan sin utilizar agente fijador ni tinción. En las figuras 32 B y C se observan aumentos del mismo cultivo donde se aprecian en detalle la presencia de gránulos pigmentados que son característicos de este tipo de células.

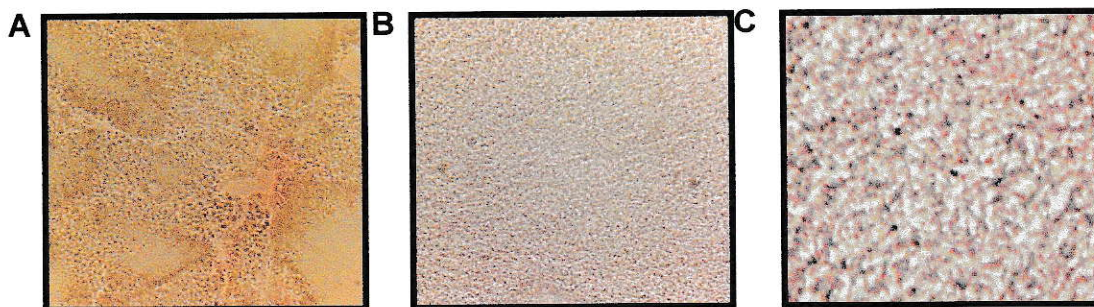


Figura 32. Microscopía de campo claro de células ARPE-19 de un año de crecimiento en cultivo celular crecidas en ausencia de SE.

Magnificaciones de cada panel: A 200 x, B 600 x y C 1000 x.

Para mostrar el efecto del crecimiento sobre la superficie de cultivo a partir de un clon central, se utilizó contraste de fase, como se muestra en la Figura 33.

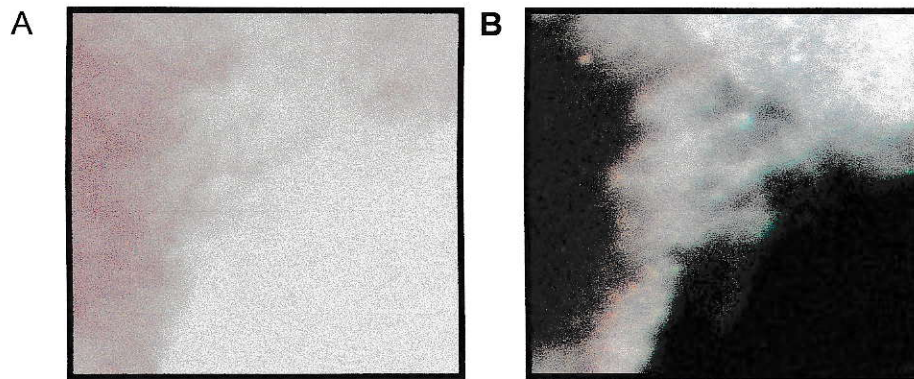


Figura 33. Microscopía de campo claro y contraste de fase de un cultivo de ARPE-19 de 6 meses de cultivo.

A. Microscopía de campo claro de ARPE-19. B contraste de fase de ARPE-19. A y B magnificación 400 X.

En la Figura 33 A se aprecia como las células centrales están pigmentadas y hacia la periferia disminuye la presencia de pigmento. En la figura 33 B se observa que este efecto se encuentra relacionado con el grosor del epitelio que es mayor en el centro y menor en la periferia, concordante con el patrón de crecimiento observado en la Figura 33 A.

Microscopía de epifluorescencia.

En este tipo de experimentos uno de los puntos controversiales en el análisis de muestras de células fijadas, incluidas y en ocasiones teñidas es la influencia del tratamiento celular para demostrar la presencia de gránulos autofluorescentes en el RPE.

Se plantea que todas estas etapas generan entrecruzamiento y oxidaciones de los componentes intracelulares proteicos, membranas y cofactores, que pueden generar “artefactos” en el momento de hacer las mediciones, o sea, que la autofluorescencia del RPE puede ser un proceso generado a partir de la manipulación de los tejidos (Marmorstein *et al.*, 2002; Neumann *et al.*, 2002).

Para evitar esta situación experimental las células ARPE-19 se analizaron por epifluorescencia sin fijarlas ni teñirlas, sólo directamente bajo la estimulación con la fuente de luz para registrar su emisión de fluorescencia. Al estimular las células con luz azul (470 - 490 nm) se observa autofluorescencia que aparece alrededor de los 6-8 meses de cultivo en ausencia de SE (Figura 34 y 35).

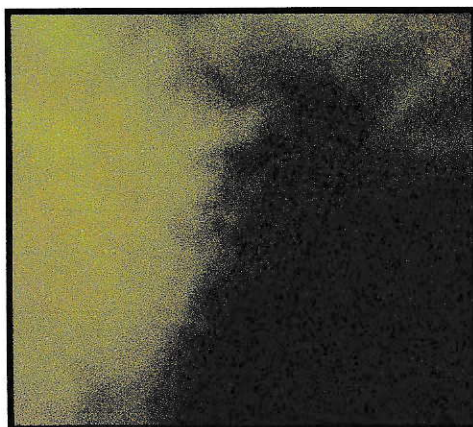


Figura 34. Autofluorescencia de ARPE-19 de 6 meses de crecimiento en cultivo.

La autofluorescencia celular de la preparación mostrada en la figura 33, se evaluó por microscopía de epifluorescencia al excitar a 470-490 nm.

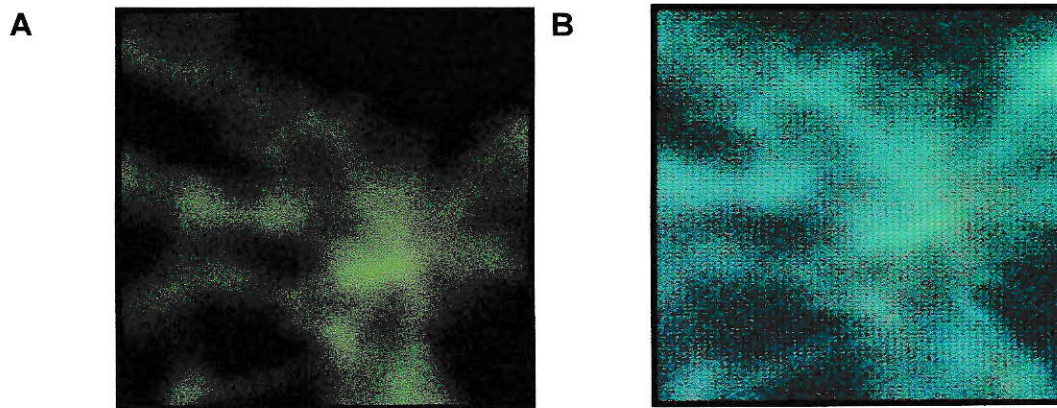


Figura 35. Autofluorescencia de ARPE-19 de 1 año de crecimiento en cultivo. Evaluado por microscopía de epifluorescencia con excitación a 360-380 nm en A y con excitación a 470-490 nm en B, (magnificación 200 x).

En las Figuras 34 y 35 se observa que la autofluorescencia mayoritariamente proviene de las regiones más antiguas (centrales del cultivo). Para evaluar de mejor manera la presencia de autofluorescencia e intentar identificar la fuente de ésta se realizó microscopía confocal.

Microscopía confocal.

Una muestra de ARPE-19 sin suplementar SE, cultivado 1,5 años sin fijación, se observó por microscopía confocal. Se usó como fuente luminosa un laser estimulación a 488 nm. En la figura 36 se observan los gránulos auto fluorescentes, cuya fluorescencia va en aumento hacia el ápice de las células y junto a ellos se observa la presencia de granos no fluorescentes. Al aumentar la resolución podemos apreciar mediante el uso de dos canales de emisión de fluorescencia la presencia de dos poblaciones de gránulos (Figura 37).

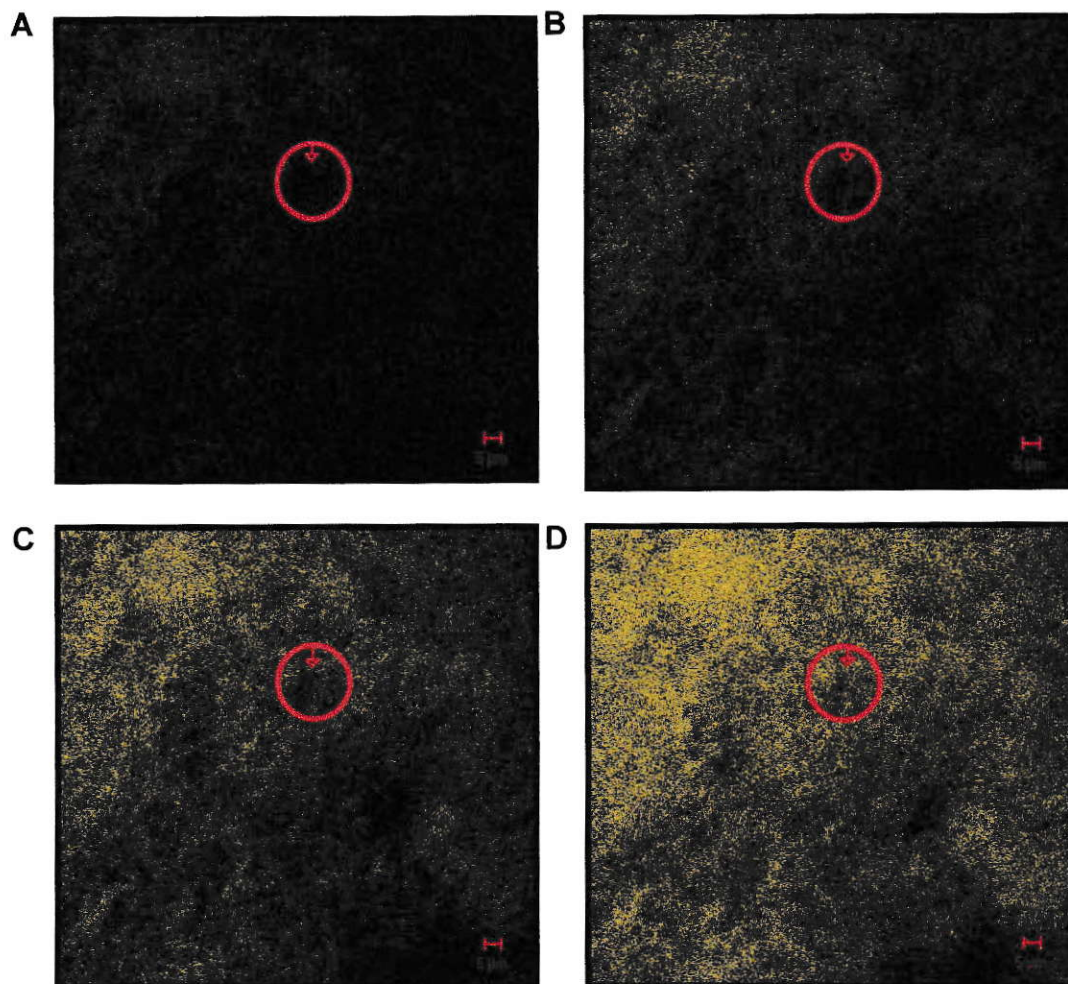


Figura 36. Microscopía confocal de ARPE-19 de 1,5 años de cultivo.

La muestra se excitó a 488 nm desde un plano inferior en A hasta un plano superior en D. La flecha en el círculo en rojo señala la ubicación de un núcleo celular (barra roja corresponde a 5 μm , distancia entre planos confocales 0,8 μm).

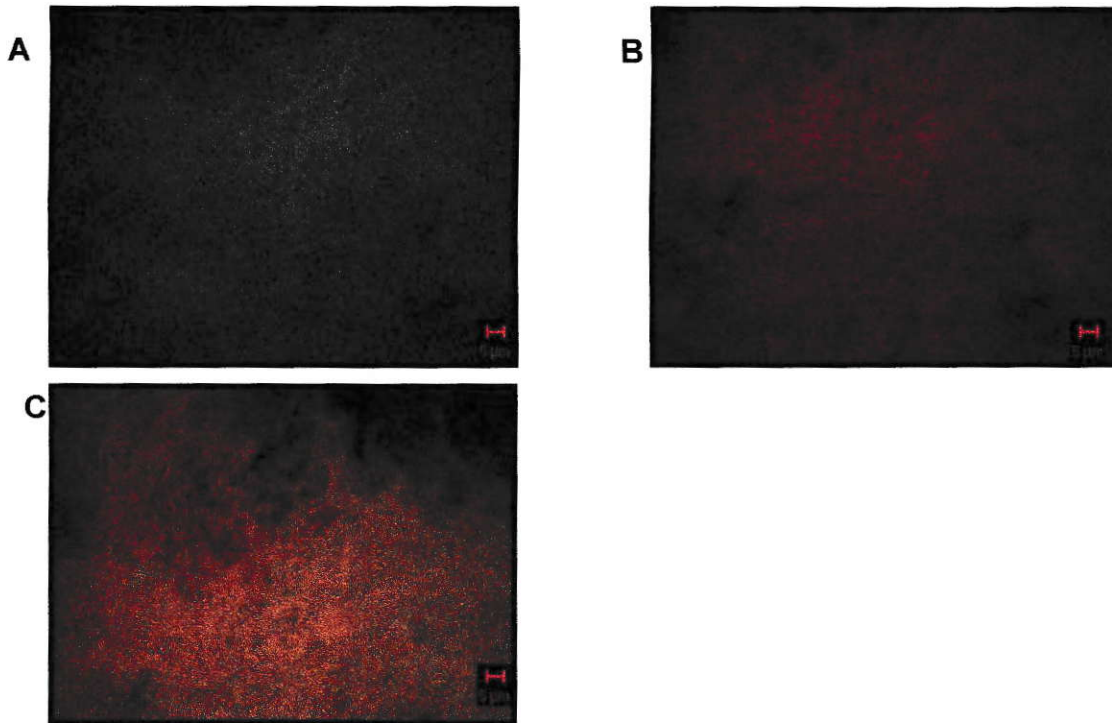


Figura 37. Microscopía confocal de la autofluorescencia de ARPE-19 de 1,5 años de cultivo.

Se utilizó una excitación a 488 nm. A. Filtro de emisión entre 505-530 nm. B. Filtro de emisión entre 560-615 nm. C. Superposición de A y B. (Barra roja corresponde a 5 μm).

En la figura 37 observa un gran número de gránulos no fluorescentes compatibles con melanosomas, puesto que las células se pigmentan alrededor de los 6 meses de cultivo, esto es característico del RPE humano. Asimismo destacan los granos autofluorescentes en estas células las que no se alimentaron con algún derivado fotooxidado de vitamina A y demuestra que es posible generar gránulos autofluorescentes en el epitelio pigmentario humano sin que este sea suplementado con segmentos externos de fotorreceptores.

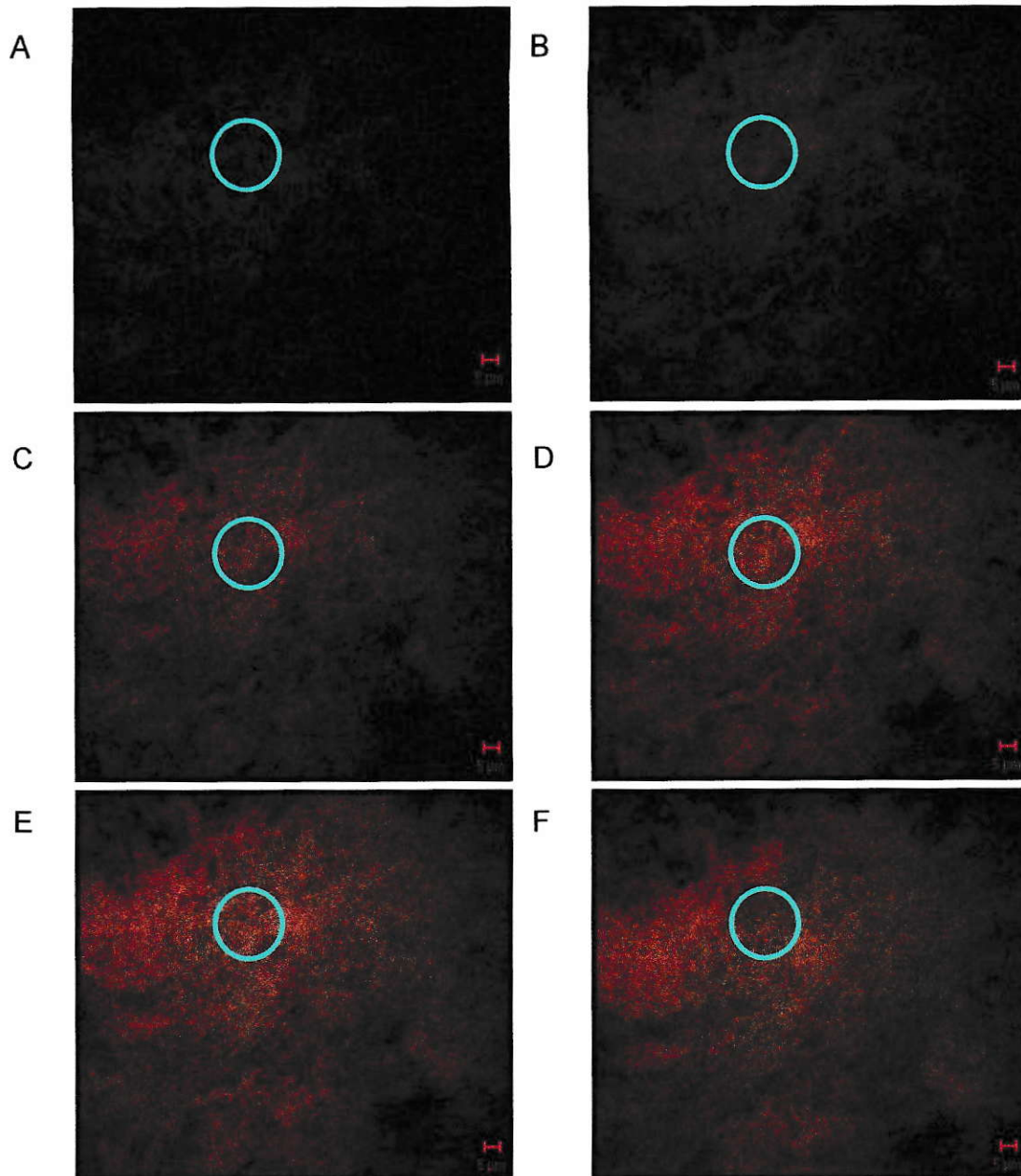


Figura 38. Microscopía confocal de ARPE-19 de 1,5 años de cultivo los cuales se excitaron a 488 nm desde un plano inferior en A hasta un plano superior en F.

Se utilizaron filtros de emisión de 505-530 nm y 560-615 nm superpuestos. Círculo celeste: núcleo celular (barra roja corresponde a 5 μm , distancia entre planos confocales 0,8 μm).

Los gránulos encontrados parecen ser muy pequeños para su caracterización en un microscopio de fluorescencia. De allí que la separación por canales de emisión de fluorescencia permitió identificarlos y determinar su distribución según el plano confocal estudiado. Así es posible considerar que los granos fluorescentes aparecen a la altura nuclear como se muestra en la figura 36 y en las figuras 38 B-D y también se aprecian que los granos de pigmento (melanosomas) se encuentran hacia el ápice celular (Figuras 38 E-F).

Este resultado es concordante con lo encontrado en las muestras provenientes de globos oculares de humanos.

I.3. Retina y epitelio pigmentario de *Octodon degus* como modelo de trabajo.

Histología.

Octodon degus es un mamífero diurno que es capaz de ver desde el ultravioleta cercano hasta el infrarrojo (Chavez *et al.*, 2003). Para demostrar que su retina se asemeja a la encontrada en humanos y que esta tiene una organización en capas estratificadas, se hizo una histología con tinción de hematoxilina eosina y se analizó con microscopía de campo claro para corroborar las similitudes con la retina humana (Figuras 39, 40 y 41).

En estas figuras se observa que las capas descritas para el humano tiene semejanza con las encontradas en *Octodon degus* (Delgado *et al.*, 2009). Estas capas retinales se mantienen hasta muy cerca de la emergencia del nervio óptico (Figura 39). Las capas mencionadas se muestran en la figura 41 y corresponden a las siguientes: células ganglionares (GCL), plexiforme interna (IPL), nuclear interna (INL), plexiforme externa (OPL), nuclear externa (ONL), foto receptores (FR) y epitelio pigmentario retinal (RPE).

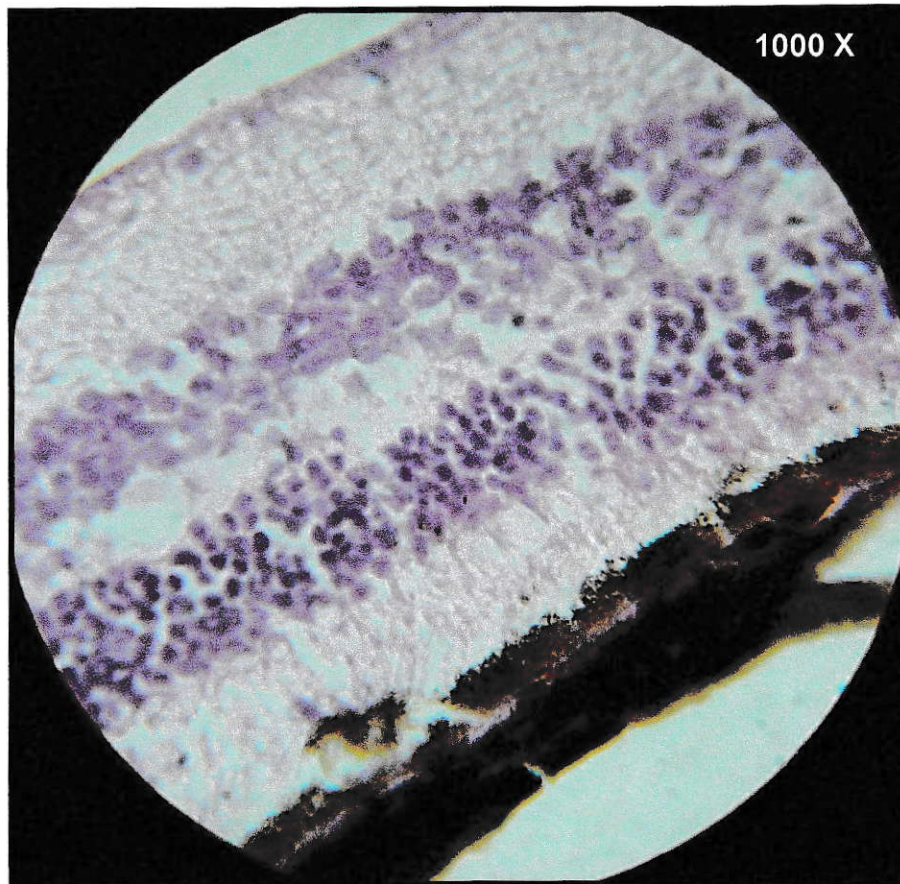


Figura 39. Histología de la retina central de *Octodon degus* de 1 año de vida. Microscopía de campo claro de un corte de tejido teñido con hematoxilina eosina (magnificación 1000 x).

En la figura 40 se observa la presencia de una capa gruesa de fibras nerviosas, que darán lugar al nervio óptico, como resumen de todos los axones provenientes de las células ganglionares de la retina.

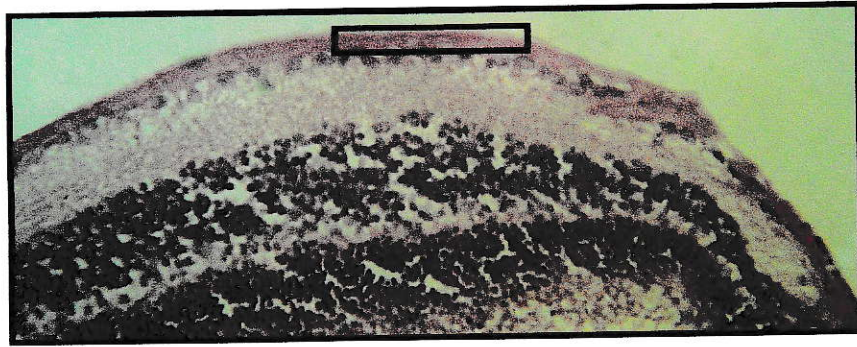


Figura 40. Histología de la retina adyacente al nervio óptico de *Octodon degus* de 1 año de vida.

Microscopía de campo claro de un corte de tejido teñido con hematoxilina eosina. En el rectángulo negro se destaca la capa de fibras nerviosas que originan las fibras del nervio óptico (magnificación 1000 x).

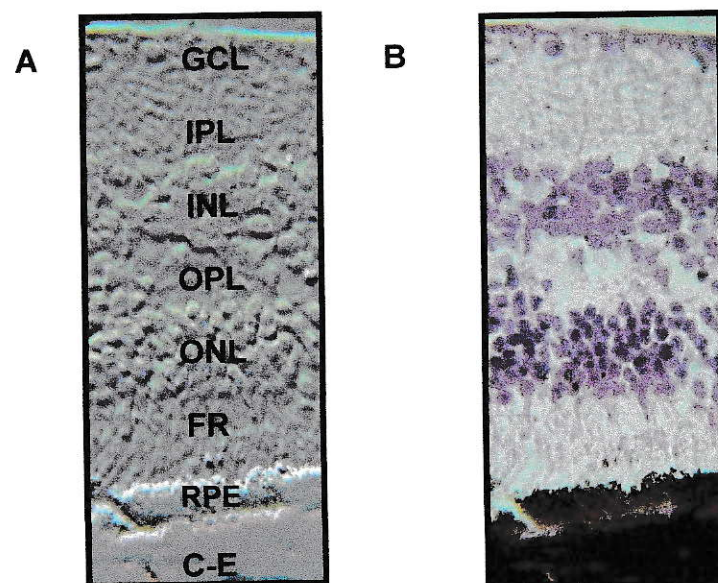


Figura 41. Histología de la retina estratificada de *Octodon degus* de 1 año de vida. Microscopía de campo claro de preparación teñida con hematoxilina eosina.

En el panel A se observa la imagen en relieve del panel B para mostrar las capas de la retina: células ganglionares (GCL), plexiforme interna (IPL), nuclear interna (INL), plexiforme externa (OPL), nuclear externa (ONL), fotorreceptores (FR), epitelio pigmentario retinal (RPE) y coroides-esclera (CE) (magnificación 1000 x).

Esta organización tiene su base en la capa del RPE que es la neuroglía natural de los fotorreceptores, en esta capa se aprecia un contenido de pigmentos al interior de los cuerpos celulares, que es característico para este grupo de células. En la Figura 42 se distingue el RPE en unión con el segmento externo de los fotorreceptores de la retina de *Octodon degus* en la parte superior y con la membrana basal del RPE en la parte inferior.

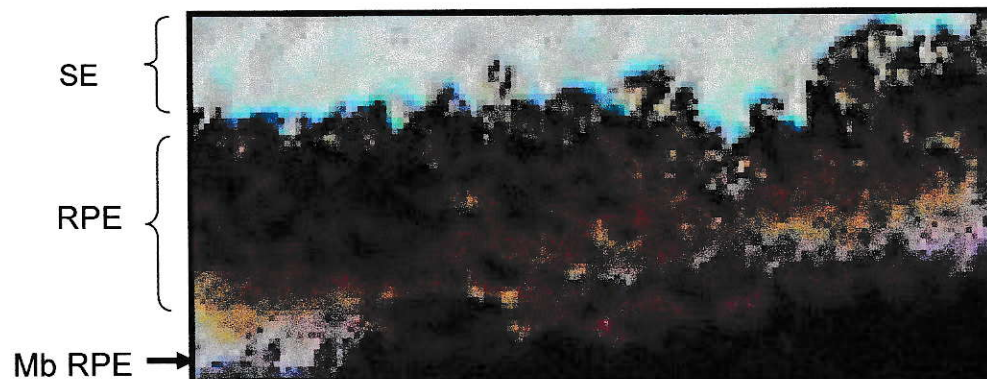


Figura 42. Histología de RPE de *Octodon degus* de 1 año de vida. Microscopía de campo claro de una preparación teñida con hematoxilina eosina.

(Magnificación óptica 1000 x). Magnificación digital. Segmentos externos de fotorreceptores (SE), epitelio pigmentario retinal (RPE) y membrana basal del epitelio pigmentario retinal (Mb RPE).

Estos resultados demuestran que el RPE de *Octodon degus* está inserto en una retina similar a la humana y que tiene un alto contenido de gránulos de pigmento.

Para evaluar si la generación de autofluorescencia de este RPE es proporcional a la del animal, se utilizó microscopía de epifluorescencia.

Microscopía de epifluorescencia.

La señal de auto fluorescencia se muestra en las fotografías de la figura 39 en escala de grises. Como se observa la señal de autofluorescencia proveniente del RPE aumenta en relación a la edad del animal (Figura 43 B). Esta muestra histológica se fijó en formaldehído al 2,5 %.

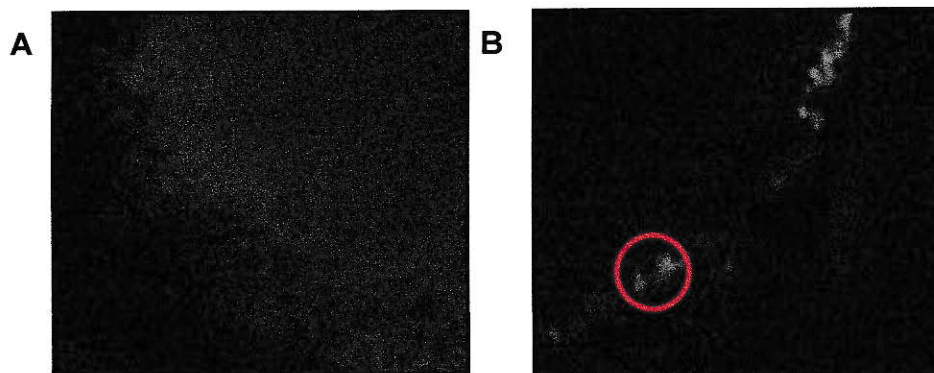


Figura 43. Autofluorescencia de epitelio pigmentario de *Octodon degus*.

Microscopía de epifluorescencia de una preparación de retina con excitación a 364 nm.

A: 3 meses, B. 1,5 años de vida. Círculo rojo: señal fluorescente, magnificación 1000 x.

En la Figura 43 A se observa que a temprana edad (tres meses) la señal de autofluorescencia no es distinguible del fondo, y que al año y medio aparece en forma definida (Figura 43 B).

En la Figura 44 se observa una muestra de RPE de *Octodon degus* sin fijación, ni tinción para evitar el efecto de la manipulación del tejido y evaluar que la emisión de autofluorescencia del RPE no sea un artefacto del tratamiento del tejido. El RPE presenta diferente longitud de onda de emisión de fluorescencia dependiendo de la longitud de onda utilizada como fuente de excitación, estableciéndose un máximo en la longitud de onda UV cercana a 360-380 nm.

La figura 44 B muestra que al excitar a 360-380 nm se produce una emisión en la región del azul lejano. Al aumentar la longitud de onda de excitación a 470-490 nm se observa un corrimiento de la emisión a longitudes de onda mayores (amarillo – verde) (Figura 44 C). Un mayor aumento de la excitación 550-570 corre hacia el rojo la emisión de fluorescencia (Figura 44 D). Esto significa que hay más de un fluoróforo en el RPE de *Octodon degus*. Lo cual es concordante con los primeros estudios realizados en lipofucsina de RPE que los separó por sus propiedades espectrales de emisión de fluorescencia, sin ser identificados individualmente (Eldred *et al.*, 1988).

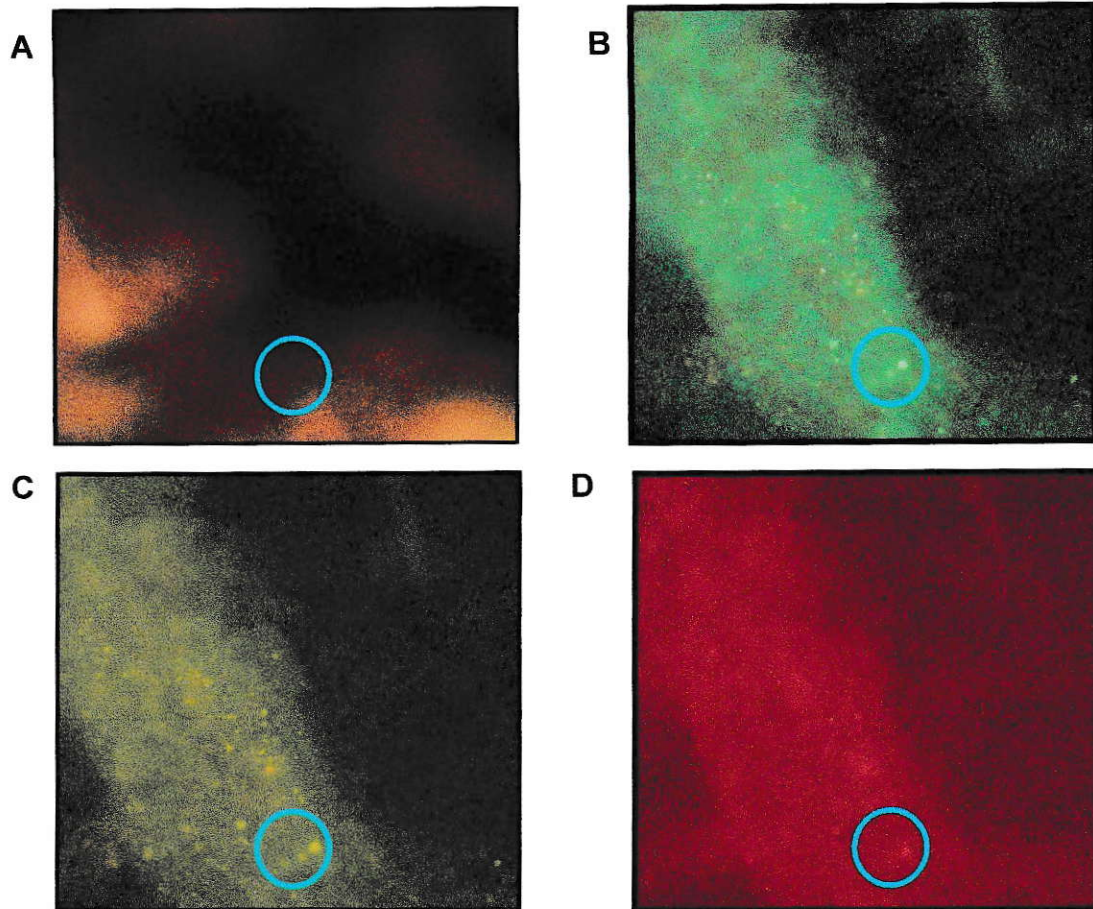


Figura 44. Autofluorescencia de epitelio pigmentario de *Octodon degus* de tres años de vida.

Microscopia de epifluorescencia de una preparación de RPE sin fijación ni tinción. A: Campo claro; B excitación a 360-380 nm; C excitación a 470-490 nm y D excitación a 550-570 nm. Círculo celeste: gránulos auto fluorescentes. Magnificación 1000 x.

Para identificar la autofluorescencia de los gránulos se hizo una magnificación digital de los datos que se muestran en la Figura 44, resultados que se muestran en la figura 45. Aquí se observa que existen gránulos pigmentarios

que no fluorescen al ser excitados con UV (360-380 nm) y luz azul (470-490 nm) que corresponden a melanosomas.

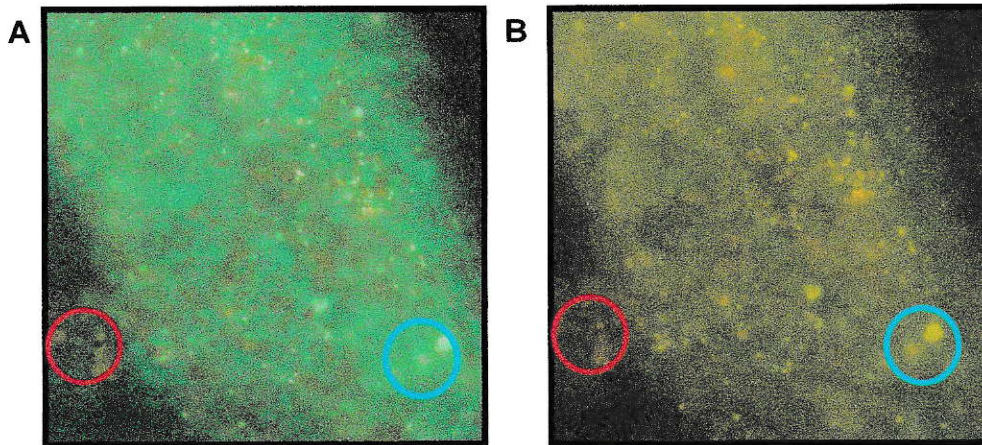


Figura 45. Autofluorescencia de los gránulos del epitelio pigmentario de *Octodon degus* de tres años de vida.

Magnificación de la figura 40 obtenida por microscopia de epifluorescencia. A: Excitación a 360-380 nm. B: Excitación a 470-490 nm, círculo rojo: gránulos no fluorescentes, círculo celeste: gránulos fluorescentes. Magnificación digital.

Así en el RPE de *Octodon degus* existen gránulos autofluorescentes y otros pigmentarios no fluorescentes que se excitan con luz UV y luz azul, conducta similar a la descrita para el RPE humano.

La ubicación celular de éstos gránulos encontrados en el RPE de *Octodon degus*, se hizo por microscopía confocal.

Microscopía confocal.

Las muestras de RPE no fijadas, ni teñidas se observaron por microscopía confocal. Las figuras 46 y 47 muestran la autofluorescencia en el plano confocal al excitar con un láser a 488 nm. Al igual que en epifluorescencia se visualiza una señal proveniente desde el interior del epitelio pigmentario. Alrededor del núcleo celular, en la figura 46 se observa que a mayor resolución aparecen puntos autofluorescentes. Esta fluorescencia depende de la edad; pues es de menor intensidad en la figura 47 A, que corresponde a una muestra de RPE de un individuo de 1,5 años respecto a la muestra de un animal de 3 años (Figura 47 B).

Este fenómeno es generalizado en la muestra, como se observa en la figura 48 al disminuir su magnificación, sin embargo no se observa uniformidad en la muestra, al igual que lo observado para el RPE humano (Burke *et al.*, 2005).

En la Figura 48 y 49 al aumentar la resolución de la imagen se puede apreciar que la fluorescencia proviene de gránulos intracelulares, estos pueden ser de diversos tamaños, así es posible encontrar gránulos de hasta alrededor de 1 μm circundantes al núcleo celular y sobre este (Figura 50). Los gránulos mencionados aumentan en número y tamaño a mayor edad del ojo del animal estudiado y por sus características podrían corresponder a gránulos de lipofucsina. Se observan otros granos no fluorescentes de morfología ovalada, que pueden corresponder a gránulos de melanina o melanosomas.

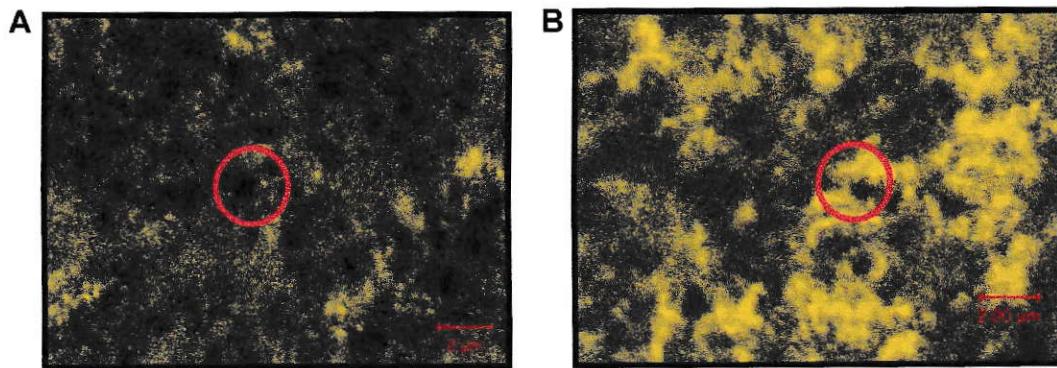


Figura 46. Plano de fluorescencia máxima de la microscopía confocal del epitelio pigmentario retinal de *Octodon degus*.

A: 1,5 años de vida, B: 3 años de vida. Barra roja 2 μm , Círculo rojo, núcleo celular de RPE.

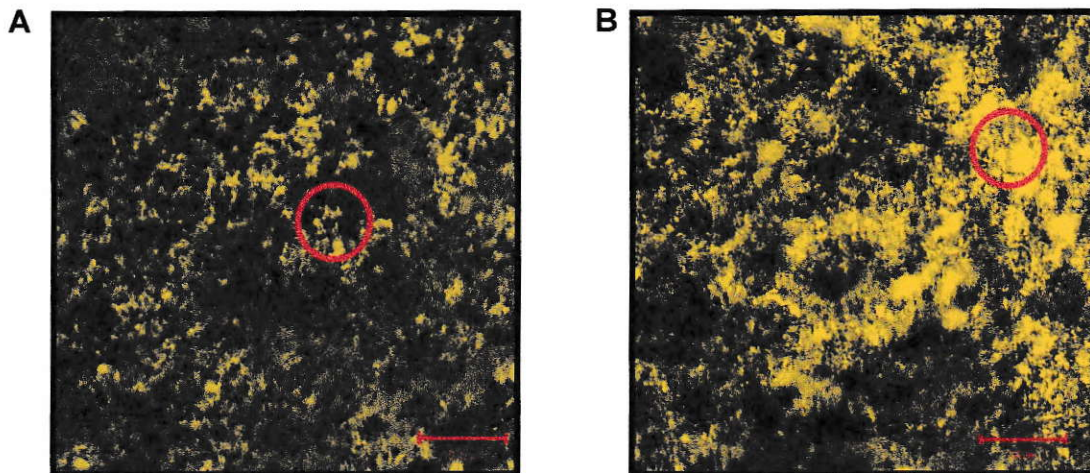


Figura 47. Plano de fluorescencia máxima de la microscopía confocal del epitelio pigmentario retinal de *Octodon degus*.

A. Fotografía confocal del plano de fluorescencia de máxima del epitelio pigmentario retinal de degus 1,5 años de vida. B. Fotografía confocal del plano de fluorescencia de máxima del epitelio pigmentario retinal de degus 3 años de vida. Excitación a 488 nm. Barra roja, 10 μm , Círculo rojo: áreas de gránulos autofluorescentes en RPE.

Para mejorar la visualización del RPE se realizó microscopía confocal de muestras de retina y RPE fijadas. En las figuras 48, 49 y 50 se muestra una preparación de RPE de *Octodon degus* fijada en formaldehído al 2.5% para mejorar la visualización de los gránulos autofluorescentes. Se observa que en los planos confocales de la muestras de mayor edad, hubo un aumento de la señal de autofluorescencia de los gránulos presentes en el área perinuclear y sobre el núcleo.

Al utilizar una muestra fijada en formaldehído al 2,5% y mejorar la resolución se observa que existe un aumento de los gránulos autofluorescentes en los planos confocales de la muestra de *Octodon degus* de mayor edad (Figura 48, 49 y 50). Los gránulos permanecen presentes en al área perinuclear y sobre el núcleo.

La presencia de éstos gránulos autofluorescentes permiten plantear a *Octodon degus* como un roedor que es capaz de generar lipofucsina por envejecimiento del RPE. Esto se relaciona con ser un roedor de hábitos diurnos y que por lo tanto esté permanentemente expuesto a fotoxidación, a diferencia de roedores nocturnos como ratas o ratones, quienes no generan RPE con gránulos autofluorescentes de manera silvestre.

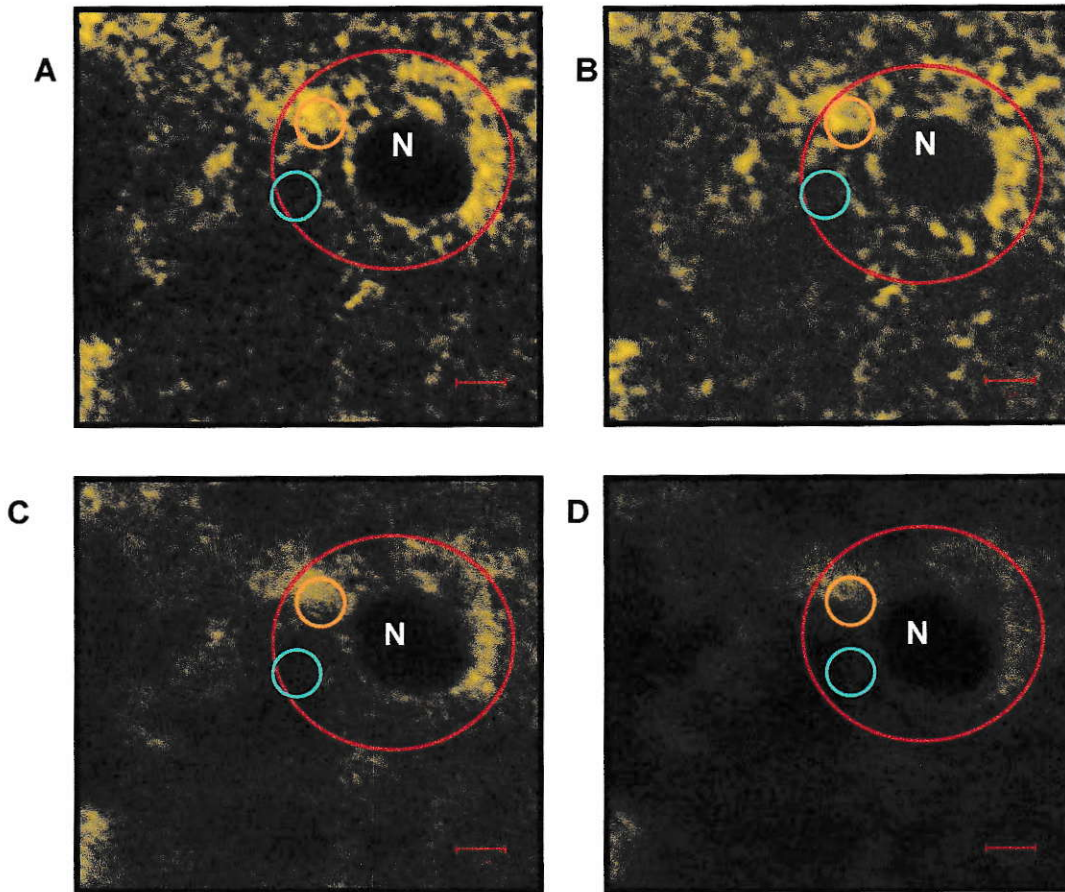


Figura 48. Planos confocales de autofluorescencia del epitelio pigmentario retinal de *Octodon degus* de 1,5 años fijado.

Excitación 488 nm desde el plano inferior en A hasta el plano superior en D. Círculos: rojos, área perinuclear; naranjos: gránulos peri nucleares autofluorescentes y celestes gránulos intracelulares no fluorescentes, N, núcleo celular; barra roja 2 μm ; distancia entre planos confocales 0,1 μm . Fijación de la muestra en formaldehído al 2,5 %.

El procesamiento de imágenes digitales de las imágenes de la figura 48 permitió detectar de manera más nítida la presencia de los distintos gránulos encontrados (Figura 49). Se observa un gran número de gránulos no fluorescentes compatibles con melanosomas. Esto es característico del epitelio pigmentario humano. Los gránulos autofluorescentes pueden llegar a tener un tamaño de alrededor de $1\ \mu\text{m}$ (Figura 50).

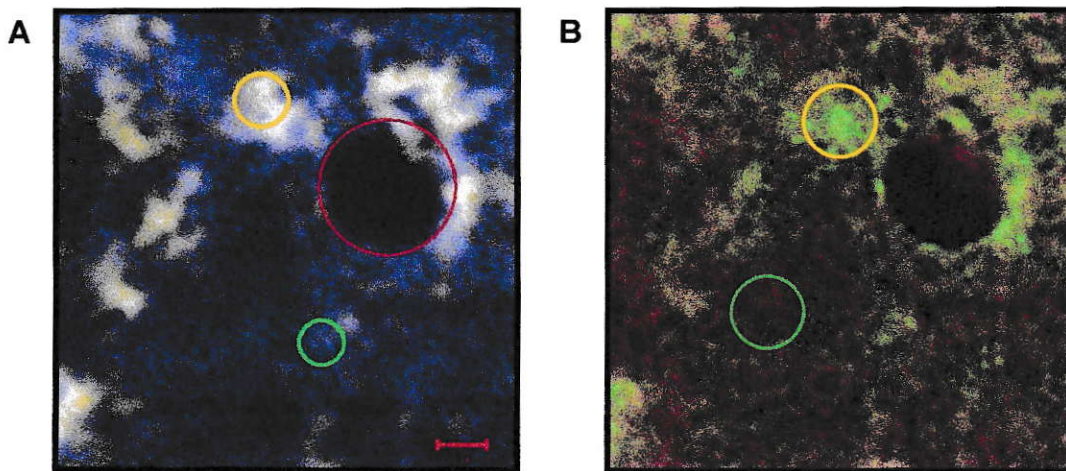


Figura 49. Microscopía confocal de autofluorescencia de RPE de *Octodon degus* de 1,5 años fijado.

Excitación 488 nm. En A y B se utilizó balance de contrastes y optimización de colores seleccionando los canales apropiados para optimizar la visualización de los gránulos al interior del RPE. Círculo: rojo, área perinuclear; amarillo, gránulos peri nucleares autofluorescentes y verde, gránulos intracelulares no fluorescentes. Barra roja, muestra $2\ \mu\text{m}$. Fijación de la muestra en formaldehído al 2,5 %.

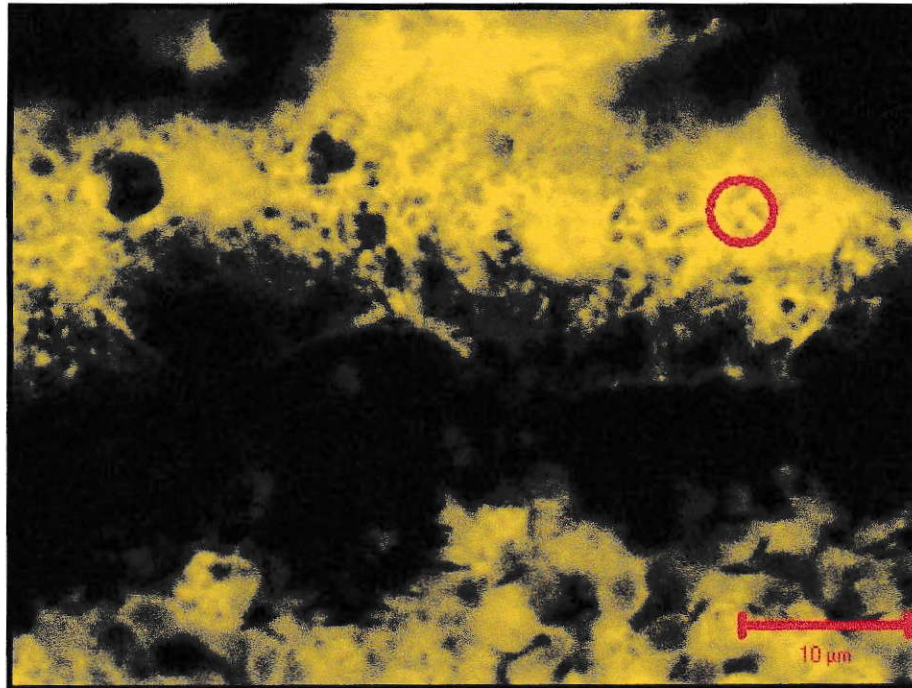


Figura 50. Microscopía confocal de autofluorescencia de RPE de *Octodon degus* de 3 años fijado.

Excitación 488 nm. Círculo rojo muestra gránulo intracelular de alrededor de 1 μm . Barra roja, 10 μm , Fijación de la muestra en formaldehído al 2,5 %.

Los resultados de microscopía de epifluorescencia y confocal muestran que en el RPE de *Octodon degus* se generan gránulos autofluorescentes de características similares a las lipofuscinas humanas. Este resultado permite considerar a *Octodon degus* como modelo de estudio de degeneraciones retinianas, por su similitud a la retina humana.

Para describir con más detalle la morfología y distribución de las características ultraestructurales de los gránulos del RPE de *Octodon degus*, se usó microscopía electrónica de muestras de tejidos fijados en glutaraldehído y en Tetróxido de Osmio. Se incluyó en una resina epóxica para hacer los cortes ultra finos en ultramicrotomo. Se observaron las grillas en un microscopio electrónico de transmisión.

A la fecha esta investigación parece ser el primer reporte de la ultraestructura de los gránulos del epitelio pigmentario de este animal.

Microscopía electrónica.

La microscopía electrónica del epitelio pigmentario de la figura 51 mostró abundantes y diversos gránulos, algunos de ellos con características típicas de gránulos de melanina, es decir, con un eje más largo que otro y con tinción marcada frente a la presencia de metales pesados, otros semejantes a las lipofucsina encontradas en humanos de geometría más esférica y de distribución perinuclear y otros con características de fusión entre ellos (melanolipofucsina).

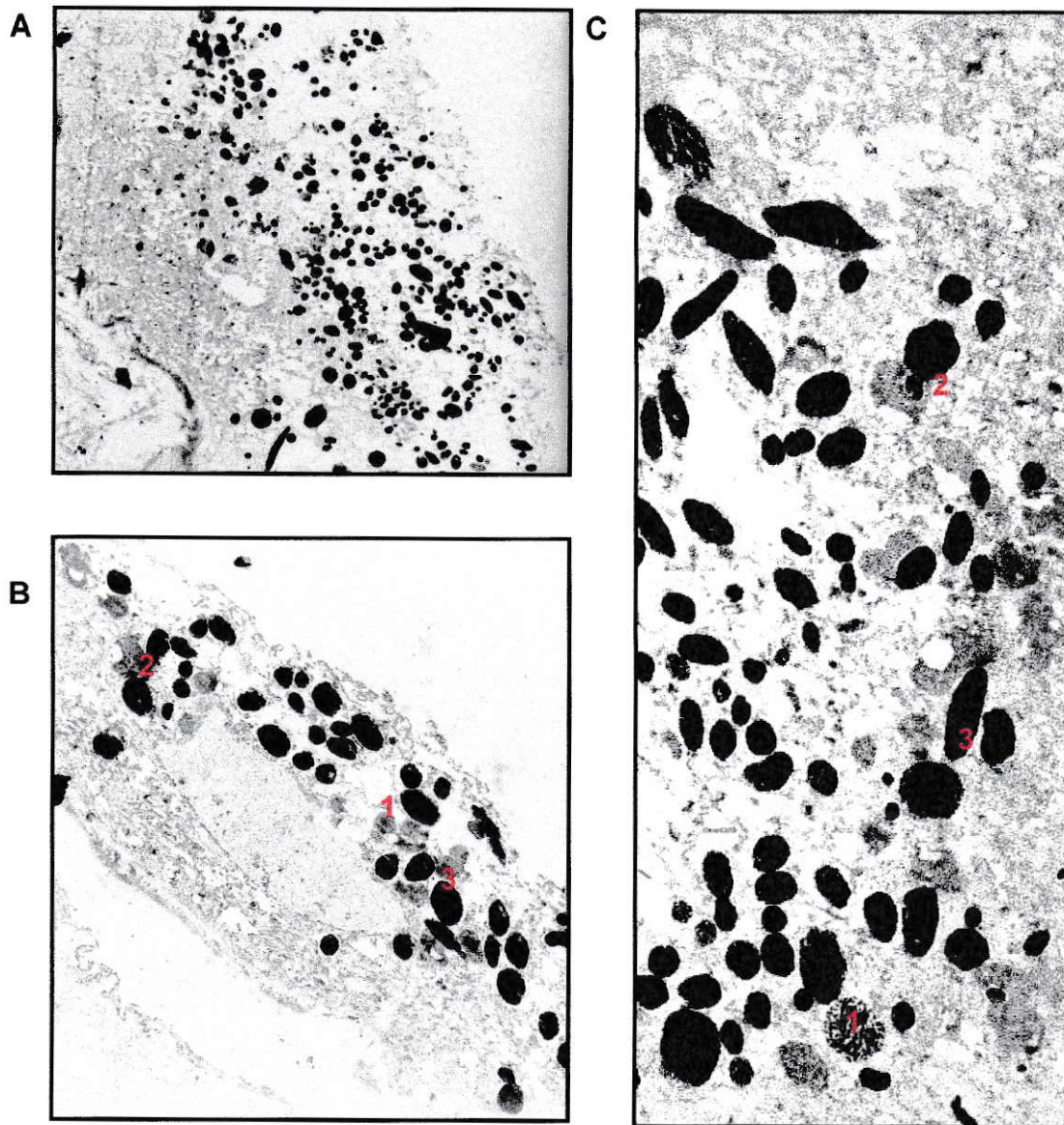


Figura 51. Microscopía electrónica de epitelio pigmentario retinal de *Octodon degus* de un año de vida.

A y B. Muestra de una sección transversal de RPE. C: Magnificación de una muestra de una sección longitudinal de RPE. Gránulos perinucleares: 1 Lipofucsina, 2 Melanolipofucsina, 3 Melanosomas. Fijación en glutaraldehído y Tetróxido de Osmio.

Los resultados obtenidos de los RPE de humanos y de *Octodon degus*, en su conjunto, muestran que el contenido de lipofucsina aumenta con la edad del tejido evaluado, concomitantemente también existe un aumento en la señal de autofluorescencia del RPE.

De acuerdo a los resultados este aumento de la autofluorescencia probablemente se deba a un aumento en el tamaño y en la masa de los gránulos de lipofucsina del RPE.

Capítulo II. Purificación y autofluorescencia de lipofucsina del RPE de humano y *Octodon degus*.

II.1. Purificación de lipofucsina.

Después de extraer los gránulos del RPE y separar la lipofucsina desde RPE humano, ARPE-19 y *Octodon degus* mediante los gradientes discontinuos de sacarosa preformados, se encontró que la banda de lipofucsina (L1) aparece entre las concentraciones 1,0-1,2 M de sacarosa, melanolipofucsina (L2) entre 1,5-1,55 M y melanina en 1,8-2,0 M (Figura 52 A). En la figura 52 B y C se muestra que los gránulos de las bandas de centrifugación L1 y L2 presentan autofluorescencia al ser excitados en el ultravioleta cercano (360 nm). Las bandas L1 y L2 se fraccionaron nuevamente en un gradiente similar, se recuperaron y se lavaron 4 veces con PBS para remover el exceso de sacarosa (Figura 52 D). De la lipofucsina lavada se extrajo una alícuota que se suspendió en PBS y se excitó a 360 nm y se observó la emisión de autofluorescencia (Figura 52 E).

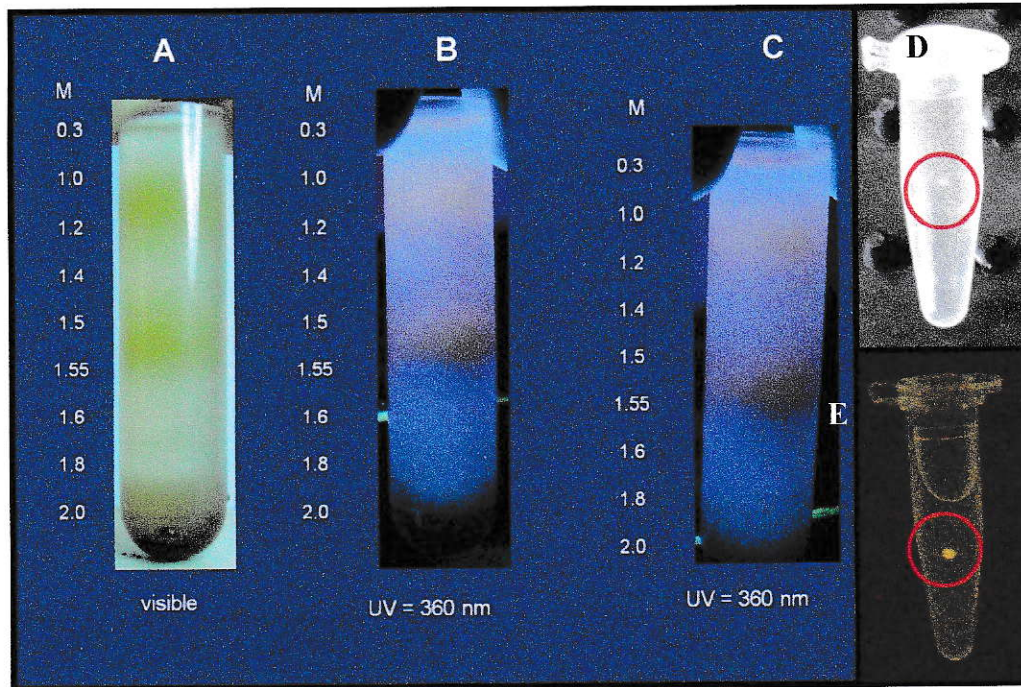


Figura 52. Ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa de gránulos de epitelio pigmentario humano.

A: Muestra separada en el gradiente de sacarosa iluminado con luz blanca. B. La misma muestra de A iluminada con luz UV a 360 nm. C. Otro gradiente en las mismas condiciones que en A iluminado con luz UV a 360 nm. En el lado derecho de cada tubo se muestra la concentración del gradiente discontinuo de sacarosa. D. Gránulos de lipofucsina humana suspendido en PBS y E. Los mismos gránulos suspendidos mostrados en D que se excitó a 360 nm.

La autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina se determinó por microscopía de epifluorescencia de la fracción L1 del gradiente discontinuo de sacarosa

II.2. Microscopía de epifluorescencia de los gránulos de lipofucsina humana.

Autofluorescencia.

Los gránulos de lipofucsina purificados se observaron en un microscopio de epifluorescencia para determinar si la producción de la autofluorescencia de estos gránulos se mantiene después del procesamiento realizado mediante las técnicas de purificación. Las figuras 53 y 54 muestran que los gránulos de lipofucsina aislados presentan autofluorescencia al estar en suspensión en amortiguador PBS, esta fluorescencia proviene desde gránulos individuales.

Este resultado es concordante con los resultados obtenidos desde los tejidos de RPE de humanos analizados mediante la misma técnica, pero fijados y teñidos por lo que es posible afirmar que esta autofluorescencia proviene intrínsecamente de propiedades de componentes del gránulo de lipofucsina y no del proceso de procesamiento de los tejidos por modificaciones secundarias de la lipofucsina del RPE en humanos.

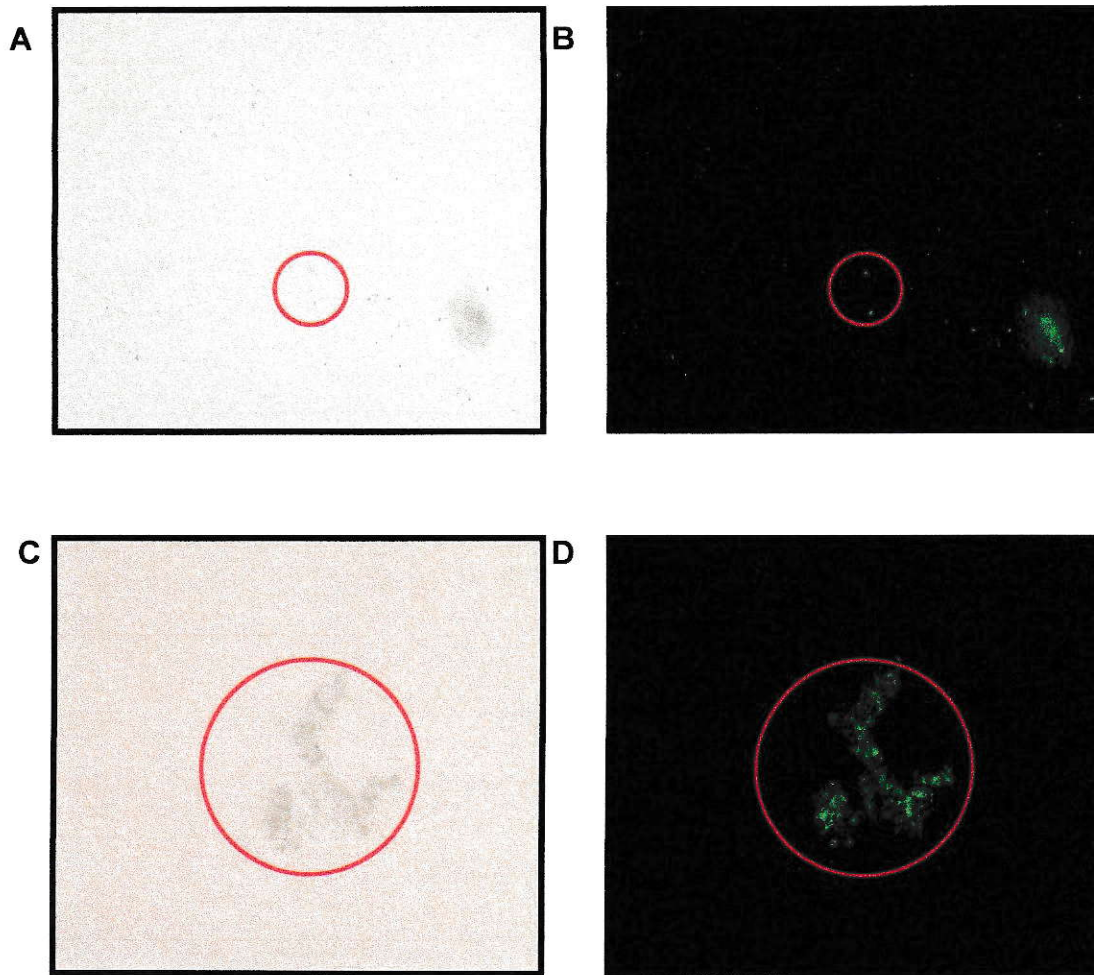


Figura 53. Autofluorescencia de gránulos de lipofuscina de epitelio pigmentario humano de individuos entre 65-70 años.

Microscopía de epifluorescencia de gránulos de RPE suspendidos en PBS. A. y C. campo claro, B. y D.: excitación con 470-490 nm. Magnificación 1000 x. Círculos rojos señalan los gránulos.

Las figuras 53 A y C indican la posición de los gránulos de lipofucsina en el campo visual del microscopio y en las figuras 53 B y D sus correspondientes imágenes de autofluorescencia. Como se observa en la Figura 53 C a medida que pasa el tiempo y los gránulos están expuestos a luz azul éstos comienzan a unirse entre sí y generan estructuras como las que se muestran en la Figura 53 C y D.

Con el objeto de dilucidar la estructura de los gránulos autofluorescentes se hizo una magnificación digital de los datos de la figura 53. Como se observa en la figura 54, las estructuras observadas demuestran que los gránulos emiten autofluorescencia de acuerdo a la longitud de onda empleada como fuente de excitación, en el panel A se empleó el contraste de fase para mostrar los límites de los gránulos, la figura 54 B muestra que al excitar a 360-380 nm se produce una emisión en la región del azul lejano. Al aumentar la longitud de onda de excitación a 470-490 nm se observa un corrimiento de la emisión a longitudes de onda mayores (Figura 54 C). Un mayor aumento de la excitación a 550-570 nm corre hacia el rojo la emisión de fluorescencia (Figura 54 D). Esto significa que hay más de un fluoróforo en la lipofucsina del RPE humano (Eldred *et al.*, 1988).

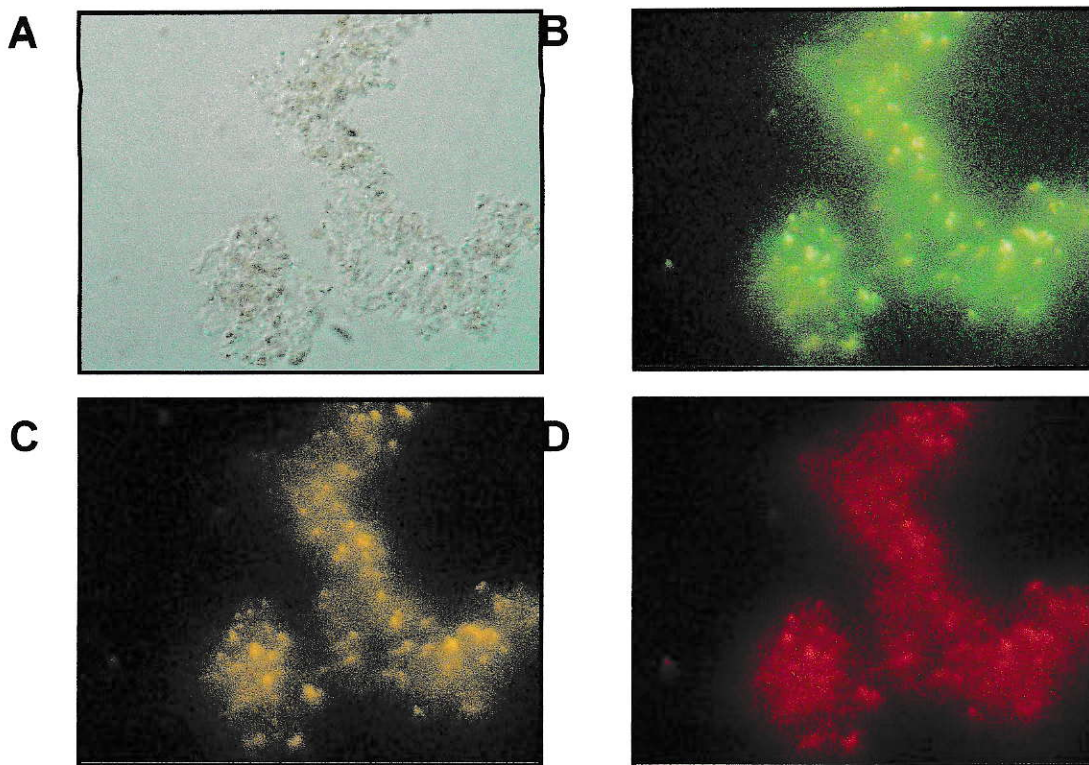


Figura 54. Autofluorescencia de gránulos de lipofuscina de epitelio pigmentario humano de individuos entre 65-70 años.

Se utilizaron los datos de la figura 49 C para magnificar la estructura de los gránulos.

A. Campo claro (contraste de fase), B. C. y D.: excitación a 360-380, 470-490, 550-570 nm, respectivamente. Magnificación 1000 x.

Para evaluar el efecto de los agentes de fijación e inclusión, se analizó los gránulos incluidos en resina epóxica y se observó que presentan un comportamiento similar a los gránulos en suspensión (Figura 55).

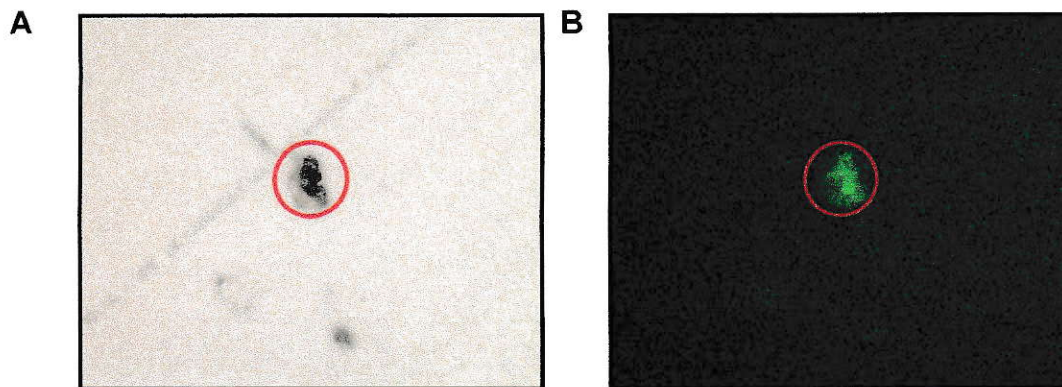


Figura 55. Autofluorescencia de gránulos de lipofuscina de epitelio pigmentario humano de individuos entre 65-70 años incluidos en resina epóxica.

La muestra corresponde a la fracción L1 fijada en formaldehído y Tetróxido de Osmio e incluida en resina epóxica. A. campo claro y B. se excito a 470-490 nm. Círculos rojos señalan los gránulos. Magnificación 1000 x.

Estos resultados indican que la presencia de autofluorescencia por parte de los gránulos de lipofuscina del RPE de humano, no corresponde a un “artefacto” o efecto de modificación de la muestra estudiada por agentes de fijación (como formaldehído o glutaraldehído), pues la autofluorescencia está presente en condiciones con y sin agente fijador (Figuras 53, 54 y 55). Se puede considerar la presencia de más de un fluoróforo dentro de un mismo gránulo, puesto que éstos emiten autofluorescencia de forma diferenciada según la longitud de onda de excitación utilizada (Figura 54).

Para evaluar si este comportamiento encontrado en los gránulos del RPE de humanos estaba presente en el RPE de *Octodon degus* se repitió sólo la caracterización con microscopía de epifluorescencia.

Microscopía de epifluorescencia de los gránulos de lipofucsina de *Octodon degus*

En la figura 56 se muestran los gránulos de lipofucsina suspendidos en PBS, estos presentan emisión de autofluorescencia al ser excitados con longitudes de onda en ultravioleta (360-380 nm) y luz azul (470-490 nm), este resultado demuestra el origen de la emisión de autofluorescencia del epitelio pigmentario de *Octodon degus* obtenido en los análisis de microscopía de epifluorescencia y confocal (Figura 40-46). Al igual que el resultado encontrado en el humano, con diferentes longitudes de onda de excitación se obtiene una emisión de fluorescencia dependiente de la longitud de onda de excitación. Estos resultados son compatibles con la presencia de más de un fluoróforo en los gránulos analizados.

En la Figura 56 A, se observa que los gránulos pigmentarios (melanosomas) del RPE de *Octodon degus* en suspensión presentan un comportamiento diferente de los gránulos de lipofucsina, al ser estimulados con luz.

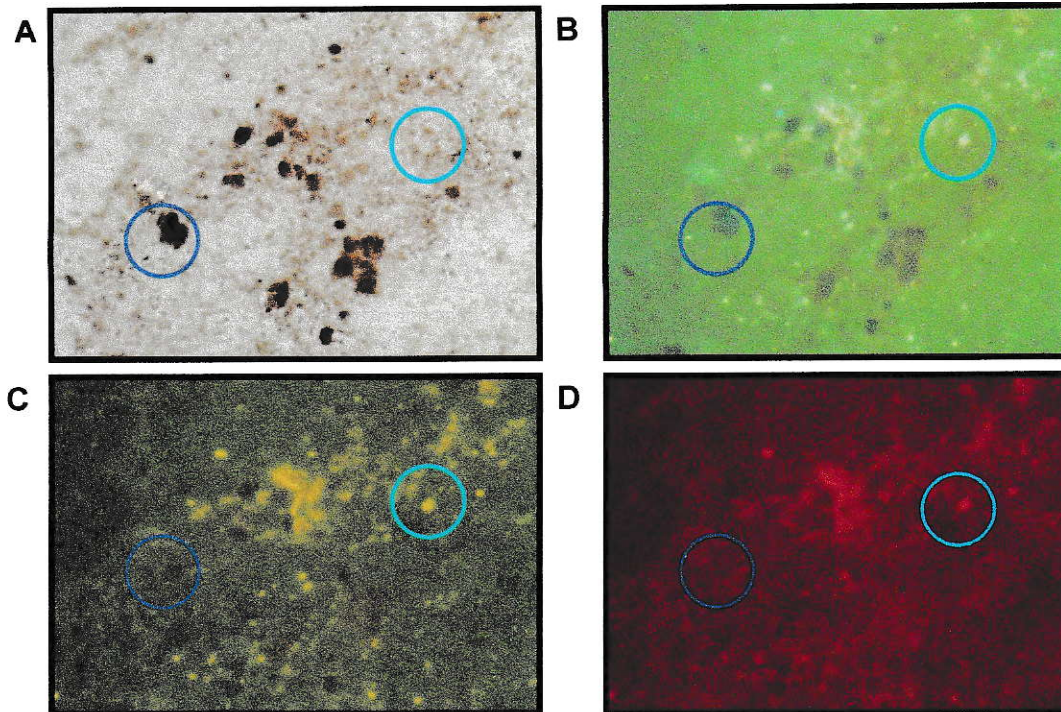


Figura 56. Autofluorescencia de gránulos de epitelio pigmentario de *Octodon degus* de tres años de vida.

A. Campo claro, B. C. y D. Microscopía de epifluorescencia con excitación a 360-390, 470-490, 550-570 nm, respectivamente. Círculo: celestes gránulos de lipofucsina y azules, gránulos de pigmento. Magnificación 1000 x.

Para evitar que los gránulos de lipofucsina purificados y separados mediante la técnica del gradiente discontinuo de sacarosa, no contuvieran como contaminante gránulos de melanina y de este modo evaluar sólo la ultraestructura de la lipofucsina humana.

Se analizó por microscopía electrónica de transmisión la banda L1 de los gránulos encontrados en el gradiente de sacarosa. Estas muestras se fijaron en formaldehído y Tetróxido de Osmio y se incluyeron en resina epóxica a la que se le realizó cortes ultra finos para el análisis por microscopía electrónica (Figura 57).

II.3. Microscopía electrónica de gránulos de lipofucsina humana

La ultraestructura de los gránulos de lipofucsina muestra que estos tienen una morfología variable, donde destaca la esfericidad como patrón característico con un tamaño que fluctúa entre 200 nm hasta 5 μm y están constituidos por gránulos más pequeños (Figura 57 B, C) algunos menores a 10 nm (Figura 57 D).

En la Figura 57 se muestra que los gránulos de lipofucsina humana poseen estructuras internas compartimentalizadas y que en su superficie parecieran existir ondulaciones, estos resultados han sido corroborados por microscopía de fuerza atómica (Warburton *et al.*, 2007).

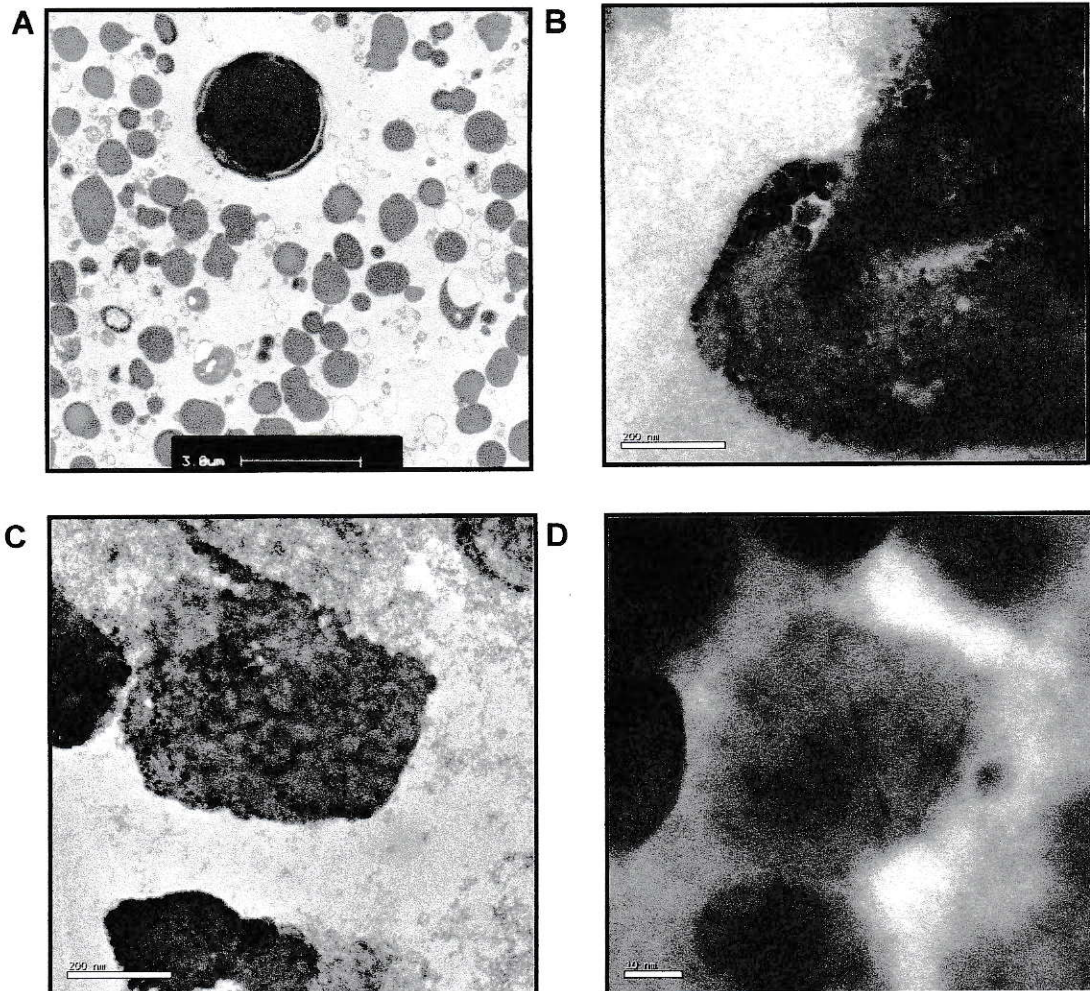


Figura 57. Ultraestructura de gránulos de lipofucsina de epitelio pigmentario humano de un individuo de 72 años de vida.

Microscopía electrónica de transmisión de una muestra fijada en formaldehído y Tetróxido de Osmio e incluida en resina epóxica. Barra indica en: A. 3 μm , B y C. 200 nm, D. 10 nm. Tinción: acetato de uranillo,

Para corroborar que los gránulos de lipofucsina purificados conservan las propiedades de autofluorescencia al ser excitados con longitud de onda en el rango de 488 nm, que es la fuente de excitación de los oftalmoscopios confocales laser (CSLO) utilizados en la evaluación de la retina y RPE en humanos "in vivo", se realizó estudio de espectroscopía de las muestras de lipofucsina purificadas y de esta forma identificar su comportamiento aisladas del medio intracelular.

II.4. Características espectroscópicas de los gránulos de lipofucsina.

Con el objeto de caracterizar las propiedades espectrales de una suspensión de gránulos de lipofucsina humana y de *Octodon degus*, se utilizó espectroscopía UV-visible y de fluorescencia.

UV-visible.

El análisis de la densidad óptica en función de la longitud de onda de los gránulos de las fracciones L1 y L2 correspondientes (espectrograma), muestra un comportamiento compatible con la dispersión luminosa de melanolipofucsina para la fracción L2 y absorción de luz entre los 350 y 450 nm, seguida por dispersión de luz hasta los 800 nm (Figura 58 B). En la Figura 59 se muestra la transformación logarítmica en base natural de la densidad óptica en función del logaritmo natural de la longitud de onda.

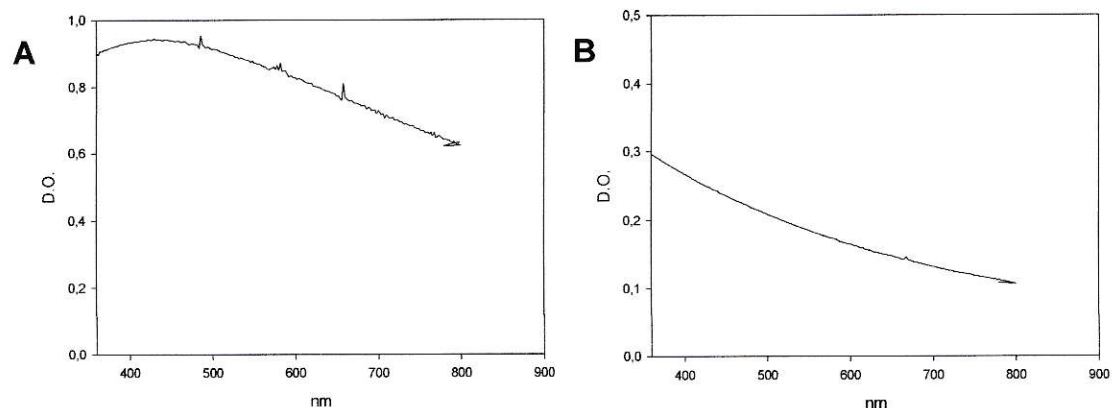


Figura 58. Espectros de absorción luz de lipofucsina y melanolipofucsina humana.

A. Lipofucsina (L1). B. Melanolipofucsina (L2). La suspensión contenía 50 μg de lipofucsina o melanolipofucsina en 1 ml de PBS a 25° C.

Así, según la ecuación de Raileigh: $\ln D.O. = \ln 389,65 \mu^4 L^4 - 4 \ln \lambda$, se observa en la figura 59 que los datos de muestras de lipofucsina se pueden linealizar entre 500 y 800 nm, mientras que para melanolipofucsina se observa linealidad en todo el rango (300 a 800 nm). De la parte lineal de lipofucsina se obtuvo la pendiente (M) con un valor de 0,95 y de 1,47 para melanolipofucsina.

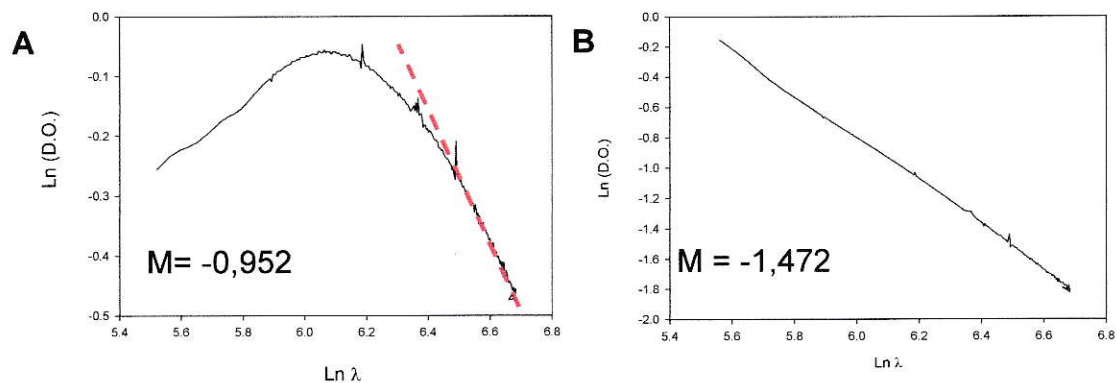


Figura 59. Logaritmo natural de la densidad óptica y longitud de onda de lipofucsina y melanolipofucsina humana.

A. Lipofucsina (L1). B. Melanolipofucsina (L2). La suspensión contenía 50 μg de lipofucsina o melanolipofucsina en 1 ml de PBS a 25° C.

Estos datos explican que melanolipofucsina tiene forma alargada en relación a lipofucsina.

Fluorescencia.

La emisión de autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina al excitar a 364 nm, mostró cuatro máximos de emisión y tres hombros (Figura 60). Debido a la

dispersión de luz de los gránulos en estos experimentos se utilizó el accesorio de “front face” para disminuir el efecto de dispersión luminosa.

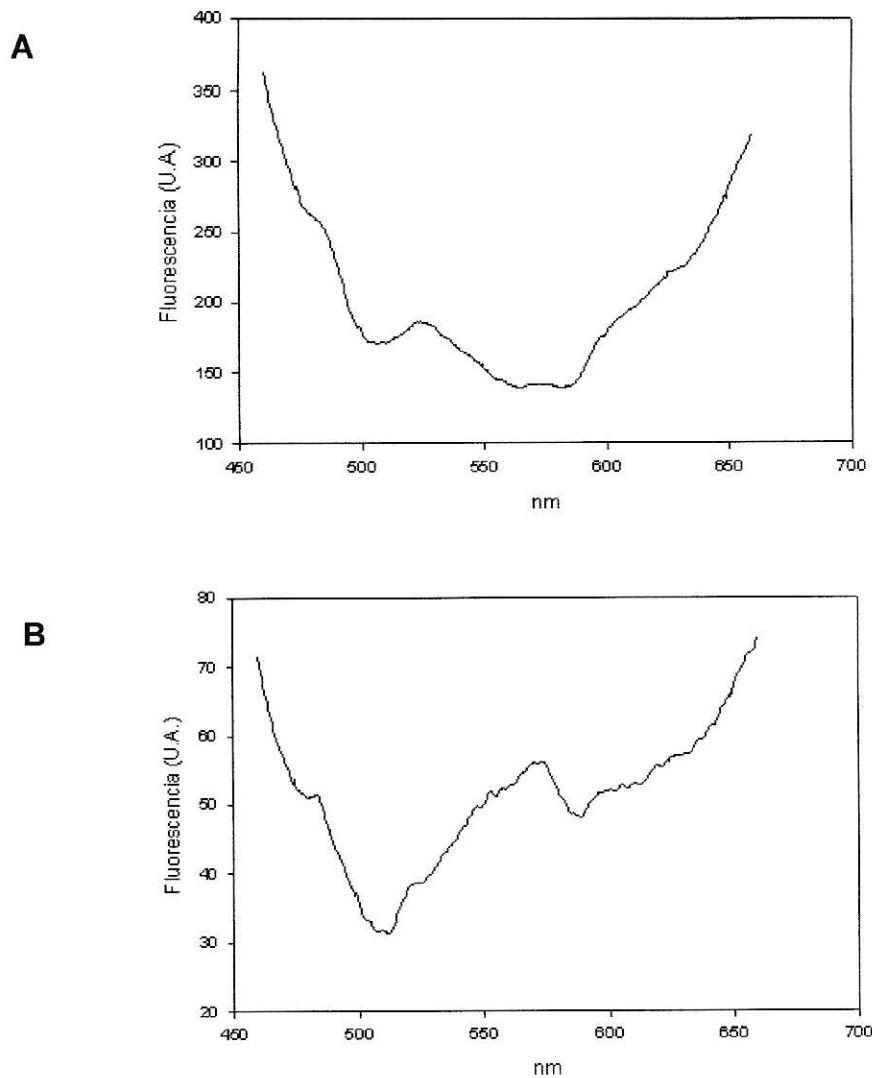


Figura 60. Espectros de emisión de fluorescencia de lipofucsina humana (50 µg/ml) suspendida en PBS y excitada a 364 nm en un sistema “front face”, a 25° C.

A: muestra en suspensión (máximo: 525 y hombros a 570, 615, 633 nm) , B: cubeta para muestra sólida (máximo: 570 y hombros a 525, 615, 633 nm).

Al realizar este mismo experimento pero con una longitud de onda de excitación de 488 nm se obtuvieron tres máximos de emisión a 580, 670 y 735 (Figura 61 y 62).

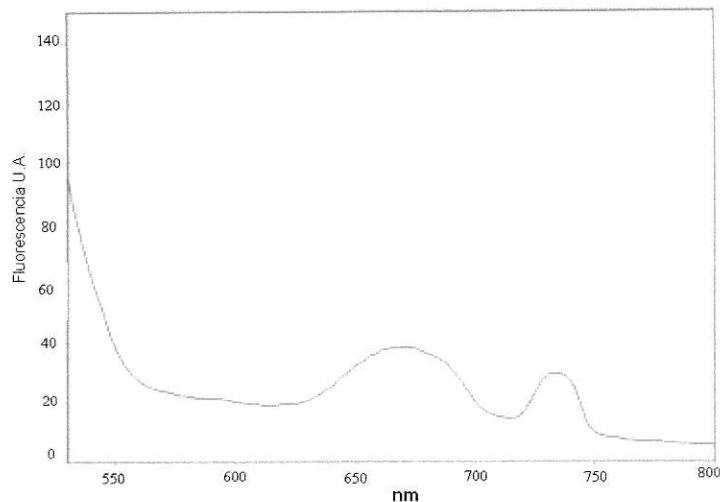


Figura 61. Espectros de emisión de fluorescencia de lipofucsina humana (50 µg/ml) suspendida en PBS al excitar a 488 nm en un sistema "front face", a 25° C.

Los máximos de emisión son: 580, 670, 735 nm.

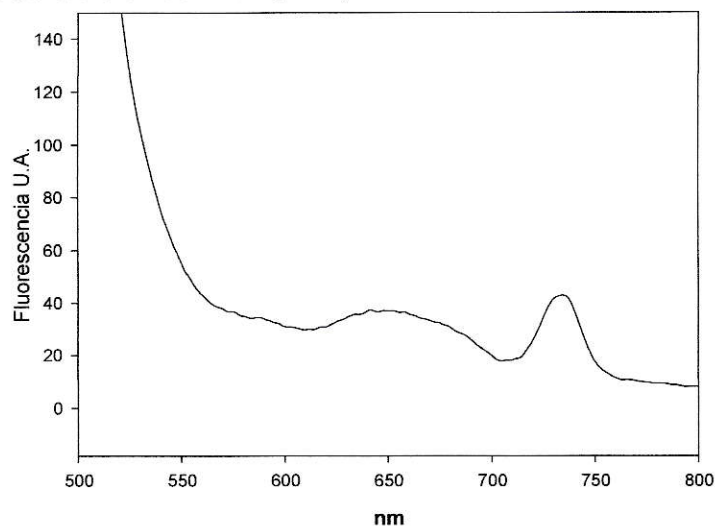


Figura 62. Espectro de emisión de fluorescencia de lipofucsina de *Octodon degus* (50 µg/ml) suspendida en PBS al excitar a 488 nm en un sistema "front face", a 25° C.

Los máximos de emisión son: 580, 650, 735 nm.

Las Figuras 61 y 62, muestran para lipofucsina humana y para *Octodon degus* la presencia de máximos de emisión a diferentes longitudes de onda que se resumen en la tabla 1. Esto sugiere la presencia de más de un fluoróforo en los gránulos. Este resultado es concordante con el obtenido al analizar la lipofucsina mediante epifluorescencia, dado que al utilizar diferentes longitudes de onda de excitación se obtuvo diferentes emisiones de fluorescencia.

Longitud de onda excitación	Longitud de onda de emisión		
	Medio	Máximos	Hombros
364	suspensión	525	570-615-633
364	sólido	570	525-615-633
488	sólido	580-670-735	
488 (<i>Octodon degus</i>)	sólido	580-650-735	

Tabla 2. Emisión de fluorescencia de lipofucsina humana y de *Octodon degus* purificada mediante gradientes discontinuos de sacarosa. Las muestras se midieron en suspensión y directamente como muestra sólida en un accesorio de "front face" del espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50.

Considerando que al excitar a 488 nm la lipofucsina, la emisión de fluorescencia presenta máximos que se desplazan hacia el rojo en relación a resultados previos para fluoróforos derivados de retinoides (A2E) en lipofucsina. La evidencia con que se contaba al inicio de este trabajo de tesis, la cual no ha variado significativamente, no permite demostrar que exista un fluoróforo propio

del sistema de transducción de luz del ojo que emita en este rango. Por esta razón buscamos una propuesta alternativa.

Los estudios conducentes a encontrar fluoróforos responsables de la emisión de fluorescencia en lipofucsina, han considerado el análisis de aquellos que es posible extraer de la fracción de lipofucsina soluble en solventes apolares. Estos fluoróforos corresponden a los derivados de la molécula de retinal y reciben el nombre de fluoróforos bisretinoides derivados de lipofucsina (A2E y metabolitos) (Fishkin *et al.*, 2005).

Uno de los problemas de trabajar con las proteínas de lipofucsina es poder separarlas para su estudio dado que se encuentran en conformaciones diferentes al estado nativo, conformando agregados y covalentemente entrecruzadas (Jung *et al.*, 2010).

En la Figura 63 se observa la vía metabólica de transformación de la molécula de retinal en su forma trans (ATR) hasta su forma dimérica (ATR dímero y A2E).

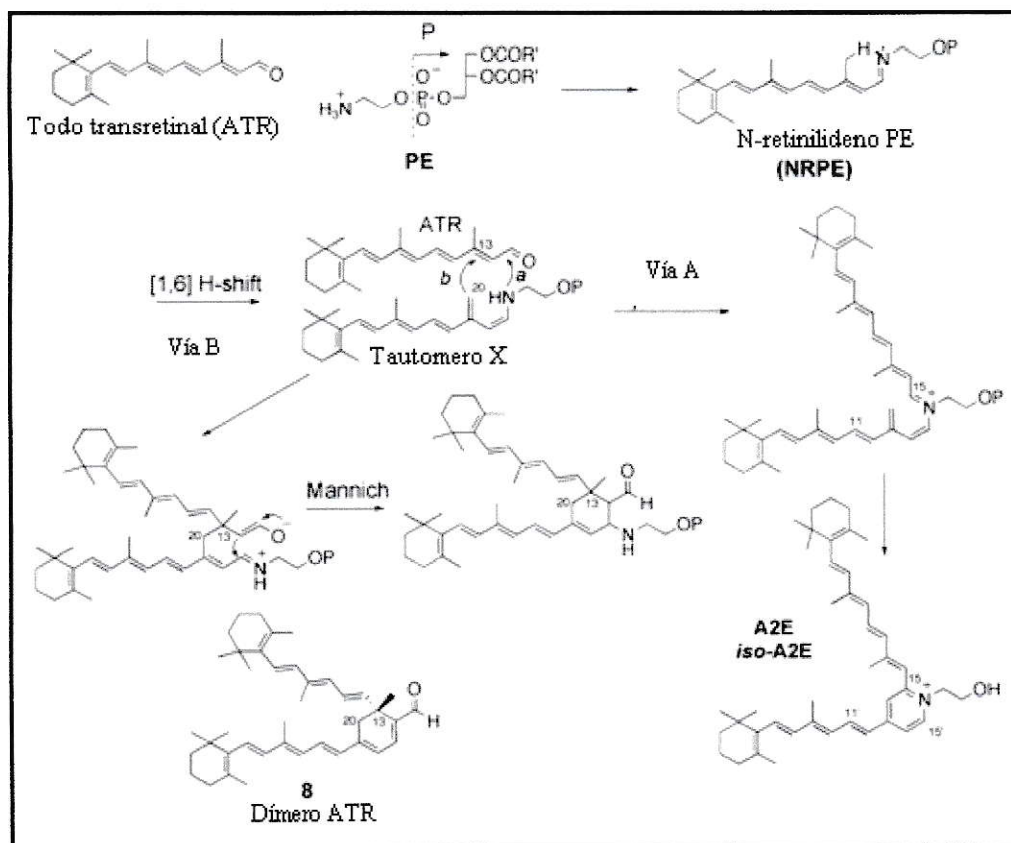


Figura 63. Vías metabólicas del fluoróforo todo-trans-retinal (Fishkin *et al.*, 2005).

En la figura 64 se muestran los retinoides derivados del A2E que han sido propuestos como fluoróforos candidatos responsables de la fluorescencia de la lipofucsina.

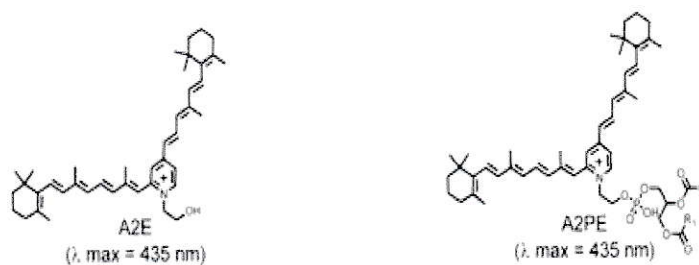


Figura 64. Estructura química y absorbancia máxima de fluoróforos retinales extraídos de lipofucsina (Bui *et al.*, 2006).

Estos fluoróforos se han caracterizado por medio de sus propiedades fluorescentes siendo excitados en el rango de los 488 nm, sin embargo, su comportamiento de emisión de fluorescencia no coincide con nuestros resultados (Figura 65).

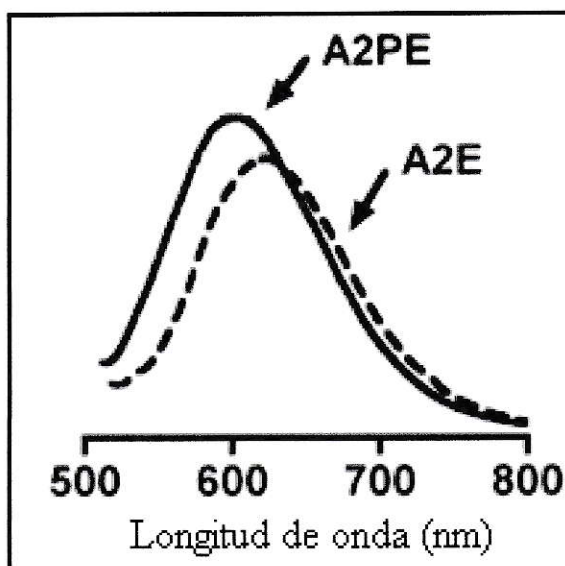


Figura 65. Espectro de emisión de fluorescencia de A2E y A2PE registrados al excitar a 488 nm (Sparrow *et al.*, 2010).

En un reciente artículo se confirma que al excitar a 488 nm estos fluoróforos su emisión de fluorescencia no es similar a la de lipofucsina (Sparrow *et al.*, 2010). A partir de estos resultados se propuso que alguna de las proteínas de la lipofucsina pudiese fluorecer al excitar a 488 nm, debido a que las lipofucsinas están compuestas por un alto número de proteínas que se pueden encontrar proteínas oxidadas y entrecruzadas y por lípidos, oligosacaridos y metales

(Jung *et al.*, 2010) y se sabe que algunas proteínas en estas condiciones son capaces de fluorecer (Schutt *et al.*, 2002; Warburton *et al.*, 2005; Warburton *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008).

Para probar esta hipótesis, en un primer paso se separó las proteínas presentes en las lipofuscinas del RPE.

II. 5. Determinación de las proteínas presentes en lipofucsina de RPE.

Los gránulos de lipofucsina se colectaron por centrifugación, se secaron por centrifugación en un concentrador evaporador y se pesaron en un microbalanza para determinar la masa total de los gránulos de lipofucsina. La proteína se cuantificó solubilizando 380 μg de lipofucsina (alrededor de 150 μg de proteína de lipofucsina) en 30 μl de 1% (w/v) SDS y se cuantificó la concentración de proteínas con el método de Bradford (fluctuó entre 100-300 mg/ml). Para determinar la naturaleza de las proteínas que componen los gránulos de lipofucsina, estas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo a su masa molecular (Figura 66 y 67).

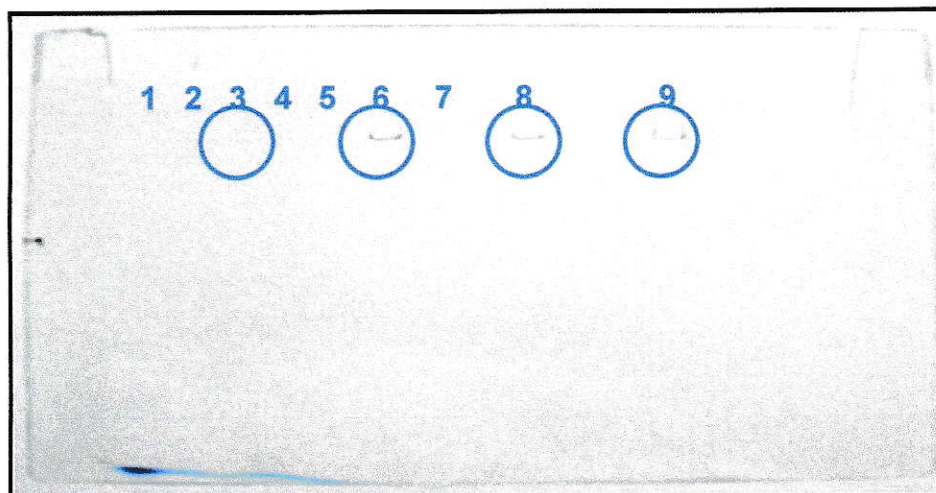


Figura 66. SDS-PAGE de gránulos de lipofuscina solubilizados de RPE humano en un gel de poliacrilamida 4-12%, sin teñir.

Carriles: 1: masa molecular (estándar), 2: sobrenadante de la centrifugación a 60 x g, 3: precipitado a 60 x g, 4 y 5: sobrenadante 6000 x g, 6 y 7: precipitado a 6000 x g, 8: banda melanolipofuscina L2 108000 x g, 9: banda lipofuscina L1 108000 x g, (se indica con círculos azules la banda de los gránulos).

En la Figura 66 se observa que los gránulos de lipofuscina no se logran solubilizar completamente y que parte de ellos no entran al gel como se observa en los círculos azules, este resultado es concordante con estudios realizados en agregados de proteína y membranas como los encontrados en el cristalino humano (cataratas) en donde a pesar de tratamientos químicos como solventes (cloroformo/metanol) y detergentes (tritón, ASB-14, sales biliares) y medios físicos (sonicación), no es posible separarlos completamente en sus constituyentes.

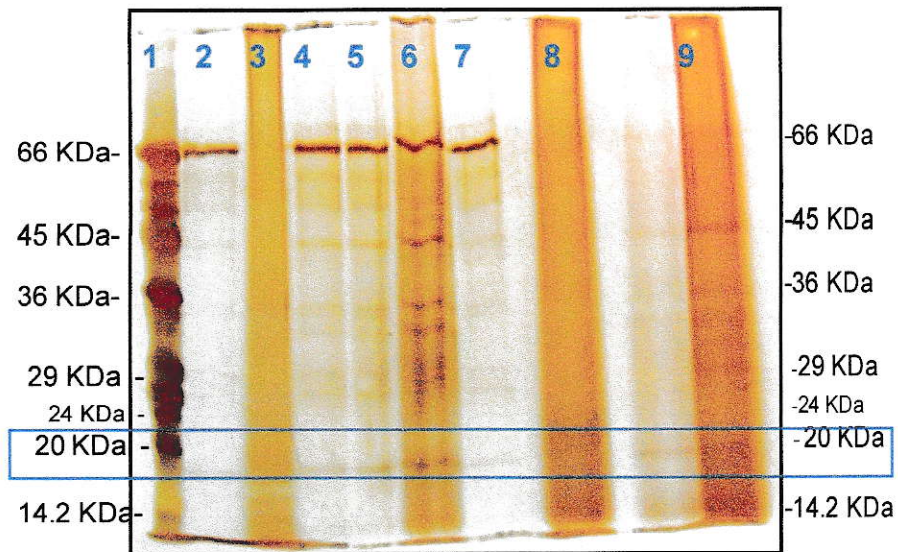


Figura 67. SDS-PAGE de gránulos de lipofusina solubilizados de epitelio pigmentario humano en un gel de poliacrilamida 4-12%, teñido con plata.

Carriles: 1: masa molecular (estándar), 2: sobrenadante de la centrifugación a 60 x g, 3: precipitado a 60 x g, 4 y 5: sobrenadante 6000 x g, 6 y 7: precipitado a 6000 x g, 8: banda melanolipofusina L2 108000 x g, 9: banda lipofusina L1 108000 x g, destaca proteína de 20 kDa presente en casi todos los carriles (rectángulo azul).

En la figura 67 carril 9 se observa que los gránulos de lipofusina están compuestos por un grupo de proteínas, donde destaca una banda de alrededor de 20 kDa de masa molecular. Esta banda puede corresponder a Alfa cristalina, pues al separar por SDS-PAGE y caracterizar las bandas presentes por espectrometría de masas se encontró que una proteína de masa similar corresponde a Alfa cristalina (Schutt *et al.*, 2002; Warburton *et al.*, 2005).

Detección de Alfa cristalina en lipofucsina de epitelio pigmentario retinal humano, ARPE- 19 y *Octodon degus*

Se hizo “western blot” con un anticuerpo anti Alfa cristalina a partir de los SDS-PAGE de una muestra de lipofucsina humana, *Octodon degus* y ARPE-19 (Figura 68).

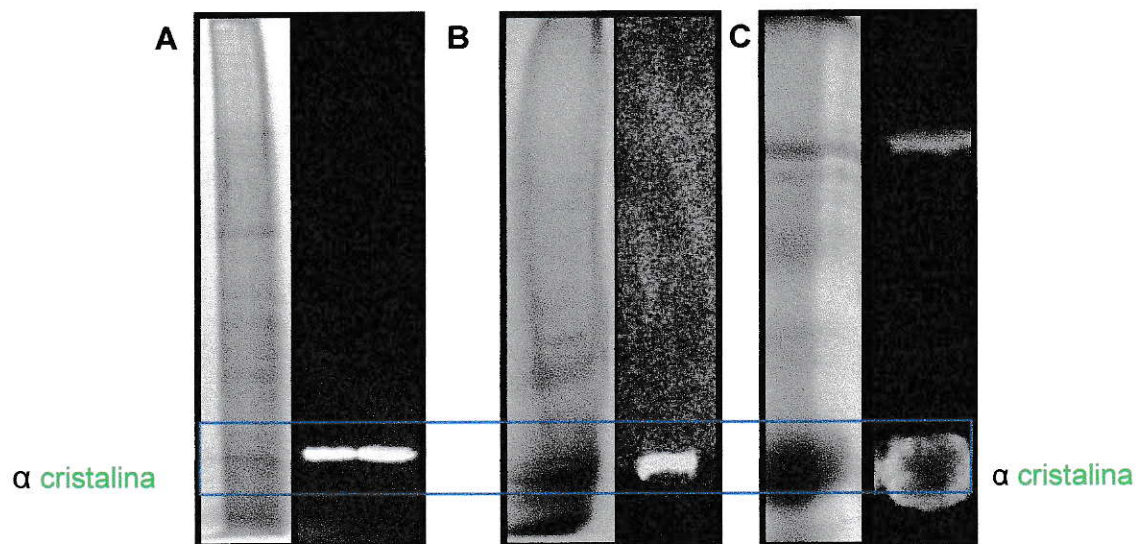


Figura 68. Western blot de lipofucsina con anticuerpo anti Alfa cristalina.

A la izquierda de cada panel se muestra el SDS-PAGE y a la derecha el western blot correspondiente. A. lipofucsina humana. B. lipofucsina de ARPE-19 y C. lipofucsina de *Octodon degus*.

Se observa que existe un alto número de proteínas presentes en lipofucsina y que el anticuerpo anti Alfa cristalina genera una marca que está presente en las lipofucsinas de los tres sistemas analizados, donde esta proteína es una de las de mayor concentración dentro de las proteínas que componen la lipofucsina, cabe señalar que la muestra de *Octodon degus* contenía una mayor concentración, como se aprecia en el gel y por esta razón se observa una banda de mayor masa molecular, que está ausente en las otras muestras.

Para determinar que la Alfa cristalina encontrada en el western blot, se encontraba en la lipofucsina se diseñó un experimento de microscopía electrónica de transmisión con un anticuerpo secundario marcado con oro.

Inmunomicroscopía electrónica de transmisión de lipofucsina de epitelio pigmentario retinal humano.

Para determinar si la Alfa cristalina detectada en la lipofucsina utilizada en los experimentos anteriores, se encontraba en los granos de lipofucsina y que no era producto de una copurificación de otros componentes intracelulares o contaminación, se realizó un experimento de microscopía electrónica de transmisión utilizando el mismo anticuerpo utilizado en la figura 68, asociado a un anticuerpo secundario conjugado con oro.

Como se observa en la figura 69 Alfa cristalina aparece en las diversas secciones de cortes ultra finos de lipofucsina. Como se mencionó anteriormente las proteínas presentes en los granos de lipofucsina están principalmente modificadas por lo que el reconocimiento de Alfa cristalina por medio de esta técnica, se hace más difícil y las proteínas que el anticuerpo reconoce deben estar al interior del grano de lipofucsina sin modificaciones que impidan su reconocimiento. Así la aparición de marca con oro es un indicador de la proteína al interior del grano de lipofucsina con sus epitopos intactos. Esto descarta la presencia de Alfa cristalina adherida a los granos o como contaminante del proceso de extracción y purificación desde las células del RPE de la retina del ojo humano.

En esta técnica es importante considerar la fijación de la muestra y la inclusión en resina acrílica y en general el procesamiento de la muestra para lograr obtener los resultados de la figura 69.

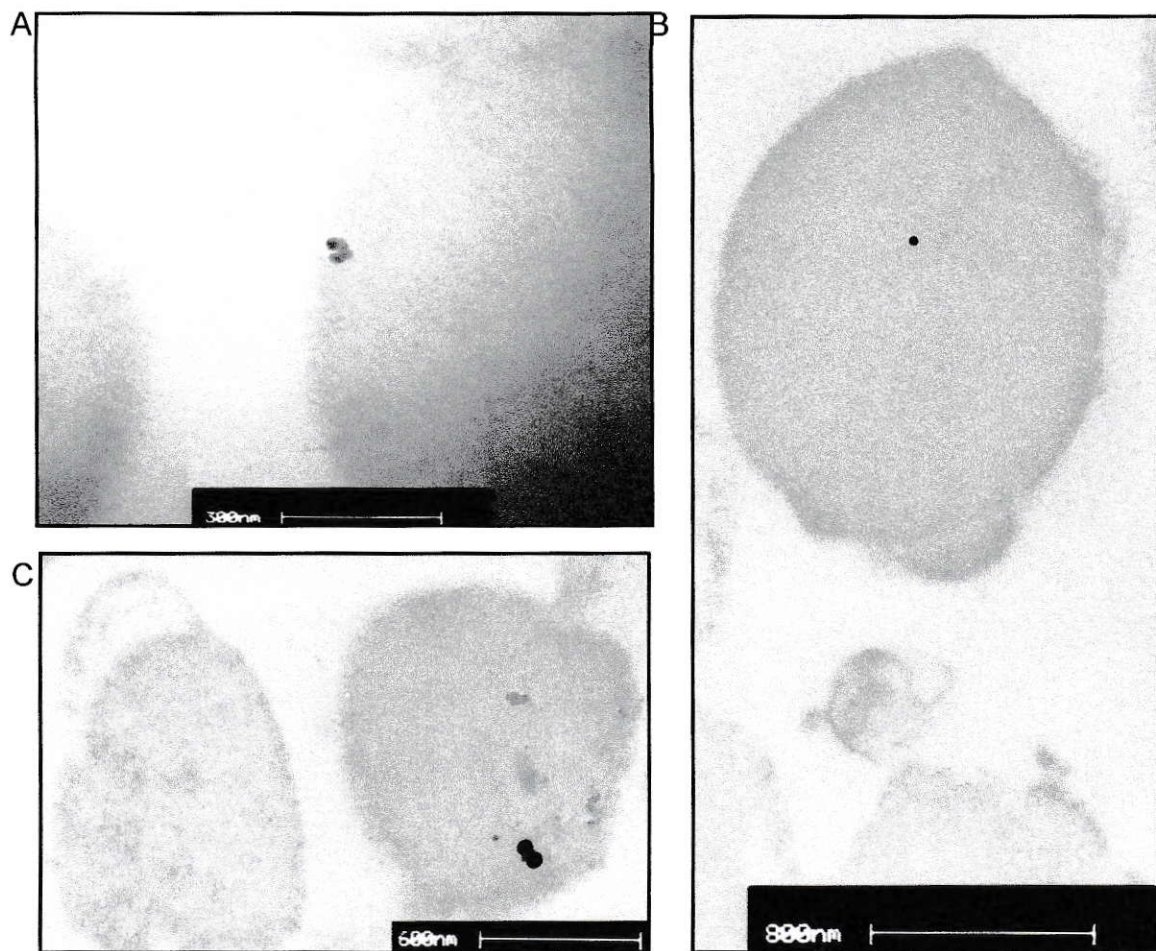


Figura 69. Inmunomicroscopía electrónica de secciones ultra finas de lipofucsina humana.

Anticuerpo monoclonal primario anti Alfa cristalina, anticuerpo secundario conjugado con oro (imagen electrón-densa). A. Barra indica 300 nm. B. Barra indica 600 nm. C. Barra indica 800 nm. Fijación en glutaraldehído e inclusión en resina acrílica. Visualizado en microscopio un electrónico de transmisión Tecnai.

De los campos de microscopia electrónica analizados existe un porcentaje significativo de la muestra marcada con oro.

Espectrometría de masas.

Las muestras de lipofucsina humana sometidas a SDS-PAGE, se analizaron mediante espectrometría de masas para corroborar la presencia de Alfa cristalina.

Los gránulos de lipofucsina se secaron para obtener 500 µg de peso seco y se solubilizaron en amortiguador Laemmli 4X (SDS 3%, Tris 0.17 M pH 6.8, glicerol 35%). Se centrifugaron a 600 x g y se separó el sobrenadante del precipitado, ambas fracciones se cargaron en carriles separados en un gel de poliacrilamida 4-12%. El gel se tiñó mediante el uso de azul de Coomassie coloidal. Cada banda del gel se cortó y se analizó por espectrometría de masas.

En la figura 70 se observa la distribución de las proteínas presentes en lipofucsina humana tanto en el sobrenadante como en el precipitado de lipofucsina.

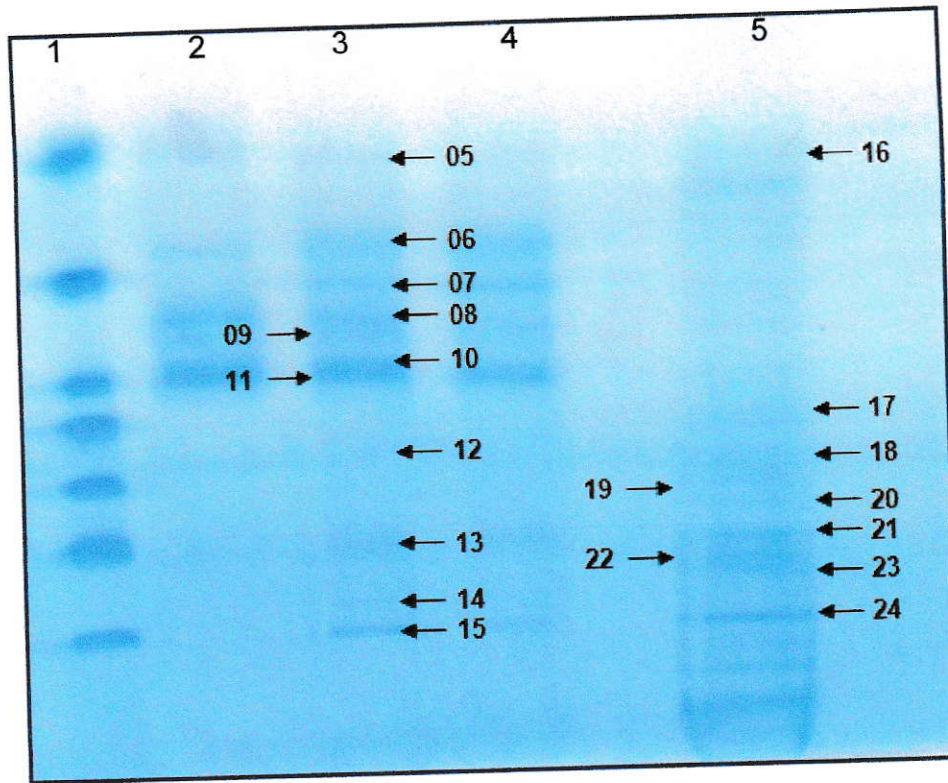


Figura 70. SDS-PAGE de lipofucsina humana solubilizado en amortiguador Laemmli 4X con un gel de poliacrilamida 4-12% teñido con azul de Coomassie.

Carriles: 1: masa molecular (estándar), 2, 3, 4: fracción de lipofucsina soluble (sobrenadante de la centrifugación a 600 x g), 5: precipitado a 600 x g.

El análisis de la espectrometría de masas de las bandas señaladas se hizo con el programa mMass (Strohalm *et al.*, 2008; Strohalm *et al.*). En la figura 71 se muestra un espectro del resultado obtenido para la banda señalada con el número 7 en la figura 70.

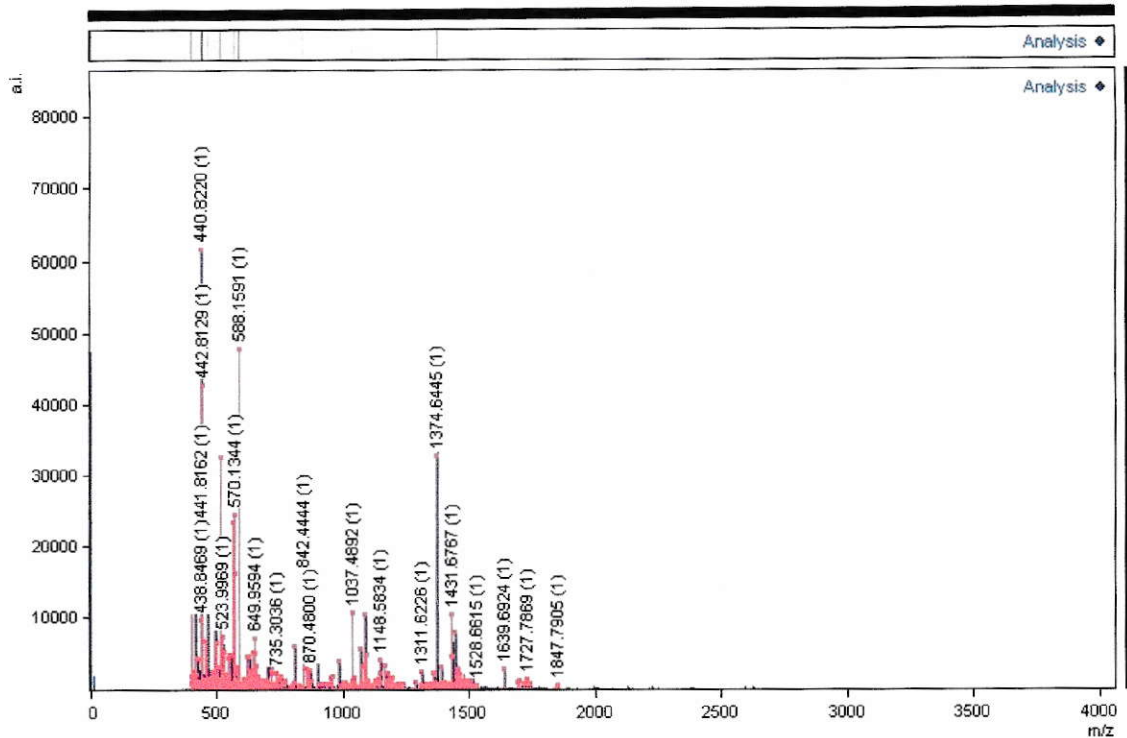


Figura 71. Espectrometría de masas de la banda número 7 del gel SDS-PAGE de lipofucsina humana mostrado en la figura 70.

Los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas para cada banda, se procesaron con el programa mMass, que también se usó para la búsqueda de las proteínas en la base de datos de Mascot.

(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF).

En la figura 72 y 73 se observa el resultado de Mascot para la banda número 7 del gel de la figura 70.

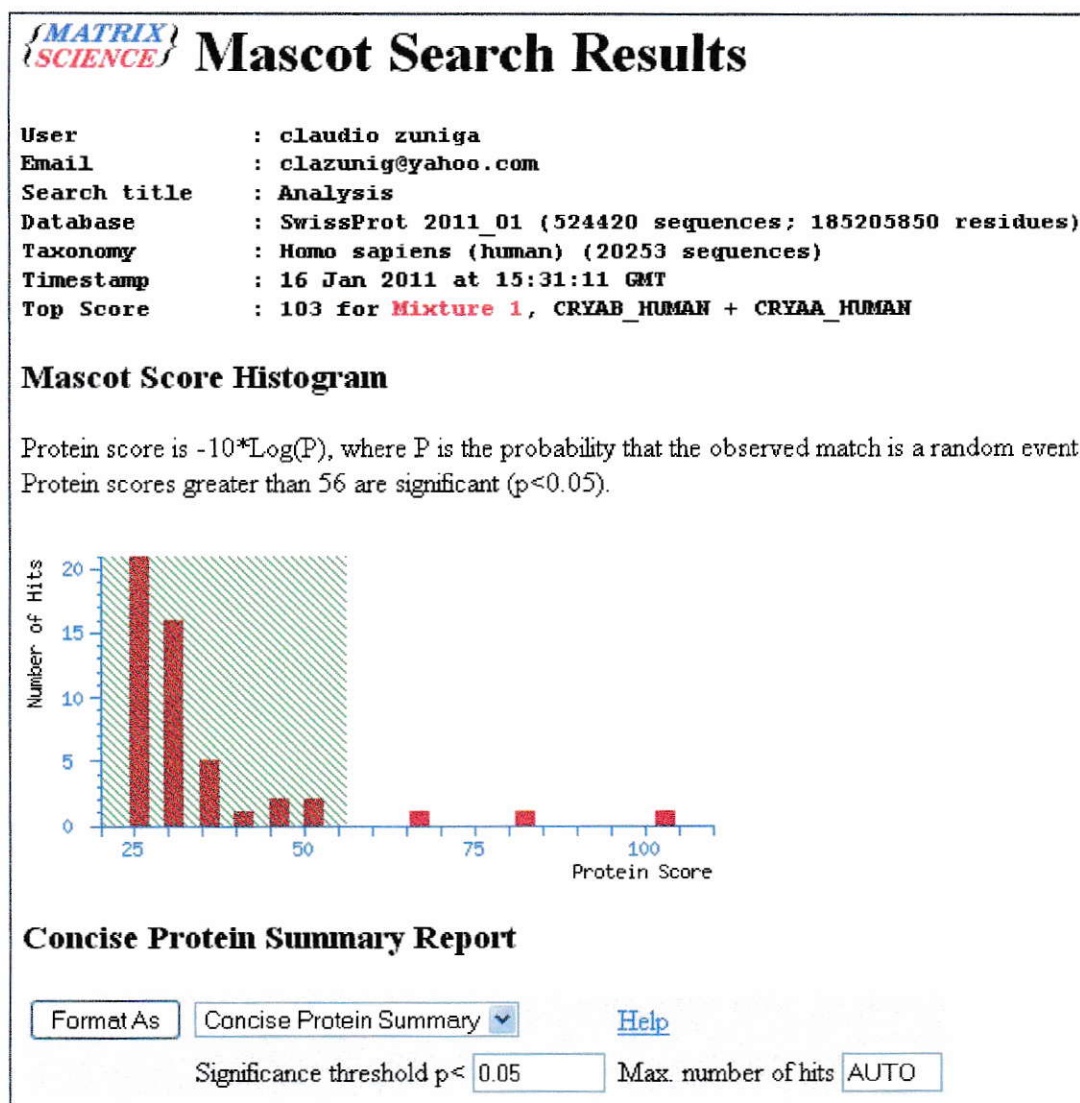


Figura 72. Análisis de Mascot para espectrometría de masas de la banda número 7 del SDS-PAGE de lipofucsina humana.

El análisis de Mascot consideró un nivel 56 de significancia para la muestra analizada. Como se observa en la figura 73 el resultado indica la presencia de

Alfa A cristalina humana con un score de 68 y Alfa B cristalina humana con un score de 84.

1.	Mixture 1	Total score: 103	Expect: 1e-06	Matches: 31
Components (only one family member shown for each component):				
	CRYAB HUMAN	Mass: 20146	Score: 84	Expect: 7.9e-05 Matches: 18
	Alpha-crystallin B chain OS=Homo sapiens GN=CRYAB PE=1 SV=2			
	CRYAA HUMAN	Mass: 19897	Score: 68	Expect: 0.0031 Matches: 14
	Alpha-crystallin A chain OS=Homo sapiens GN=CRYAA PE=1 SV=2			
2.	CRYAB HUMAN	Mass: 20146	Score: 84	Expect: 7.9e-05 Matches: 18
	Alpha-crystallin B chain OS=Homo sapiens GN=CRYAB PE=1 SV=2			
3.	CRYAA HUMAN	Mass: 19897	Score: 68	Expect: 0.0031 Matches: 14
	Alpha-crystallin A chain OS=Homo sapiens GN=CRYAA PE=1 SV=2			
4.	PN6BL HUMAN	Mass: 37346	Score: 50	Expect: 0.19 Matches: 16
	Putative paraneoplastic antigen-like protein 6B-like protein OS=Homo sapiens PE=3 SV=1			
Search Parameters				
Type of search	: Peptide Mass Fingerprint			
Enzyme	: Trypsin			
Mass values	: Monoisotopic			
Protein Mass	: Unrestricted			
Peptide Mass Tolerance	: ± 0.2 Da			
Peptide Charge State	: 1+			
Max Missed Cleavages	: 1			
Number of queries	: 417			
Selected for scoring	: 84			
Mascot: http://www.matrixscience.com/				

Figura 73. Resultado de Análisis de Mascot para espectrometría de masas de la banda número 7 del SDS-PAGE de lipofucsina humana.

Como se desprende de éstos resultados Alfa cristalina humana, está presente en lipofucsina humana tanto en su forma Alfa A y Alfa B cristalina. Estos resultados son coincidentes con lo que se ha reportado para estas proteínas en neuronas (van Rijk *et al.*, 2000).

Capítulo III. Alfa cristalina como proteína autofluorescente.

III. 1. Fluorescencia de cristalino humano y de *Octodon degus*.

Experimentalmente se sabía que el cristalino humano es capaz de fluorecer cuando se excita con longitudes de onda del UV cercano y luz azul (Siik, S. *et al.*, 1999). Esto fue corroborado experimentalmente al aislar los cristalinos de Humano y de *Octodon degus*, y someterlos a luz UV (Figura 74).

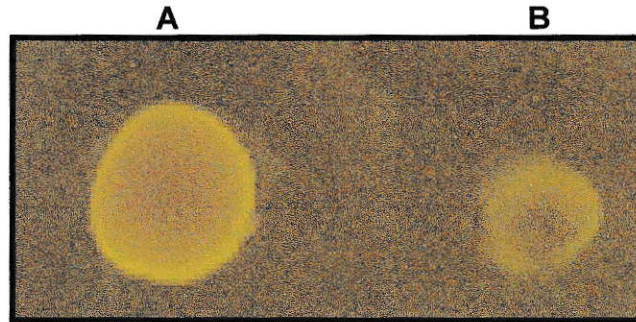


Figura 74. Emisión de autofluorescencia de cristalino humano y cristalino de *Octodon degus*.

A. Humano. B. *Octodon degus*. Longitud de onda de excitación a 360-380 nm y emisión total sobre 400 nm.

Así se observa que tanto en el cristalino humano como en el de *Octodon degus* existe emisión de fluorescencia amarilla - verde al estimularlos con longitud de onda a 360-380 nm

En la Figura 74 el cristalino de ambos individuos está aislado sobre un recipiente de plástico no fluorescente, en ambos cristalinos se aprecia un borde fluorescente nítido que corresponde a la corteza del cristalino. Este se compone mayoritariamente de proteínas Alfa cristalinas, que pueden llegar a ser el 50 % de la masa proteica total de estas células con concentraciones cercanas a 500 mg/ml.

En el cristalino las proteínas Alfa cristalinas han sido estudiadas como responsables de procesos de absorción de radiación, refracción de la luz y como chaperonas moleculares, entre otras funciones.

Para determinar la participación de la corteza y el núcleo del cristalino en la emisión de fluorescencia, se removió su corteza y se suspendió en PBS. Se excitó entre 360-380 nm y se midió la emisión de fluorescencia.

Al suspender la corteza del cristalino las proteínas presentes se mantienen en el interior de las fibras cristalinianas.

El experimento se realizó colocando la corteza del cristalino en PBS, en un recipiente que además contenía al núcleo del cristalino en cada caso, los resultados se muestran en las figura 75 A y 75 B.

Como control de emisión de autofluorescencia, se muestra el recipiente de plástico con PBS sin contenido de cristalinos en las figuras 75 C y 75 D.

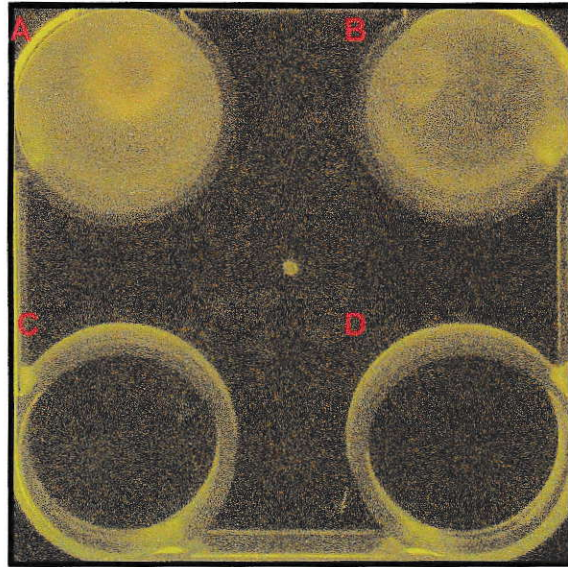


Figura 75. Emisión de autofluorescencia de las cortezas de cristalinos en PBS y núcleos de los cristalinos en suspensión.

A. Cristalino humano. B. Cristalino de *Octodon degus*, C. y D: PBS. Longitud de onda de excitación 360-380 nm, emisión total sobre 400 nm.

Como se observa existe una señal de autofluorescencia que proviene de las partículas de la corteza que se han suspendido (Figura 75) y del núcleo del cristalino.

Este comportamiento se puede explicar por la capacidad del cristalino de absorber la radiación ultravioleta y azul lo que le permite ser un filtro natural para proteger a la retina, concomitantemente a esta absorción de longitudes de onda corta y de alta energía, éstas se transforman en emisión de fluorescencia de longitudes de ondas más largas y de menor energía por parte de las estructuras del cristalino

Dado la alta concentración de Alfa cristalina en el cristalino, su emisión de autofluorescencia y considerando nuestros resultados de autofluorescencia de lipofucsina (en donde los espectros de emisión de fluorescencia de los fluoróforos conocidos no calzan con los obtenidos experimentalmente) y que hemos encontrado Alfa cristalina en la lipofucsina estudiada, una posible explicación a la emisión de fluorescencia frente a la excitación de la lipofucsina a 488 nm, era que esta proteína se comportara como un fluoróforo responsable de parte de la emisión de autofluorescencia del cristalino, ya que con anterioridad se conocían proteínas capaces de fluorecer y que además fuera esta proteína un fluoróforo presente en lipofucsina.

Para abordar el estudio de la presencia de alfa cristalina como responsable de la autofluorescencia de la lipofucsina en el epitelio pigmentario retinal, se diseñó experimentos basados en la demostración de la autofluorescencia de Alfa cristalina no atribuible a una sonda intrínseca conocida (por ej. residuos aromáticos).

Con el objeto demostrar que Alfa cristalina es capaz de fluorecer al excitarla a 488 nm y para poder estudiarla, se solubilizó la corteza del cristalino, en donde se encuentra en abundante cantidad (alrededor de 150 mg/ml), y se purificó mediante el uso de cromatografía y separación por tamaño. Se estableció su caracterización espectral.

Para evaluar si la proteína Alfa cristalina purificada es capaz de generar autofluorescencia se realizó un experimento de emisión de autofluorescencia. Posteriormente se estudió un posible mecanismo que explique la presencia de autofluorescencia de Alfa cristalina considerando su estructura.

III.2. Autofluorescencia de Alfa cristalina.

Con la idea de evaluar si la fluorescencia de la corteza del cristalino al excitar a 488 nm, proviene de Alfa cristalina que es la proteína principal, se evaluaron las propiedades fluorescentes de Alfa cristalina bovina (Stressgen) (Figura 76).

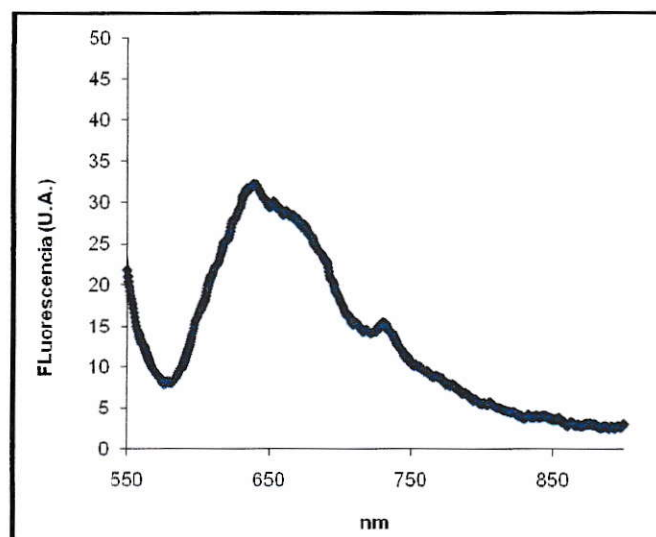


Figura 76. Espectro de emisión de autofluorescencia de Alfa cristalina bovina (0.5 mg/ml) registrada entre 550 y 900 nm, con longitud de onda de excitación a 488 nm, a 25° C.

Los máximos de emisión son 642, 735 y hombro en 670 nm. Como se observa en la Figura 76, Alfa cristalina es capaz de autofluorecer al ser estimulada a 488 nm.

III.3. Purificación de Alfa cristalina humana.

Para obtener la proteína en su condición natural es que se aisló alfa cristalina desde la fracción soluble de la centrifugación diferencial de la corteza del cristalino humano, la cual se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Figura 77).

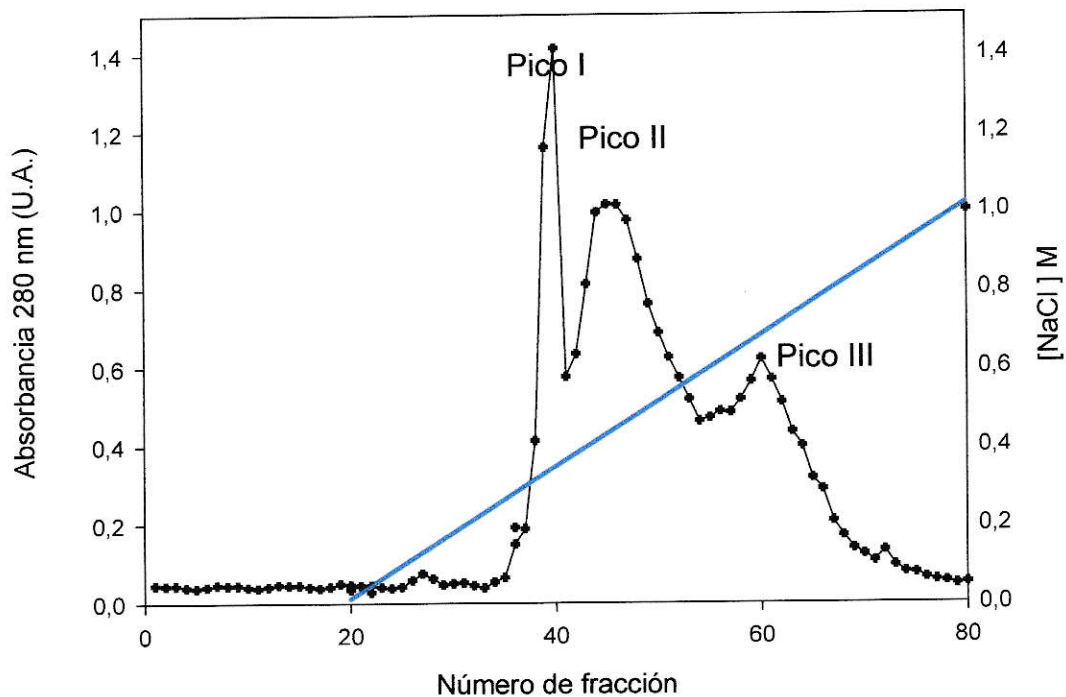


Figura 77. Cromatograma de purificación de Alfa cristalina humana.

La proteína se inyectó en la columna, y se colectó las fracciones que fluyeron en volúmenes de 1 ml. La absorbancia se midió a 280 nm. La línea azul corresponde a la curva del gradiente de NaCl (0 a 1 M) que permite eluir la muestra unida a la resina de intercambio iónico. Se muestran los picos de elución I, II y III.

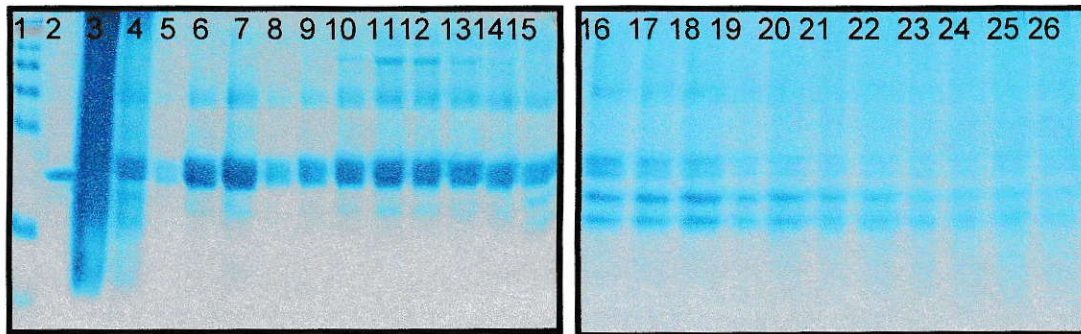


Figura 78. Electroforesis SDS-PAGE de las etapa de la cromatografía de intercambio aniónico de Alfa cristalina.

Carril 1: Estándar de masa molecular. **Carril 2:** Estándar de alfa cristalina, **Carril 3:** corteza de cristalino **Carril 4:** carga total columna. Muestras escogidas a partir de los picos obtenidos en el cromatograma. **Carril 5-8:** pico I, **Carril 9-15:** pico II, **Carril 16-26:** pico III.

El resultado del SDS- PAGE del cromatograma de la columna de intercambio aniónico, se evaluó por western blot utilizando un anticuerpo anti Alfa cristalina (Stressgen) (Figura 79) para identificar las bandas obtenidas en la Figura 78 de las fracciones del cromatograma.

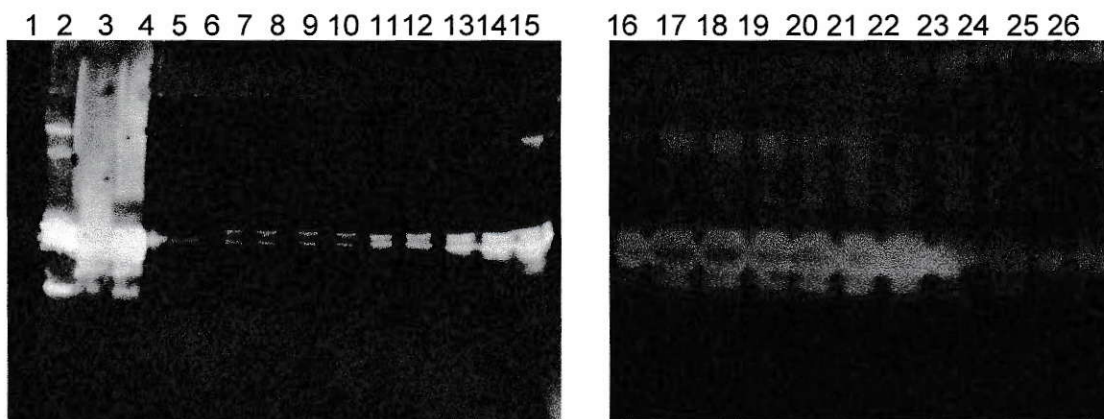


Figura 79. Western blot de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones del cromatograma de purificación de Alfa cristalina humana.

Como se observa en las Figuras 78 y 79, alrededor de los 20 kDa existen dos bandas que se distinguen mejor en la Figura 77, estas corresponden a Alfa A y Alfa B cristalina, dado que el anticuerpo es capaz de reconocer las dos isoformas de la proteína.

Los picos obtenidos se filtraron en poro de 0,2 μm y se dializó la proteína contra PBS toda la noche a 4° C.

Se tomo una muestra de la proteína purificada en el pico I y se obtuvo el SDS-PAGE de la Figura 80.

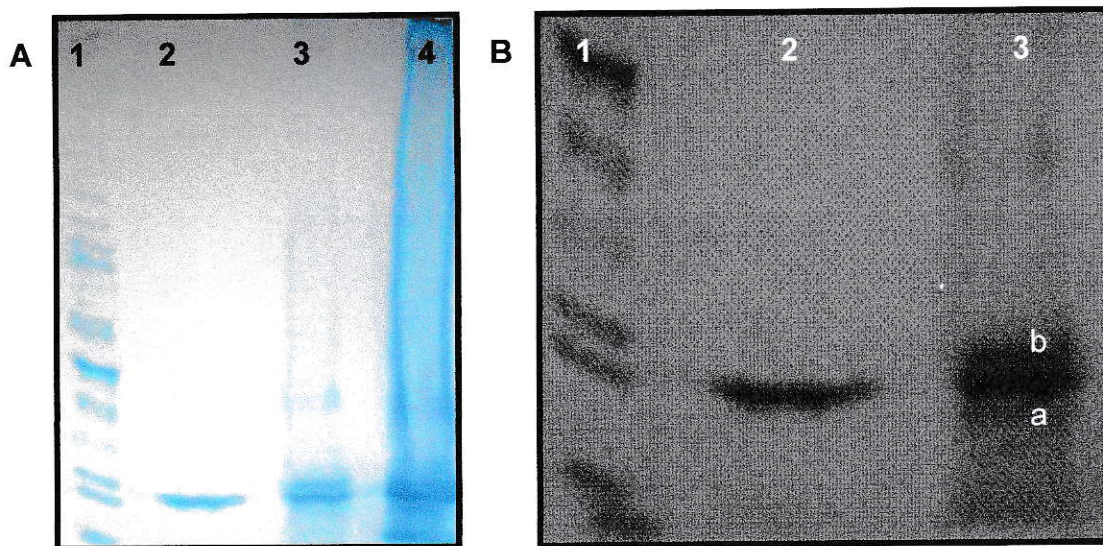


Figura 80. A: SDS-PAGE de Alfa cristalina purificada desde corteza de cristalinos humanos.

A Carriles: 1 Estándar PM, 2 Estándar Alfa cristalina bovina (1mg/ml), 3 Proteína purificada (1mg/ml), 4 Proteína purificada (6 mg/ml). B: magnificación digital de A para obtener mejor resolución entre las dos bandas.

Al evaluar los datos del SDS-PAGE de la Figura 81 se calculó las masas moleculares de las proteínas encontradas en la Figura 80 B carril 3.

De acuerdo a este gráfico las bandas a y b del panel B de la Figura 80 corresponden a masas moleculares de 19,9 kDa en la banda a, que es compatible con Alfa A cristalina e igual a 19,9 kDa y la banda b: 20,5 kDa es compatible con Alfa B cristalina es equivalente a 20,1 KDa.

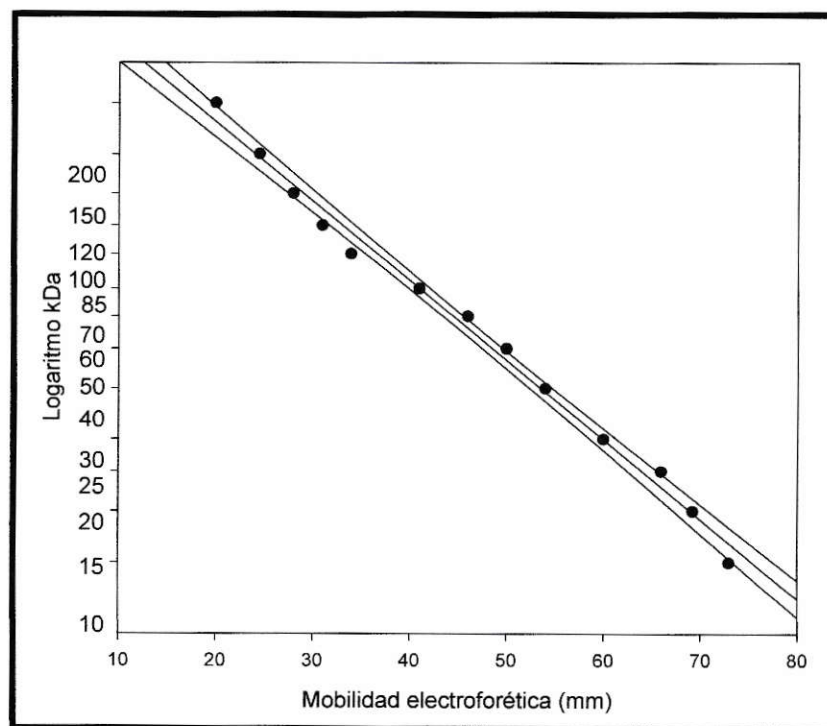


Figura 81. Gráfico de estimación de masa molecular relativa según movilidad electroforética relativa en SDS-PAGE.

III. 4. Alfa cristalina como chaperona molecular.

Alfa cristalina es una proteína que fue descrita como chaperona molecular en ensayos “in vitro” de supresión de agregación para beta y gamma cristalinas, alcohol deshidrogenada, fosfogluco-isomerasa, glutatión-S-transferasa, enolasa, aldolasa, lactato deshidrogenasa, citrato sintetasa y anhidrasa carbónica (Horwitz, 1992). Posteriormente se han adicionado a esta lista múltiples proteínas. Para comprobar la actividad de chaperona molecular descrita para Alfa cristalina, se realizó un ensayo de agregación de insulina al reducir sus puentes disulfuro agregando 20 mM de DTT, a 37 ° C (Figura 82).

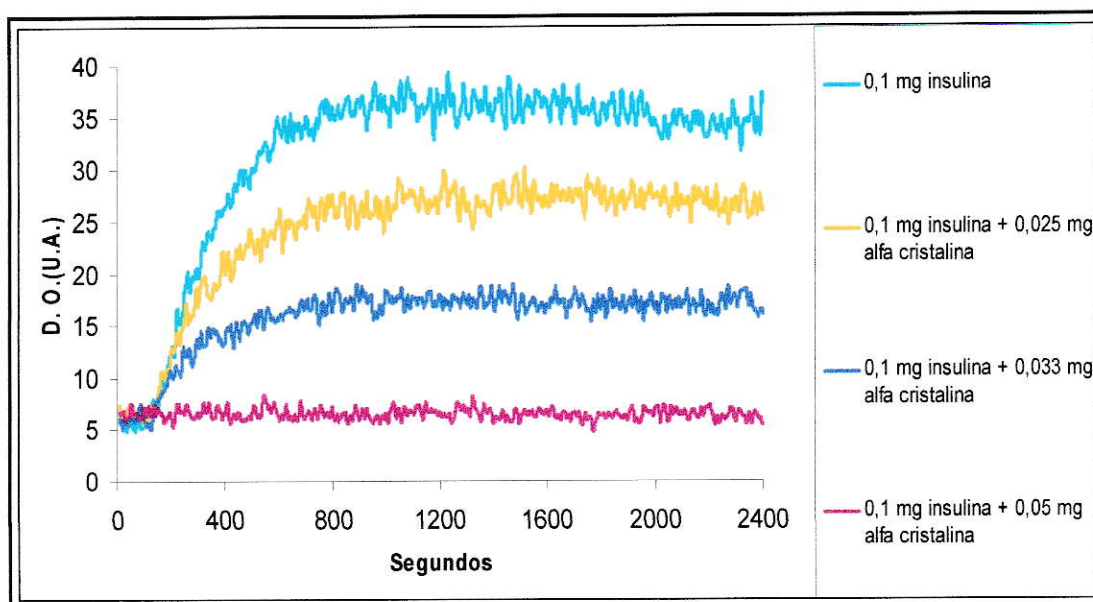


Figura 82. Agregación de insulina reducida a 37° C en presencia y ausencia de Alfa cristalina.

A tiempo 0 se adicionó a la solución descrita en cada curva 20 mM de DTT. La dispersión óptica fue medida a 360 nm con un paso óptico de 1 mm.

Este experimento demuestra que la Alfa cristalina purificada presenta la actividad funcional descrita ampliamente en la literatura, lo que indirectamente demuestra que el método de purificación no está modificando la estructura de la proteína.

III.5. Estudios espectroscópicos de Alfa cristalina humana.

Una proteína incluye una estructura tridimensional particular en el espacio. Esto implica la existencia de una estructura definida que es estable en un medio en particular como resultado de su contenido energético. Este hecho sumado a la existencia de una gran diversidad de estructuras tridimensionales observadas en la naturaleza, sugiere la idea de que existe una especie de propensión interna dada por la secuencia peptídica y sus interacciones tridimensionales. Existe un consenso actualmente en torno a esta idea.

La propensión interna de la proteína hacia una conformación estable y más probable, puede ser explicada desde diferentes aproximaciones, ya sea biológica, física o química. Probablemente, la herramienta más sólida para entender el proceso de plegamiento proviene de la termodinámica. De esta forma, es posible plantear que la secuencia definida de la proteína es la fuente del camino termodinámico más probable que sigue el proceso de plegamiento, y la conformación preferente final es el ensamble estructural más estable y que

probablemente posee el menor valor posible para la función de estado G respecto del valor asociado al estado desnaturalado. Esto sin duda tiene enormes implicancias no solo desde un punto de vista fisicoquímico sino también biológico, pues la función de las proteínas en cualquier organismo está directamente relacionada con su estructura, y cualquier error durante ese proceso puede ocasionar perturbaciones en la estabilidad metabólica de una célula por ejemplo y la selección natural prescindirá de esta estructura. Todo esto lleva consigo a la idea de que la forma más apropiada de representar a una proteína es precisamente en su estructura más estable, el estado nativo.



El equilibrio mostrado en la ecuación 1 corresponde a la reacción de plegamiento de dos estados de una proteína, donde el estado nativo (N) es termodinámicamente el más estable, de allí que en el equilibrio la población de proteína nativa será mucho mayor que la desnaturalada, en un medio apropiado generalmente acuoso. Esta representación química es la versión más simplificada del proceso, y como tal constituye la excepción en el plegamiento, pues en general existe un gran número de caminos alternativos que agregan complejidad a este proceso.

Así mediante el estudio del mecanismo de desnaturalación de Alfa Cristalina se propone las bases para comenzar a estudiar el mecanismo de la emisión de fluorescencia intrínseca de esta proteína al ser excitada con 488 nm de longitud de onda.

Autofluorescencia de Alfa cristalina humana es dependiente de la concentración.

Se evaluó la emisión de fluorescencia de Alfa cristalina humana purificada, al excitar a 488 nm a distintas concentraciones. La concentración varió entre 5 a 0,04 mg/ml (Figura 83).

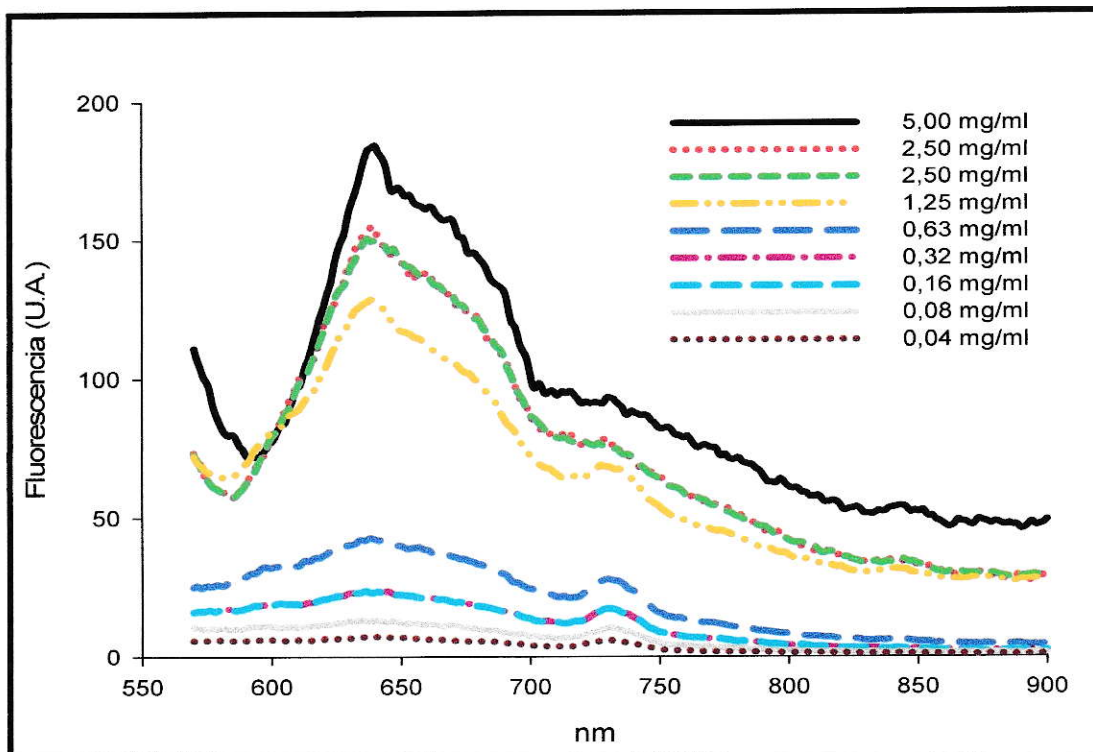


Figura 83. Efecto de la concentración de Alfa cristalina en la emisión de autofluorescencia al estimular con 488 nm.

Alfa cristalina en solución con amortiguador PBS, pH: 7,5, en baño termo regulado a 25° C.

Como muestra la figura 83, Alfa cristalina es capaz de generar autofluorescencia al ser excitada a 488 nm, esta parece ser dependiente de la concentración. Concomitantemente se observa que la dispersión luminosa también es dependiente de la concentración (Figura 84).

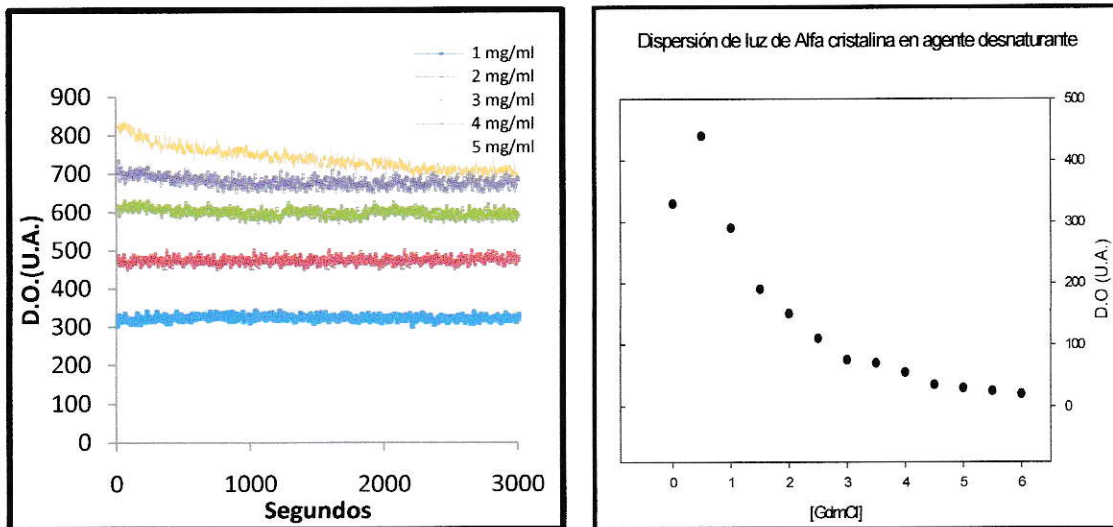


Figura 84. Dispersión de luz de Alfa cristalina humana a distinta concentración.

Variación de la dispersión de luz medida a 350 nm, en una solución de PBS que contenía Alfa cristalina en concentraciones entre 1-5 mg/ml, PH 7,5, a 25 ° C en baño termo regulado.

En la figura 85 se describe la variación de la dispersión luminosa de una solución de Alfa cristalina en PBS, al utilizar un agente desnaturalante como Cloruro de Guanidinio (GdmCl).

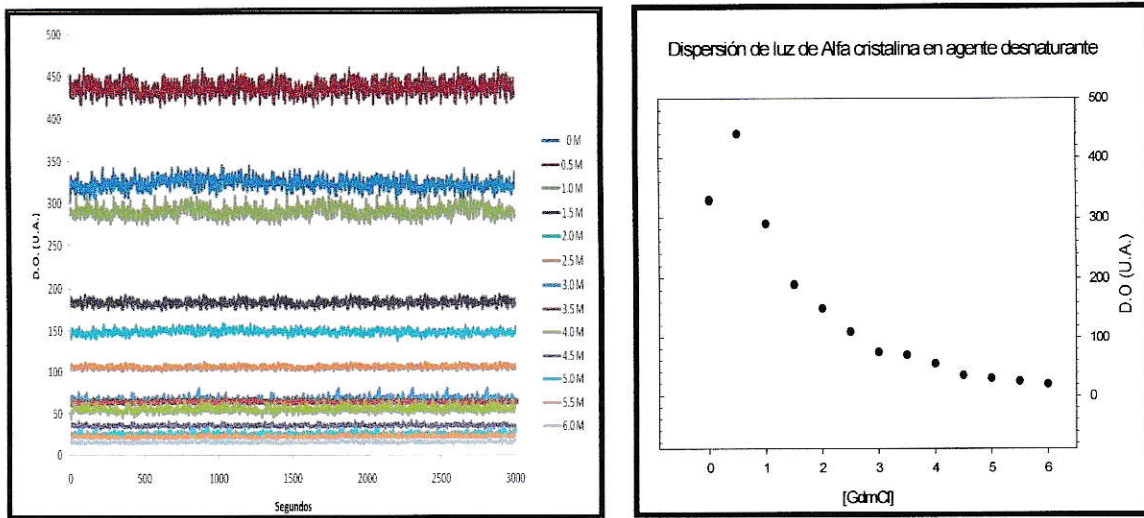


Figura 85. Dispersión de luz de Alfa cristalina humana en presencia de agente desnaturalante en distintas concentraciones.

Variación de la dispersión de luz medida a 350 nm, en una solución de PBS que contenía Alfa cristalina 1 mg/ml, en GdmCl en concentraciones entre 0-6 M, PH: 7,5, en baño termo regulado a 25 ° C.

Según estos últimos resultados la dispersión de luz de Alfa cristalina es dependiente de la concentración y de la estructura de esta proteína. En concentraciones bajas del agente desnaturalante, se observa un aumento de la dispersión de luz en relación al estado nativo.

En un alta concentración de la proteína la dispersión luminosa es mayor al inicio de la medición y va disminuyendo hasta estabilizarse hacia el final de la medición.

Estructura de Alfa cristalina y emisión de fluorescencia.

De acuerdo a los datos de la figura 80 Alfa cristalina autofluoresce al ser excitada a 488 nm, para evaluar si la estructura de esta proteína tiene relación con esta observación, desnaturamos la estructura de esta proteína con diferentes concentraciones de agente desnaturalante en una solución de PBS y registramos la emisión de fluorescencia en las distintas condiciones.

En la figura 86 se observa el efecto de desnaturación de Alfa cristalina sobre la emisión de fluorescencia.

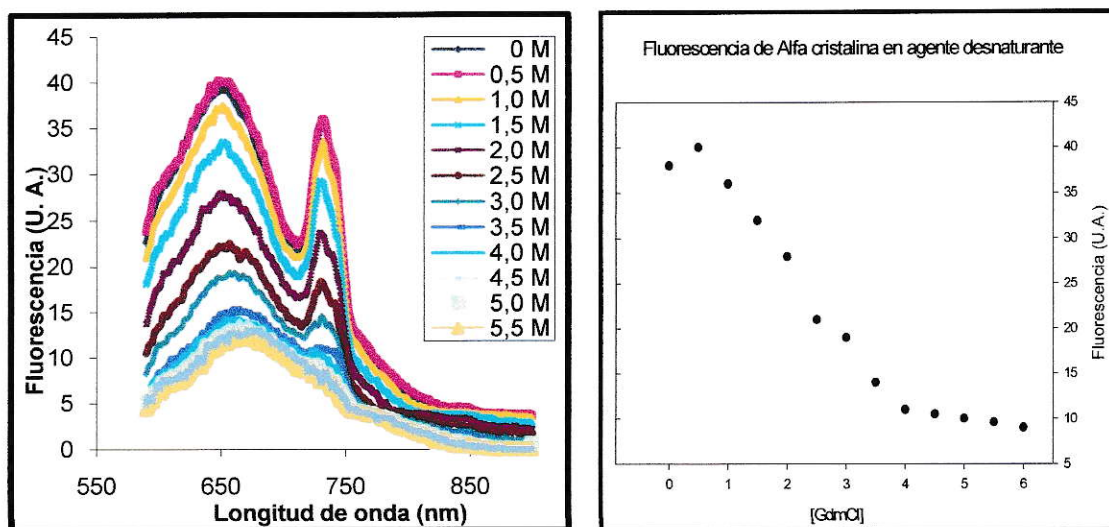


Figura 86. Efecto de la desnaturación con GdmCl de Alfa cristalina sobre la emisión de fluorescencia con excitación a 488 nm.

Alfa cristalina (1 mg/ml), en PBS, pH: 7,5, GdmCl en concentraciones entre 0-6 M en baño termo regulado a 25° C.

Como se observa en la figura 86, la autofluorescencia de Alfa cristalina al estimularla con luz azul en 488 nm depende del estado nativo. El gráfico de la Figura 86 muestra dos picos en el espectro de emisión, estos se analizaron y se detalló su comportamiento en presencia del agente desnaturalante en las figuras 87 y 88 respectivamente.

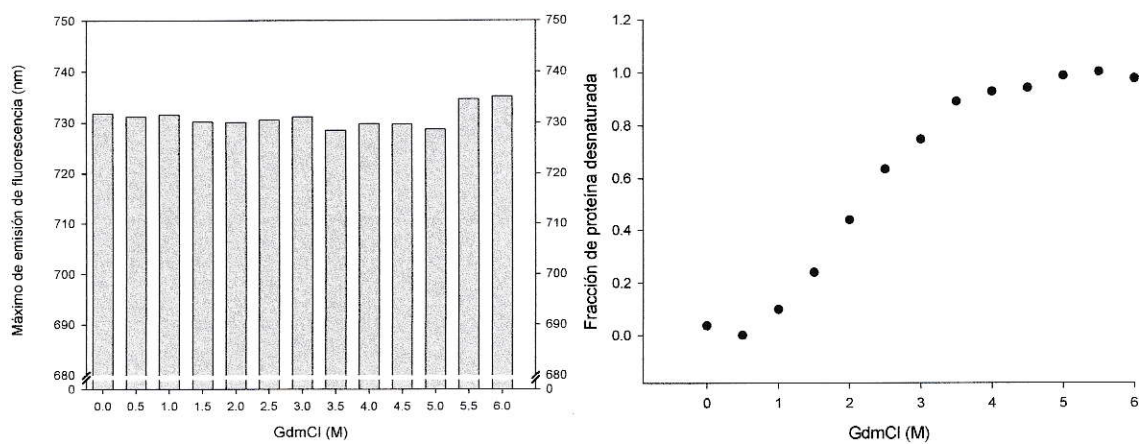


Figura 87. Primer pico de emisión de Alfa cristalina desnaturalada en GdmCl, excitación a 488 nm.

A. Emisión de Alfa cristalina en GdmCl. B. Emisión de Alfa cristalina expresado como fracción del estado nativo. Solución de Alfa cristalina (1mg/ml) en PBS, pH: 7,5. GdmCl en concentraciones entre 0-6 M, en baño termo regulado a 25° C.

En esta figura se observa un apagamiento y corrimiento hacia longitud de onda roja del primer pico de emisión y se encuentra que el 50 % de la proteína se encuentra desnaturalada en el rango de 2,13 M de GdmCl.

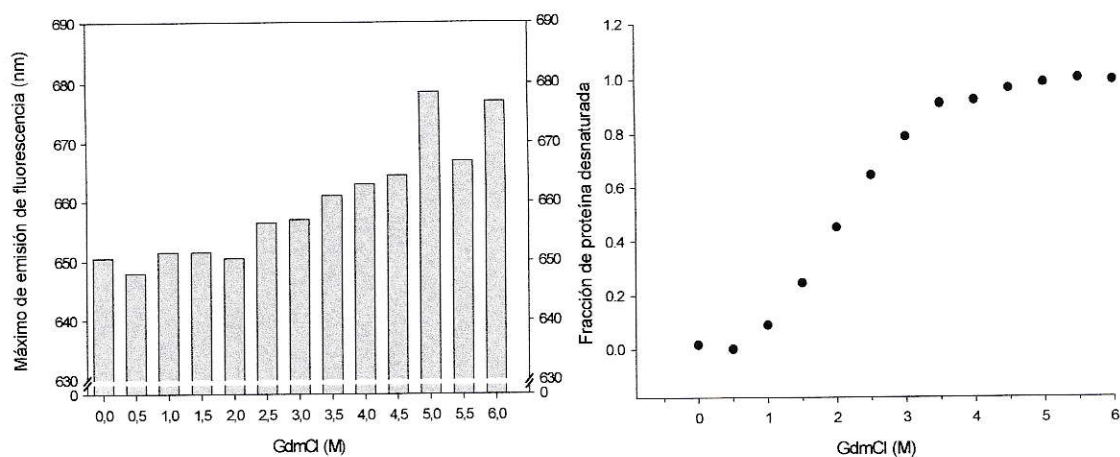


Figura 88. Segundo pico de emisión de Alfa cristalina desnaturalada en GdmCl, excitación a 488 nm.

A. Emisión de Alfa cristalina en GdmCl. B. Emisión de Alfa cristalina expresado como fracción del estado nativo. Solución de Alfa cristalina (1mg/ml) en PBS, pH: 7,5. GdmCl en concentraciones entre 0-6 M, en baño termo regulado a 25° C.

En esta figura se observa un apagamiento del segundo pico de emisión, sin observarse corrimiento hacia longitud de onda roja y se encuentra que el 50 % de la proteína se encuentra desnaturalada en el rango de 2,05 M de GdmCl.

En la figura 83 se relacionó la autofluorescencia con la concentración de la proteína y se demostró que ella aumenta al aumentar la concentración de la misma.

En la figura 84 se constata que el aumento en la concentración de la proteína trae consigo un aumento en la dispersión de luz y que a una concentración fija de la proteína es posible disminuir la dispersión de luz agregando agente desnaturalante (Figura 85).

De acuerdo a estos resultados Alfa cristalina en altas concentraciones puede estar generando agregados, evaluados por el aumento de dispersión luminosa, que aumentan la autofluorescencia de esta proteína.

Se pudo apreciar como disminuye la emisión de autofluorescencia a medida que se aumenta la concentración del agente desnaturalante. Probablemente los agregados de la proteína se disocian induciendo una disminución de la dispersión de luz de excitación (Figura 85). Asimismo el área del pico de emisión disminuye concomitantemente (Figura 86).

Para respaldar la idea de que la agregación de Alfa cristalina favorece la emisión de autofluorescencia se evaluó por microscopía de epifluorescencia, agregados de Alfa cristalina en solución (Figura 89). Para realizar este experimento se centrifugó a 100.000 x g por 10 min, una solución de 5 mg/ml de Alfa cristalina en PBS y se observó el precipitado encontrado.



Figura 89. Microscopía de epifluorescencia de emisión de autofluorescencia de agregados de Alfa cristalina.

Alfa cristalina en solución (5 mg/ml) en PBS, pH: 7,5. Excitación a 470-490 nm, filtro de emisión abierto sobre 515 nm.

Esta figura demuestra la emisión de autofluorescencia por parte del precipitado de una solución de Alfa cristalina. Este resultado plantea que la agregación de Alfa cristalina genera autofluorescencia.

Para conocer evaluar el cambio en la estructura de Alfa cristalina desnaturalada, se utilizó como sonda intrínseca los triptófanos presentes (Alfa A posición 9 y Alfa B posición 9 y 60). Se utilizó su fluorescencia para seguir la desnaturalación de la proteína y se evaluó el cambio en la estructura secundaria bajo acción de dos agentes desnaturalantes (GdmCl y urea) mediante dicroísmo circular.

Fluorescencia intrínseca de triptófanos de Alfa cristalina.

En las Figuras 90 se muestran la desnaturación de Alfa Cristalina evaluada por el apagamiento de los triptófanos de Alfa Cristalina (1 Alfa A y 2 Alfa B) excitada a 295 nm.

Se observa que Alfa cristalina en estado nativo muestra un máximo de emisión de fluorescencia alrededor de 340 nm al agregar el agente caotrópico se observa un corrimiento hacia el rojo y un apagamiento típico de la desnaturación de proteínas.

Así para GdmCl la concentración en donde se pierde el 50 % de la fluorescencia es cercana a 3 M. Este resultado es concordante con lo descrito en la literatura para esta proteína de estrés térmico en donde se destaca su resistencia estructural a los agentes físicos y químicos (Andley, 2009).

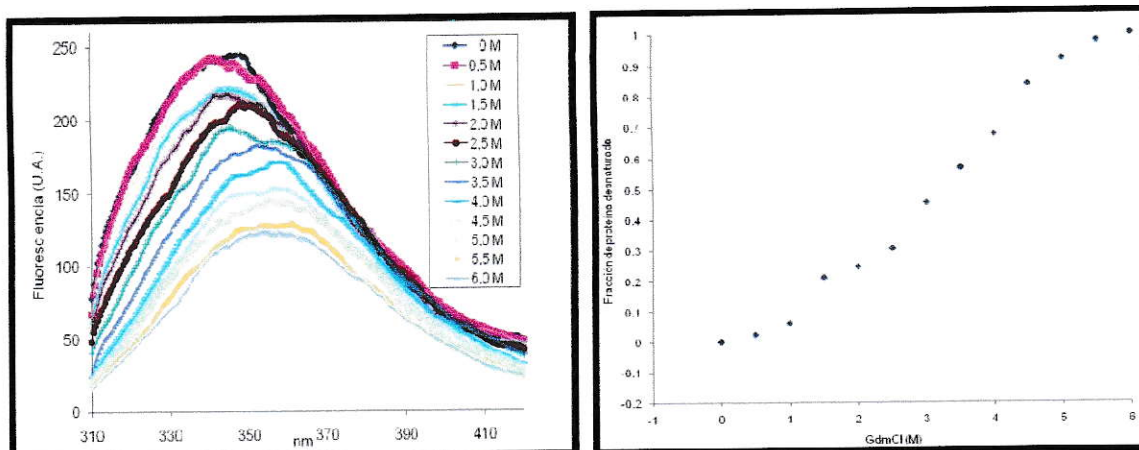


Figura 90. Efecto de la desnaturalación con GdmCl de Alfa cristalina sobre la emisión de fluorescencia de triptófanos.

A. Emisión de fluorescencia de Alfa cristalina excitada a 295 nm en función de la concentración de GdmCl. B. Emisión de Alfa cristalina expresada como fracción del estado nativo. Alfa cristalina (0,3 mg/ml), en PBS, pH: 7,5, GdmCl en concentraciones entre 0-6 M en baño termo regulado a 25° C.

Dicroísmo circular de Alfa cristalina.

Para determinar el cambio en la estructura secundaria de la Alfa cristalina humana inducida por el aumento de la concentración de GdmCl se registraron sus espectros de dicroísmo circular, midiendo en el ultravioleta lejano la absorción de luz circularmente polarizada. Se consideró confiable la medición hasta 215 nm considerando el posible artefacto experimental dado por el efecto de absorción de Cl^- (Figura 91).

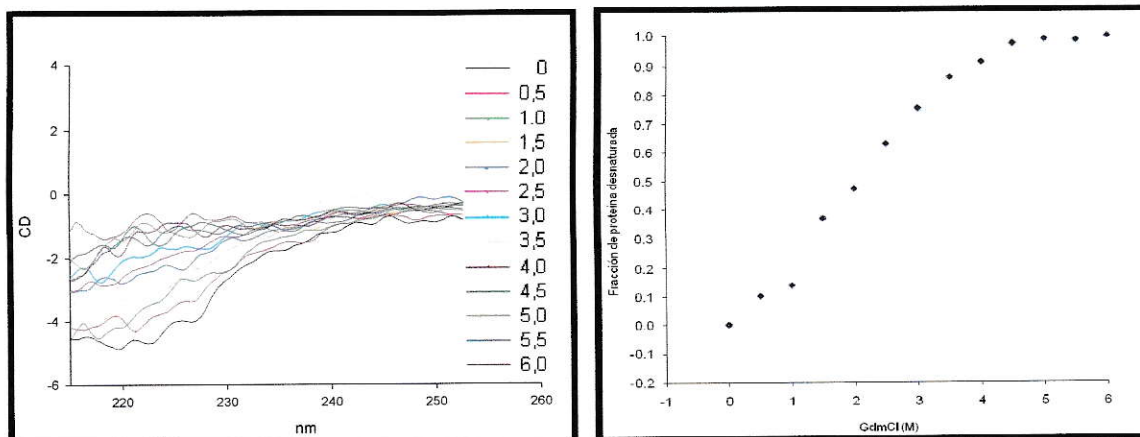


Figura 91. Efecto de la concentración de GdmCl sobre la estructura secundaria de Alfa cristalina humana.

A. Dicroísmo circular de Alfa cristalina a diferentes concentraciones de GdmCl. B. Dicroísmo circular de Alfa cristalina expresado como fracción del estado nativo. Alfa cristalina (0,3 mg/ml), en PBS, pH: 7,5, GdmCl en concentraciones entre 0 y 6 M.

Para determinar el contenido de estructura secundaria, se midió la elipticidad molar a 220 nm a diferentes concentraciones de GdmCl para construir la curva de desnaturalización de Alfa cristalina. Cada punto se normalizó respecto a la máxima elipticidad experimental.

La figura 91 B muestra que el 50 % de estructura se pierde alrededor de la concentración de 2,31 M de GdmCl.

Para corroborar el efecto desnaturante sin la presencia de Cl^- y así poder medir que ocurre con el cambio de estructura Beta se ensayó en experimentos similares la desnaturación de Alfa cristalina con urea. La figura 92 muestra un cambio de estructura helicoidal a hoja beta que es claro a 3,5 M de urea. Este resultado permite explicar porque la desnaturación medida a 220 nm muestra un valor de $[\text{GdmCl}]_{50\%}$ menor que el obtenido por fluorescencia. Si hay un cambio de estructura secundaria helicoidal a hoja beta se producirá una disminución a 220 nm que no equivale a una pérdida total de estructura secundaria, por esto es necesario una mayor concentración de GdmCl para eliminar la estructura beta responsable de un porcentaje de la fluorescencia de los triptófanos.

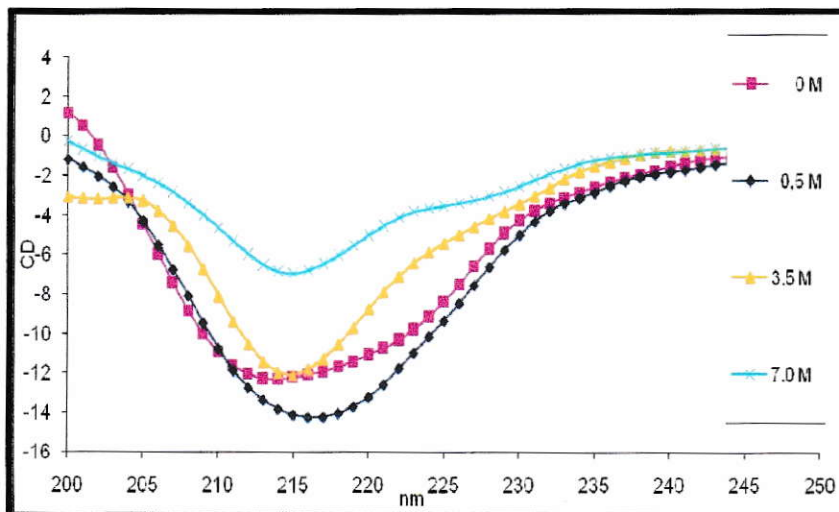


Figura 92. Efecto de la concentración de urea sobre la estructura secundaria de Alfa cristalina humana.

Dicroísmo circular de Alfa cristalina a diferentes concentraciones de urea (0 a 7 M).

Alfa cristalina (0,3 mg/ml) en PBS, pH, 7,5.

En la figura 93 se observan las curvas de desnaturalación de Alfa cristalina con urea seguida por la fluorescencia intrínseca de triptófanos y por dicroísmo circular.

La pérdida de la emisión del 50 % de fluorescencia de triptófanos se produce a 4,2 M de urea y la disminución al 50 % de la estructura secundaria en 3,9 M para la Alfa cristalina humana (Figura 93).

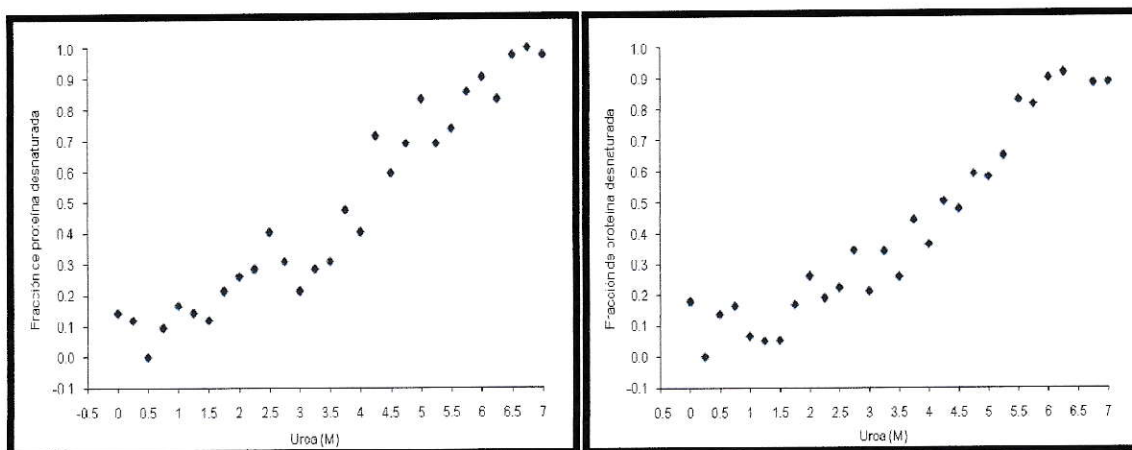


Figura 93. Desnaturalación de Alfa cristalina humana con urea seguida por la fluorescencia de triptófanos y por dicroísmo circular.

A. Emisión de fluorescencia de Alfa cristalina al excitar a 295 nm expresado como fracción del estado nativo a diferentes concentraciones de urea (0 a 7 M). B. Elipticidad de Alfa cristalina expresado como fracción del estado nativo. Alfa cristalina (0,3 mg/ml), en PBS, pH, 7,5.

III. 6. Estado de agregación y autofluorescencia de Alfa cristalina.

Estados de agregación de Alfa cristalina a altas concentraciones.

Con el objeto de analizar los estados de agregación de la proteína Alfa cristalina purificada a 1 mg/ml y relacionarlos con la emisión de fluorescencia, se diseñó un experimento en que se separaron las especies de Alfa cristalina por ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa entre 0,3 M a 2,0 M, preparando cada gradiente con concentraciones crecientes del agente desnaturalante GdmCl entre 0 a 6 M, en pasos de 0,5 M.

Se realizaron 13 gradientes y cada gradiente se separó en 16 fracciones y el contenido de Alfa cristalina en cada fracción se determinó mediante “dot blot”.

La presencia de Alfa cristalina se detectó por “inmuno dot blot”, utilizando un anticuerpo monoclonal primario anti Alfa cristalina y un anticuerpo secundario fluorescente, cada muestra se repitió tres veces (Figura 94).

Un ejemplo del inmuno dot blot se muestra en la figura 94, Donde se considera la relación de la intensidad en pixeles de la fluorescencia obtenida menos la de su fondo circundante respectivo.

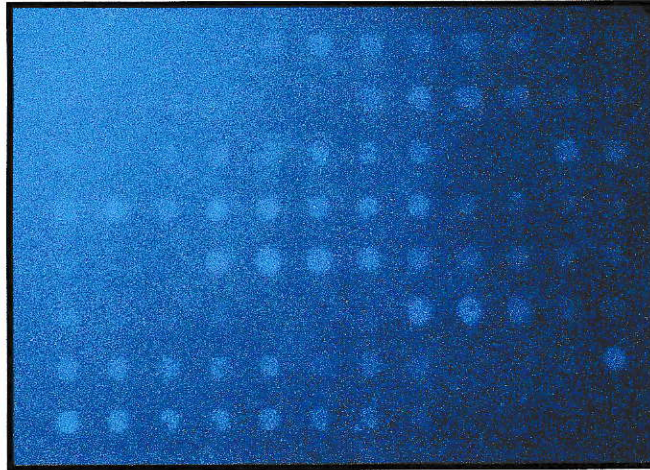


Figura 94. Inmuno dot blot de dot blot de las fracciones de los gradientes de sacarosa.

Se observa fluorescencia en las fracciones que contienen Alfa cristalina revelada con un anticuerpo secundario fluorescente.

En la figura 94 se observa la presencia de Alfa cristalina por la emisión de fluorescencia del anticuerpo secundario. De izquierda a la derecha se midieron las fracciones provenientes desde arriba hacia abajo del tubo. Un tubo corresponde a 16 fracciones o puntos en el dot blot. Siguiendo la misma secuencia, con un espacio vacío entre cada tubo, se analizaron 6 tubos por membrana. Como el experimento se hizo por triplicado se analizaron 9 membranas. Para sistematizar las mediciones se utilizó un método automático mediante el uso de herramientas de procesamiento de imagen. Las muestras se analizaron mediante “Image J usando Dot Blot Analyzer (Macro)” (Figura 95).

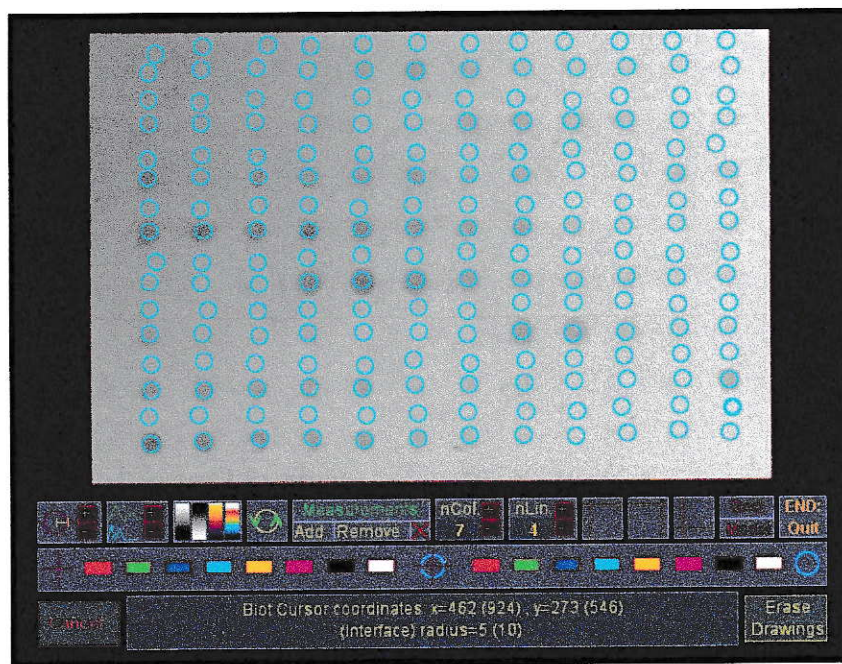
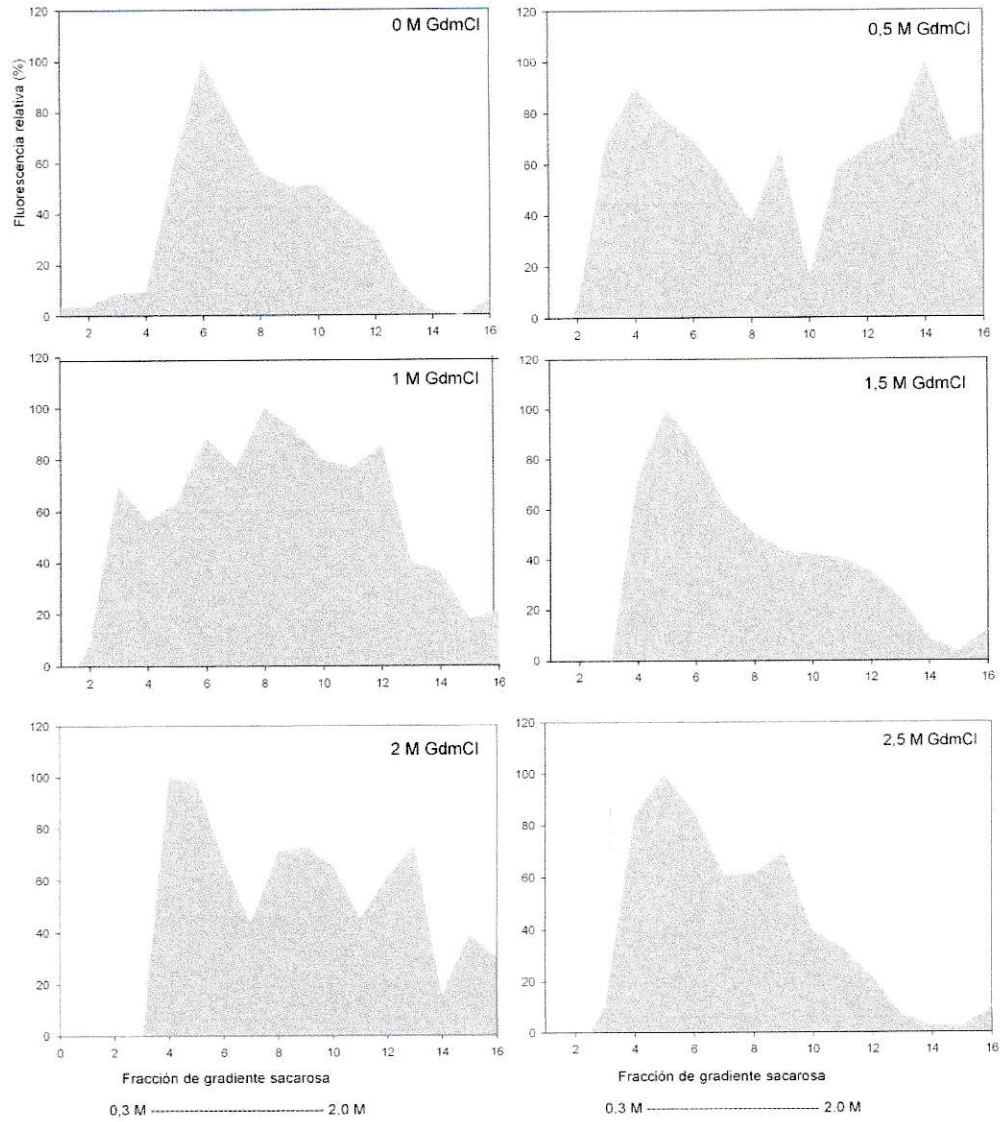


Figura 95. Diagrama de trabajo en dot blot Analyzer de Image J.

Los puntos estudiados, que corresponden a cada fracción obtenida de cada gradiente de sacarosa en diferentes concentraciones del agente desnaturalante, se corrigieron de acuerdo a su fondo de imagen y se expresaron como porcentaje según la intensidad máxima del “inmuno dot blot”.

Los resultados se graficaron como el porcentaje de fluorescencia máxima de cada fracción para cada gradiente de sacarosa, en concentraciones crecientes de agente desnaturalante (Figura 96).



Continuación.

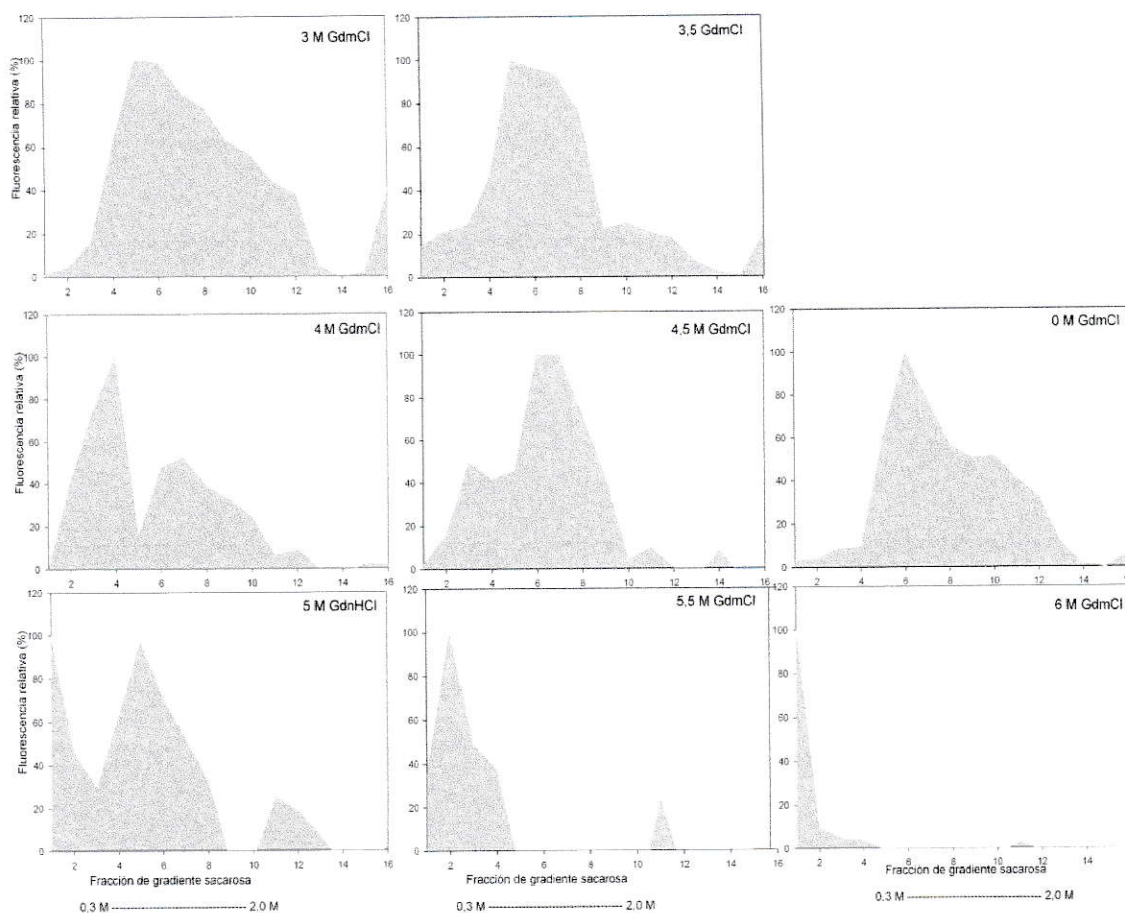


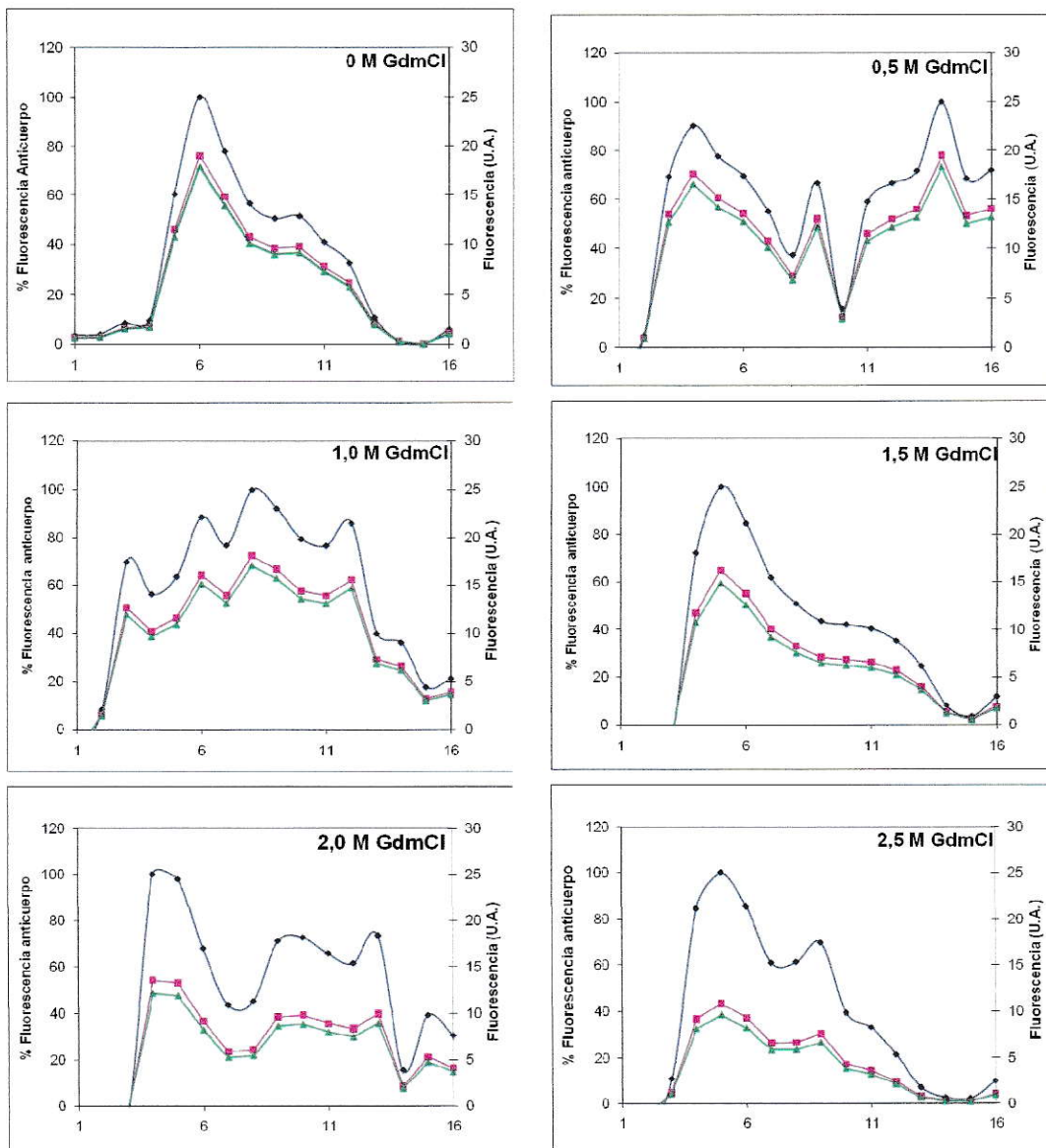
Figura 96. Distribución de Alfa cristalina en las fracciones de los gradientes discontinuos de sacarosa con GdmCl.

La presencia de Alfa cristalina esta expresada como emisión de fluorescencia de las fracciones (16) de trece gradientes de sacarosa discontinuos en concentraciones progresivas de agente desnaturalante.

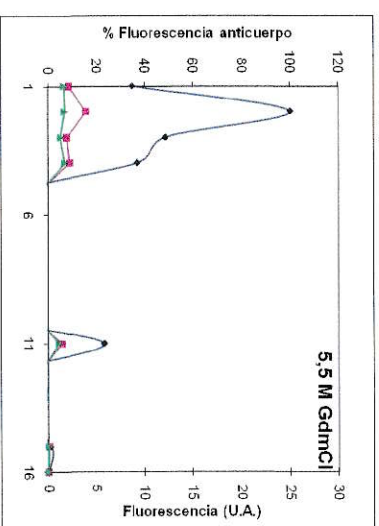
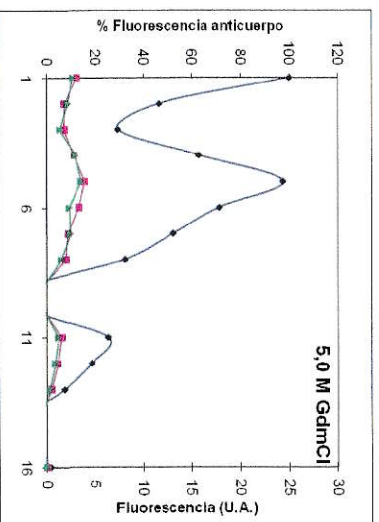
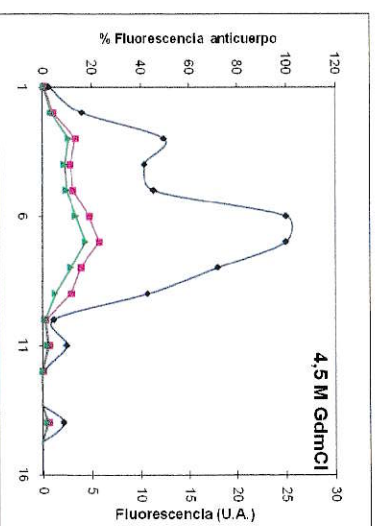
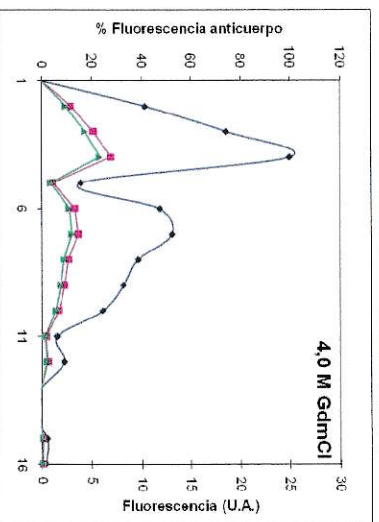
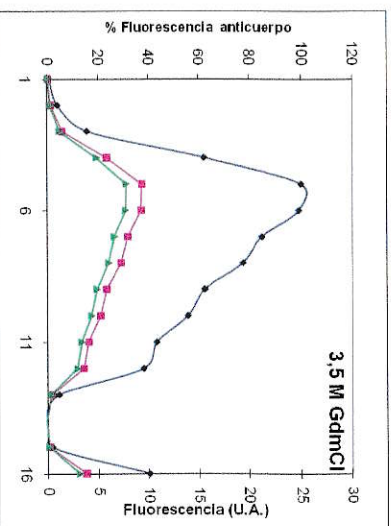
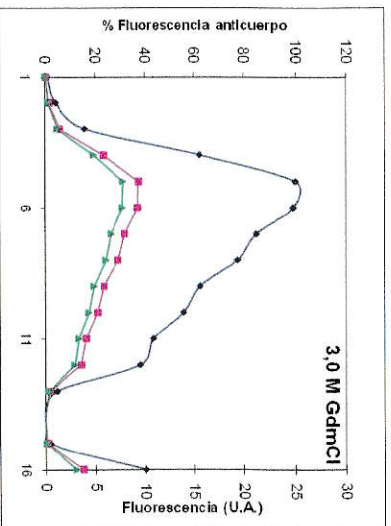
En la figura 96 se observa que a medida que aumenta la concentración del agente desnaturalante sobre 3,5 M de GdmCl las poblaciones de Alfa cristalina obtenidas disminuyen.

Autofluorescencia de los estados de agregación de Alfa cristalina a altas concentraciones.

Para relacionar el estado de agregación con la emisión de autofluorescencia de Alfa cristalina, se graficó su autofluorescencia en cada fracción de los gradientes desnaturalantes de acuerdo a su máximo de emisión al excitar a 488 nm (Figura 97).



Continuación.



Continuación.

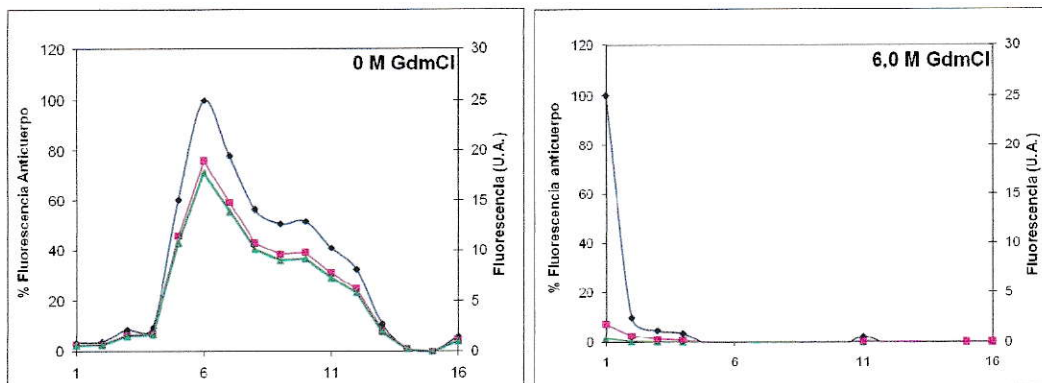


Figura 97. Autofluorescencia de Alfa cristalina presente en las fracciones obtenidas de los gradientes de sacarosa discontinuos con un aumento progresivo de la concentración de agente desnaturante excitada a 488 nm.

Curva azul: resultados de Figura 96, curva rosada: primer máximo de emisión de autofluorescencia, curva verde: segundo máximo de emisión de autofluorescencia.

En la figura 97 se observa que existe una relación directa entre la presencia de los estados de agregación y la autofluorescencia de Alfa cristalina. Cabe destacar que, a mayor disociación de Alfa cristalina menor es su autofluorescencia.

III.7. Estructura de Alfa cristalina.

Con la intención de conocer la estructura tridimensional de Alfa cristalina a 1 mg/ml, se utilizó microscopía electrónica de transmisión de muestras de Alfa cristalina humana teñidas con acetato de uranilo (tinción negativa) (Figura 98).

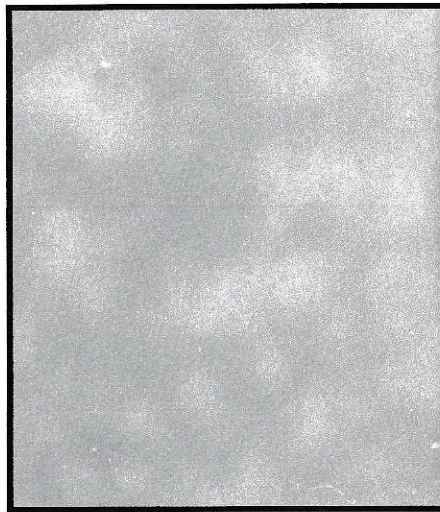


Figura 98. Microscopía electrónica de transmisión de Alfa cristalina humana (1mg/ml).

Evaluada por tinción negativa (120.000 X).

En la figura 98 se observan estructuras de aspecto esférico de tamaños diversos. Con un diámetro aproximado entre 17 a 35 nm.

E. Discusión.

El decaimiento y pérdida del epitelio pigmentario retinal (RPE) presente en la retina es la causa de la degeneración macular asociada a la edad (AMD), proceso principal que lleva a la ceguera no tratable en el mundo desarrollado. Por tal motivo determinar los factores responsables del deterioro de la función y finalmente la pérdida del RPE, permitirá encontrar nuevas estrategias para el manejo de esta enfermedad. En esta tesis se investigó el fenómeno de la autofluorescencia del RPE.

El RPE de la retina humana presenta autofluorescencia al ser estimulado con luz azul, proveniente de las fuentes de iluminación laser de los equipos de oftalmoscopia laser confocal (CSLO). Nuestros resultados demuestran que la fluorescencia del RPE proviene de los gránulos de lipofucsina presentes en su interior, lo que es concordante con los trabajos de investigación publicados (Delori *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2010). Se sabe que las lipofuscinas corresponden a cuerpos lisosomales con actividad proteolítica que almacenan proteínas no degradables por el sistema enzimático lisosomal. De tal manera que una acumulación y aumento en el tamaño de estos cuerpos de almacenaje, a medida que ocurre el envejecimiento, puede ser considerado como un factor determinante en la AMD del RPE del ojo humano. Así, un aumento de la

autofluorescencia del RPE parece estar directamente relacionada con el envejecimiento y estrés de la célula del RPE.

Los trabajos de los que tenemos conocimiento, han establecido que la autofluorescencia de la lipofucsina del RPE proviene de derivados de la molécula del retinal presente en el proceso de fototransducción, resultante de la interacción entre el segmento externo del fotorreceptor (ROS) y el RPE. Esta conclusión es fácil de entender pues la molécula de retinal oxidada emite fluorescencia, sin embargo, las características espectrales de la autofluorescencia de la lipofucsina no coinciden plenamente con las del retinal oxidado.

Esto plantea un nuevo desafío que ha sido el motivo de investigación de esta tesis. Nuestros resultados proponen un origen alternativo de esta autofluorescencia, responsabilizando a la agregación de una pequeña proteína de estrés térmico como parte de este fenómeno. Para discutir los resultados dividiremos la discusión en tres capítulos que mostrarán en forma secuencial el origen de la autofluorescencia a través del análisis morfológico de los gránulos de lipofucsina, de sus constituyentes proteicos y como las propiedades de estos pueden dar origen a la autofluorescencia.

Resultados capítulo I. Microscopía del epitelio pigmentario retinal.

En este capítulo se discutirán los resultados que relacionan la edad de los tejidos examinados con la señal de autofluorescencia. Así, a mayor edad mayor es la señal de autofluorescencia, tanto para humanos como para *Octodon degus*. Esta observación parece tener su fundamento en el tamaño de los gránulos de lipofucsina los que son más grandes al analizar los tejidos de mayor edad, como se resume en las figuras 99,101 y 103.

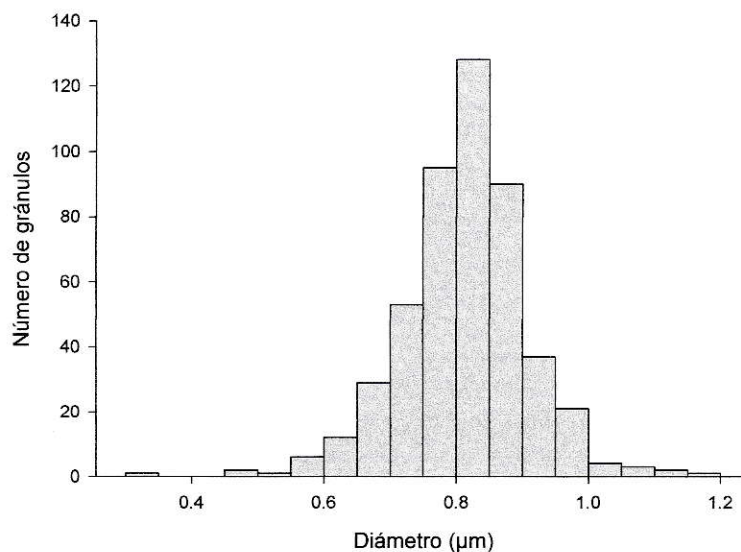


Figura 99. Distribución del tamaño de gránulos de lipofucsina de RPE humano de muestra de individuo de 42 años de edad.

El número de gránulos de lipofucsina promedio por célula corresponde a 23.

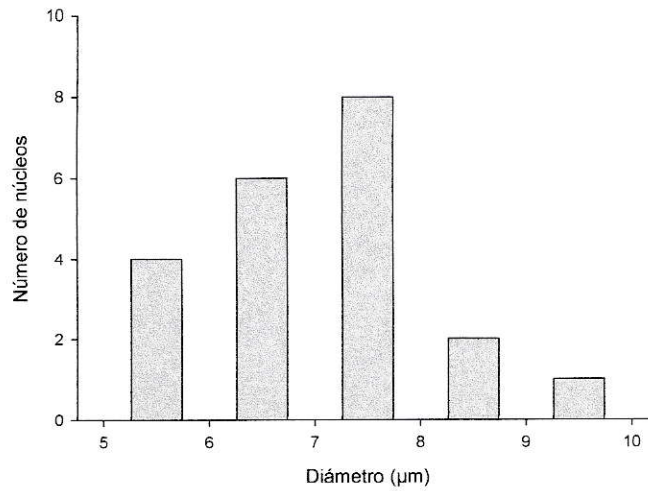


Figura 100. Distribución del tamaño de núcleos de células de RPE humano de muestra de individuo de 42 años de edad.

El tamaño nuclear promedio corresponde a 7,01 µm.

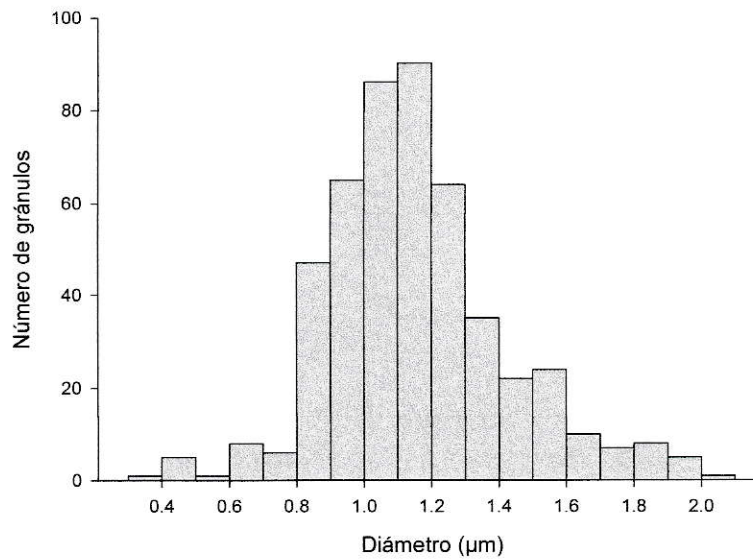


Figura 101. Distribución del tamaño de gránulos de lipofuscina de RPE humano de muestra de individuo de 72 años de edad.

El número de gránulos de lipofuscina promedio por célula corresponde a 60.

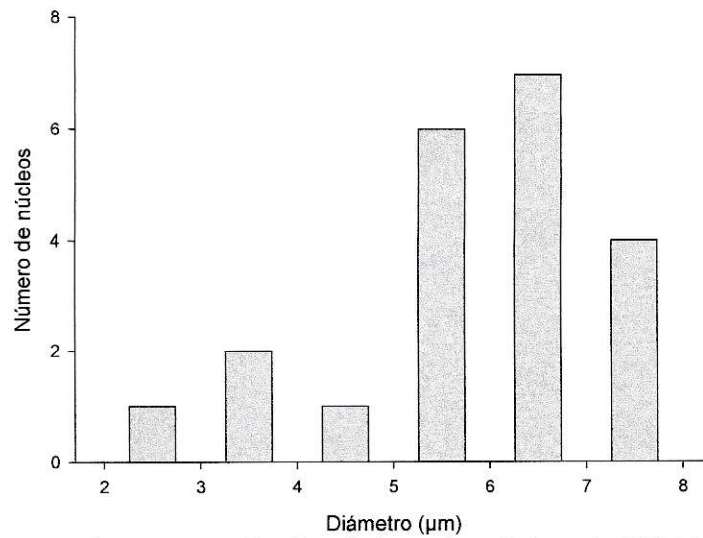


Figura 102. Distribución del tamaño de núcleos de células de RPE humano de muestra de individuo de 72 años de edad.

El tamaño nuclear promedio corresponde a 5,72 µm.

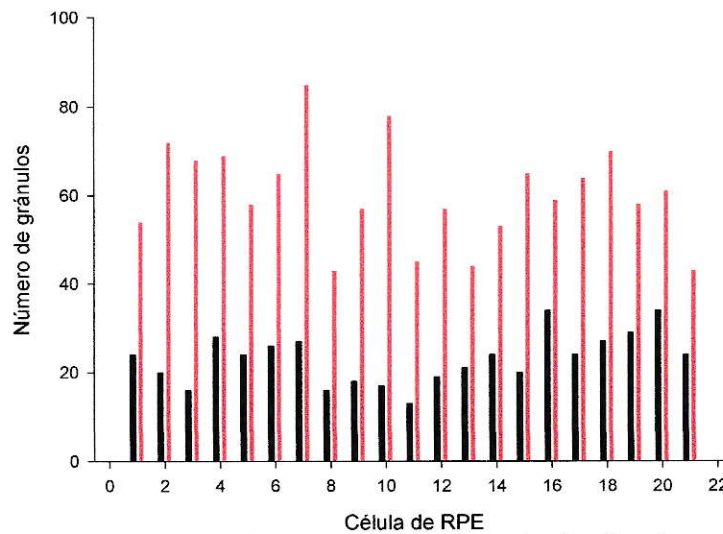


Figura 103. Distribución del número de gránulos de lipofucsina por célula de RPE humano según la edad.

Barras negras: individuo de 42 años. Barras rojas: individuo de 72 años. Número de células analizadas en cada grupo corresponde a 21.

Como se observa en las figuras 100 y 102 el tamaño nuclear observado parece reducirse con el paso del tiempo.

Otro de los factores que tiene relación con la autofluorescencia es la oxidación del retinal que generan derivados fluorescentes que provienen de la foto transducción podrían ser responsable de la autofluorescencia debido a que el medio circundante en el gránulo de lipofucsina podría cambiar las propiedades espectrales de este. Sin embargo, esta posibilidad se descarta debido a los resultados encontrados en la línea celular ARPE-19 que genera gránulos autofluorescentes y carece de ROS y su molécula de retinal oxidado. Por lo tanto no existe el proceso de foto transducción que origina los fluoróforos derivados del retinal (A2E, A2E-dímero, etc.). De este modo el origen de la autofluorescencia no se ha dilucidado por completo.

La otra arista para resolver este problema es que no se conocen todos los componentes de la lipofucsina, pues este tema ha sido materia de controversia. Actualmente se sabe que hay moléculas altamente oxidadas como lípidos, hidratos de carbono y proteínas, que también se encuentran covalentemente modificadas e incluso con metales.

De acuerdo a lo publicado los gránulos de lipofucsina generan autofluorescencia desde edad temprana (18 años) y la población de granos es heterogénea. Nuestros resultados confirman estos hechos y agregan información relevante respecto al tamaño y número de los gránulos de lipofucsina en relación a la edad del ojo estudiado. Debemos destacar que por

La proteína Alfa cristalina ha sido reportada como chaperona molecular inespecífica de varias proteínas "in vitro". Se sabe que las chaperonas aumentan su contenido cuando las células son sometidas a estrés. Este es el caso de la Alfa cristalina cuando se aumenta su expresión en células del RPE sometidas a estrés que se encuentran aisladas en cultivo o "in vivo" en modelos murinos. Hasta la fecha no se ha identificado directamente a Alfa cristalina como parte de las vías de regulación de autofagia, pero se ha encontrado que otras pequeñas proteínas, que actuarían como co-chaperonas de estrés térmico, participan en esta vía de restauración intracelular.

Si las proteínas de los gránulos de lipofucsina son productos del mal funcionamiento del sistema de chaperonas o del sistema de degradación resulta interesante identificarlas, pues al identificarlas se tendrá un panorama más claro del origen de la autofluorescencia. Así, en los últimos años con el uso de técnicas de detección más sensibles como la espectrometría de masas, ha sido posible detectar las proteínas presentes en la lipofucsina a pesar de las dificultades metodológicas que implica trabajar con este tipo de proteínas agregadas que dan origen a los gránulos. Un hecho notable es que estos gránulos contienen Alfa cristalina que es una chaperona molecular. Esto no llama la atención pues las células del RPE son glías naturales de los fotorreceptores y debido al estrés oxidativo al que están sometidas, probablemente generan un aumento de las chaperonas moleculares presentes

en el ojo, tal como lo demostraron los primeros estudios en tejidos afectados por degeneración macular relacionada a la edad.

Para establecer una relación directa entre la autofluorescencia y la presencia de Alfa cristalina se caracterizaron las propiedades fluorescentes de esta proteína "in vitro".

Resultados capítulo III. Alfa cristalina como proteína autofluorescente.

La emisión de autofluorescencia en cristalinos de *Octodon degus* y humano puede explicarse por la emisión de fluorescencia de Alfa cristalina, pues se conocen proteínas fluorescentes que carecen de un fluoróforo adicional. Esta hipótesis se condice con el alto contenido de Alfa cristalina en el cristalino que presenta propiedades de auto fluorescencia, como se demostró al comienzo del Capítulo III, (figura 75). Por esta razón se propuso demostrar que la proteína Alfa cristalina es corresponsable de la emisión de autofluorescencia de lipofucsina.

Por tal motivo se purificó Alfa cristalina humana, a partir de cristalinos y se observó que al excitar con luz azul autofluorece. Su función como chaperona molecular "in vitro" se mantuvo intacta, lo que demuestra que no hubo alteración de la estructura de Alfa cristalina. Más aún, la autofluorescencia de Alfa

cristalina resulto ser dependiente de la concentración y del estado de agregación, como se demostró mediante el uso de agentes desnaturantes. Un hecho relevante es la resistencia de esta proteína a los agentes químicos desnaturantes, como confirmamos en este trabajo. Esta propiedad le confiere un rol protector como proteína de estrés celular. Estos resultados en su conjunto sugieren que la autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina proviene del reclutamiento y agregación de Alfa cristalina en el interior. Sin embargo, no nos permite deducir cual es el mecanismo para generar la autofluorescencia.

Al relacionar el estado de agregación con la autofluorescencia de Alfa cristalina "in vitro" se puede deducir que hay una relación directa entre ambas (Figuras 86, 96 y 97). Por esta razón, podemos especular que este estado de agregación de Alfa cristalina es corresponsable de la autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina. La lipofucsina como agregado impide la exposición al solvente de las proteínas que se ubican en el interior con el consecuente aumento del rendimiento cuántico, pues la autofluorescencia producto de la excitación a 488 nm no es apagada por acrilamida a diferencia de la fluorescencia cuando se excita a 364 y 400, que puede corresponder a otro tipo de fluoróforos (resultados no mostrados).

Es interesante analizar el apagamiento de la fluorescencia cuando se excita a 364 y 400 nm pues la molécula de retinal tiene un perfil de absorción en el

rango de los 400 – 440 nm. Esto muestra probablemente la heterogeneidad en la distribución de retinal tanto en sus derivados y su localización que en algún grado se encuentra expuesto al solvente.

Considerando los antecedentes expuestos se propone un modelo para explicar la autofluorescencia de lipofuscina considerando la emisión de fluorescencia de Alfa cristalina purificada.

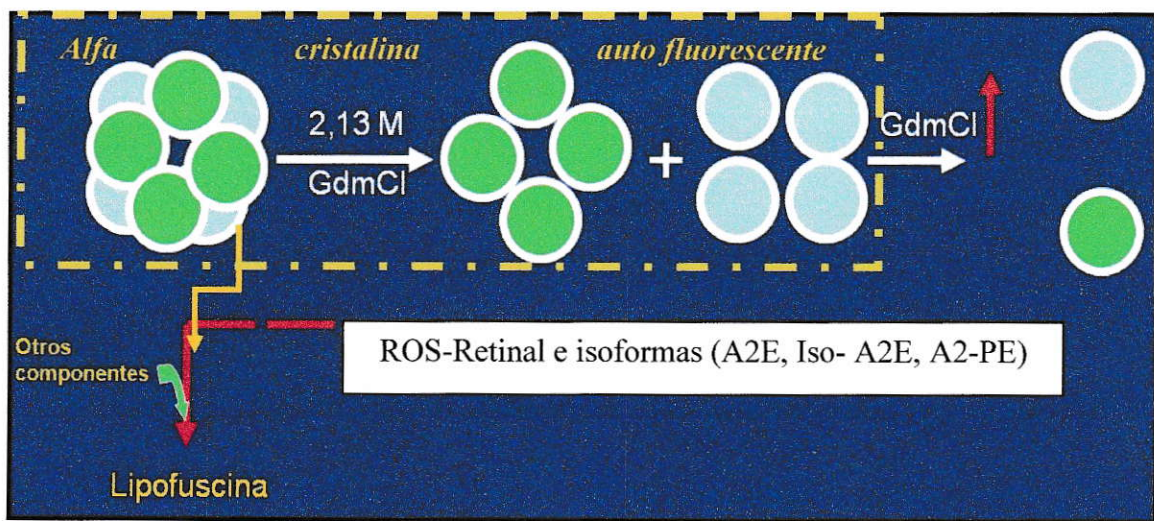


Ilustración 2. Modelo de autofluorescencia de Alfa cristalina y su relación con la autofluorescencia de lipofuscina.

Círculos verdes y celestes corresponden a oligómeros de Alfa A y B cristalinas respectivamente. Otros componentes (proteínas, lípidos e hidratos de carbono, metales oxidados y modificados). ROS: segmentos externos de fotorreceptores que contienen retinal y su isoformas.

Según este modelo el estado agregado de Alfa cristalina en los gránulos de lipofucsina contribuye directamente a la emisión de fluorescencia cuando se excita a 488 nm. Esto no descarta que algunas isoformas derivadas de retinal puedan también contribuir a la autofluorescencia cuando se excita a esta longitud de onda. Lo que sí es claro, es la no contribución de los agregados de Alfa cristalina a la emisión de fluorescencia de los granos de lipofucsina cuando se excita a 364 y 400 nm. La emisión producto de esta excitación puede ser consecuencia de la presencia de derivados de retinal u otros fluoróforos

Los resultados que se muestran en las figuras 99, 101 y 103 del capítulo I de la discusión, apoyan el modelo, pues el aumento de la autofluorescencia cuando se excita a 488 nm está directamente relacionado con el tamaño y el aumento del número de los gránulos de lipofucsina, los cuales debieran tener un mayor contenido de Alfa cristalina. ¿Cómo se explica este proceso?, la respuesta se encuentra en los procesos celulares que se afectan con la edad. Así, la fotoxidación y oxidación mitocondrial a la que está continuamente expuesta las células del RPE durante el proceso de envejecimiento, mantienen en un estrés oxidativo permanente a este tejido. De tal manera que el RPE al encontrarse en condiciones de estrés aumenta la producción de la chaperona molecular Alfa cristalina, que se dirige a los lisosomas secundarios del RPE (lipofucsina). Una forma de explicar este fenómeno es el uso de la vía de autofagia de proteínas

mediadas por proteínas pequeñas de estrés térmico (sHsp27), vinculadas a los lisosomas secundarios en otras células (Kaarniranta *et al.*, 2009; Ryhanen *et al.*, 2009; Janen *et al.*, 2010). Esto proporciona los componentes lipoproteicos, glicoproteicos y cofactores (metales, retinal y derivados) para formar los gránulos de lipofucsina.

Un hecho relevante para el seguimiento de la pérdida del epitelio pigmentario asociada a la degeneración macular asociada a la edad, es la autofluorescencia de Alfa cristalina al aumentar su concentración, pues podría permitir la identificación de aquellas células que están más dañadas, sirviendo indirectamente como marcador de estrés celular. Al identificar las células dañadas se puede planificar con antelación, antes que muera el fotorreceptor, el recambio de ellas, con el consiguiente beneficio visual para la retina envejecida.

F. Conclusiones.

La autofluorescencia del epitelio pigmentario retinal proviene de los gránulos intracelulares de lipofucsina.

Alfa cristalina presenta autofluorescencia al excitarse a 488 nm que depende del estado de oligomerización de la proteína y puede ser responsable de la autofluorescencia de los gránulos de lipofucsina.

La autofluorescencia sería una consecuencia normal de la acumulación de Alfa cristalina al actuar como chaperona molecular.

La Alfa cristalina presente en la lipofucsina es un marcador de estrés celular y permitiría señalar células en proceso de degradación.

G. Referencias.

- Anand, A., S. Prabhakar yJ. Ambeti (2005). "Molecular basis of AMD: current concepts and recent advances." Trends Mol Med.
- Andley, U. P. (2009). "Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology." Curr Mol Med **9**(7): 887-92.
- Andley, U. P., Z. Song, E. F. Wawrousek yS. Bassnett (1998). "The molecular chaperone alphaA-crystallin enhances lens epithelial cell growth and resistance to UVA stress." J Biol Chem **273**(47): 31252-61.
- Attanasio, F., S. Cataldo, S. Fisichella, S. Nicoletti, V. G. Nicoletti, B. Pignataro, A. Savarino yE. Rizzarelli (2009). "Protective effects of L- and D-carnosine on alpha-crystallin amyloid fibril formation: implications for cataract disease." Biochemistry **48**(27): 6522-31.
- Bailey, T. A., N. Kanuga, I. A. Romero, J. Greenwood, P. J. Luthert yM. E. Cheetham (2004). "Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(2): 675-84.
- Bird, A. C., N. M. Bressler, S. B. Bressler, I. H. Chisholm, G. Coscas, M. D. Davis, P. T. de Jong, C. C. Klaver, B. E. Klein, R. Klein yet al. (1995). "An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group." Surv Ophthalmol **39**(5): 367-74.
- Biswas, A., A. Miller, T. Oya-Ito, P. Santhoshkumar, M. Bhat yR. H. Nagaraj (2006). "Effect of site-directed mutagenesis of methylglyoxal-modifiable arginine residues on the structure and chaperone function of human alphaA-crystallin." Biochemistry **45**(14): 4569-77.
- Bloemendal, H. yW. W. de Jong (1991). "Lens proteins and their genes." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **41**: 259-81.
- Boettner EA, W. J. (1962). "Transmission of the ocular media." Invest Ophthalmol **1**: 776-783.
- Boulton, M. E. (2004). "[RPE transplantation: the challenges and the future]." Ophthalmologe **101**(9): 877-81.
- Boulton, M. E., J. Marshall yJ. Mellerio (1982). "Human retinal pigment epithelial cells in tissue culture: a means of studying inherited retinal diseases." Birth Defects Orig Artic Ser **18**(6): 101-18.
- Brainard, B. ((1993)). Personal communication.
- Bron, A. J., G. F. Vrensen, J. Koretz, G. Maraini yJ. J. Harding (2000). "The ageing lens." Ophthalmologica **214**(1): 86-104.
- Buchner, J. P. yT. Kiefhaber (2005). Protein folding handbook. Weinheim ; [Great Britain], Wiley-VCH.
- Bui, T. V., Y. Han, R. A. Radu, G. H. Travis yN. L. Mata (2006). "Characterization of native retinal fluorophores involved in biosynthesis of A2E and lipofuscin-associated retinopathies." J Biol Chem **281**(26): 18112-9.

- Burke, J. M. yL. M. Hjelmeland (2005). "Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture." *Mol Interv* **5**(4): 241-9.
- Chan, C. C., R. J. Ross, D. Shen, X. Ding, Z. Majumdar, C. M. Bojanowski, M. Zhou, N. Salem, Jr., R. Bonner yJ. Tuo (2008). "Ccl2/Cx3cr1-deficient mice: an animal model for age-related macular degeneration." *Ophthalmic Res* **40**(3-4): 124-8.
- Chavez, A. E., F. Bozinovic, L. Peichl yA. G. Palacios (2003). "Retinal spectral sensitivity, fur coloration, and urine reflectance in the genus octodon (rodentia): implications for visual ecology." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(5): 2290-6.
- Crabb, J. W., M. Miyagi, X. Gu, K. Shadrach, K. A. West, H. Sakaguchi, M. Kamei, A. Hasan, L. Yan, M. E. Rayborn, R. G. Salomon yJ. G. Hollyfield (2002). "Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14682-7.
- de Grey, A. D., P. J. Alvarez, R. O. Brady, A. M. Cuervo, W. G. Jerome, P. L. McCarty, R. A. Nixon, B. E. Rittmann yJ. R. Sparrow (2005). "Medical bioremediation: prospects for the application of microbial catabolic diversity to aging and several major age-related diseases." *Ageing Res Rev* **4**(3): 315-38.
- de Jong, W. W., G. J. Caspers yJ. A. Leunissen (1998). "Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily." *Int J Biol Macromol* **22**(3-4): 151-62.
- DeGrip, W. J., E. N. Pugh yD. G. Stavenga (2000). *Molecular mechanisms in visual transduction*. Amsterdam ; New York, Elsevier.
- Delgado, L. M., A. H. Vielma, T. Kahne, A. G. Palacios yO. Schmachtenberg (2009). "The GABAergic system in the retina of neonate and adult Octodon degus, studied by immunohistochemistry and electroretinography." *J Comp Neurol* **514**(5): 459-72.
- Delori, F. C., C. K. Dorey, G. Staurenghi, O. Arend, D. G. Goger yJ. J. Weiter (1995). "In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(3): 718-29.
- Dillon, J., L. Zheng, J. C. Merriam yE. R. Gaillard (2004). "Transmission of light to the aging human retina: possible implications for age related macular degeneration." *Exp Eye Res* **79**(6): 753-9.
- Dunn, K. C., A. E. Aotaki-Keen, F. R. Putkey yL. M. Hjelmeland (1996). "ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties." *Exp Eye Res* **62**(2): 155-69.
- Dunn, K. C., A. D. Marmorstein, V. L. Bonilha, E. Rodriguez-Boulan, F. Giordano yL. M. Hjelmeland (1998). "Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(13): 2744-9.
- Eldred, G. E. yM. L. Katz (1988). "Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization." *Exp Eye Res* **47**(1): 71-86.
- Fishkin, N. E., J. R. Sparrow, R. Allikmets yK. Nakanishi (2005). "Isolation and characterization of a retinal pigment epithelial cell fluorophore: an all-trans-retinal dimer conjugate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(20): 7091-6.

- Hageman, G. S., D. H. Anderson, L. V. Johnson, L. S. Hancox, A. J. Taiber, L. I. Hardisty, J. L. Hageman, H. A. Stockman, J. D. Borchardt, K. M. Gehrs, R. J. Smith, G. Silvestri, S. R. Russell, C. C. Klaver, I. Barbazetto, S. Chang, L. A. Yannuzzi, G. R. Barile, J. C. Merriam, R. T. Smith, A. K. Olsh, J. Bergeron, J. Zernant, J. E. Merriam, B. Gold, M. Dean yR. Allikmets (2005). "A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7227-32.
- Han, M., A. Bindewald-Wittich, F. G. Holz, G. Giese, M. H. Niemz, S. Snyder, H. Sun, J. Yu, M. Agopov, O. La Schiazza yJ. F. Bille (2006). "Two-photon excited autofluorescence imaging of human retinal pigment epithelial cells." J Biomed Opt **11**(1): 010501.
- Han, M., G. Giese, S. Schmitz-Valckenberg, A. Bindewald-Wittich, F. G. Holz, J. Yu, J. F. Bille yM. H. Niemz (2007). "Age-related structural abnormalities in the human retina-choroid complex revealed by two-photon excited autofluorescence imaging." J Biomed Opt **12**(2): 024012.
- Hirata, M., T. Yasukawa, P. Wiedemann, E. Kimura, N. Kunou, W. Eichler, A. Takase, R. Sato yY. Ogura (2009). "Fundus autofluorescence and fate of glycoxidized particles injected into subretinal space in rabbit age-related macular degeneration model." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **247**(7): 929-37.
- Hoehenwarter, W., N. M. Kumar, M. Wacker, U. Zimny-Arndt, J. Klose yP. R. Jungblut (2005). "Eye lens proteomics: from global approach to detailed information about phakinin and gamma E and F crystallin genes." Proteomics **5**(1): 245-57.
- Horwitz, J. (1992). "Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10449-53.
- Horwitz, J., Q. Huang yL. Ding (2004). "The native oligomeric organization of alpha-crystallin, is it necessary for its chaperone function?" Exp Eye Res **79**(6): 817-21.
- Inestrosa, N. C., A. E. Reyes, M. A. Chacon, W. Cerpa, A. Villalon, J. Montiel, G. Merabachvili, R. Aldunate, F. Bozinovic yF. Aboitiz (2005). "Human-like rodent amyloid-beta-peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type *Octodon degu*." Neurobiol Aging **26**(7): 1023-8.
- Janen, S. B., H. Chaachouay yC. Richter-Landsberg (2010). "Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes." Glia **58**(14): 1766-74.
- Jung, T., A. Hohn yT. Grune (2010). "Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques." Methods Mol Biol **594**: 173-93.
- Kaarniranta, K., A. Salminen, E. L. Eskelinen yJ. Kopitz (2009). "Heat shock proteins as gatekeepers of proteolytic pathways-Implications for age-related macular degeneration (AMD)." Ageing Res Rev **8**(2): 128-39.
- Katz, M. L. (2002). "Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration." Arch Gerontol Geriatr **34**(3): 359-70.
- Katz, M. L. yC. L. Gao (1995). "Vitamin A incorporation into lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium." Mech Ageing Dev **84**(1): 29-38.

- Katz, M. L. yW. G. Robison, Jr. (2002). "What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies." Arch Gerontol Geriatr **34**(3): 169-84.
- Kim, S. R., N. Fishkin, J. Kong, K. Nakanishi, R. Allikmets yJ. R. Sparrow (2004). "Rpe65 Leu450Met variant is associated with reduced levels of the retinal pigment epithelium lipofuscin fluorophores A2E and iso-A2E." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11668-72.
- King, A., E. Gottlieb, D. G. Brooks, M. P. Murphy yJ. L. Dunaief (2004). "Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells." Photochem Photobiol **79**(5): 470-5.
- Klymchenko, A. S., S. V. Avilov yA. P. Demchenko (2004). "Resolution of Cys and Lys labeling of alpha-crystallin with site-sensitive fluorescent 3-hydroxyflavone dye." Anal Biochem **329**(1): 43-57.
- Laganowsky, A., J. L. Benesch, M. Landau, L. Ding, M. R. Sawaya, D. Cascio, Q. Huang, C. V. Robinson, J. Horwitz yD. Eisenberg "Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function." Protein Sci **19**(5): 1031-43.
- Lee, T. M. (2004). "Octodon degus: a diurnal, social, and long-lived rodent." ILAR J **45**(1): 14-24.
- Liang, P. yT. H. MacRae (1997). "Molecular chaperones and the cytoskeleton." J Cell Sci **110 (Pt 13)**: 1431-40.
- Liu, J. P., R. Schlosser, W. Y. Ma, Z. Dong, H. Feng, L. Lui, X. Q. Huang, Y. Liu yD. W. Li (2004). "Human alphaA- and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKCalpha, RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways." Exp Eye Res **79**(6): 393-403.
- Lu, L., S. F. Hackett, A. Mincey, H. Lai yP. A. Campochiaro (2006). "Effects of different types of oxidative stress in RPE cells." J Cell Physiol **206**(1): 119-25.
- Luibl, V., J. M. Isas, R. Kayed, C. G. Glabe, R. Langen yJ. Chen (2006). "Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers." J Clin Invest **116**(2): 378-85.
- Marmorstein, A. D., L. Y. Marmorstein, H. Sakaguchi yJ. G. Hollyfield (2002). "Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(7): 2435-41.
- McAvoy, J. W. (1980). "Beta- and gamma-crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retinal." Differentiation **17**(2): 85-91.
- Minami, M., T. Mizutani, R. Kawanishi, Y. Suzuki yH. Mori (2003). "Neuronal expression of alphaB crystallin in cerebral infarction." Acta Neuropathol (Berl) **105**(6): 549-54.
- Muchowski, P. J., M. M. Valdez yJ. I. Clark (1999). "AlphaB-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(5): 951-8.

- Narberhaus, F. (2002). "Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 64-93; table of contents.
- Neumann, M. yD. Gabel (2002). "Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy." J Histochem Cytochem **50**(3): 437-9.
- Ng, K. P., B. Gugu, K. Renganathan, M. W. Davies, X. Gu, J. S. Crabb, S. R. Kim, M. B. Rozanowska, V. L. Bonilha, M. E. Rayborn, R. G. Salomon, J. R. Sparrow, M. E. Boulton, J. G. Hollyfield yJ. W. Crabb (2008). "Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics." Mol Cell Proteomics **7**(7): 1397-405.
- Nordgaard, C. L., K. M. Berg, R. J. Kapphahn, C. Reilly, X. Feng, T. W. Olsen yD. A. Ferrington (2006). "Proteomics of the retinal pigment epithelium reveals altered protein expression at progressive stages of age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(3): 815-22.
- Okuno, T., M. Kojima, I. Hata yD. H. Sliney (2005). "Temperature rises in the crystalline lens from focal irradiation." Health Phys **88**(3): 214-22.
- Paulin, D., A. Huet, L. Khanamyrian yZ. Xue (2004). "Desminopathies in muscle disease." J Pathol **204**(4): 418-27.
- Perng, M. D., S. F. Wen, I. P. van den, A. R. Prescott yR. A. Quinlan (2004). "Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells." Mol Biol Cell **15**(5): 2335-46.
- Radu, R. A., N. L. Mata, S. Nusinowitz, X. Liu, P. A. Sieving yG. H. Travis (2003). "Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4742-7.
- Redmond, T. M., S. Yu, E. Lee, D. Bok, D. Hamasaki, N. Chen, P. Goletz, J. X. Ma, R. K. Crouch yK. Pfeifer (1998). "Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle." Nat Genet **20**(4): 344-51.
- Rozanowska, M., J. Jarvis-Evans, W. Korytowski, M. E. Boulton, J. M. Burke yT. Sarna (1995). "Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species." J Biol Chem **270**(32): 18825-30.
- Ryhanen, T., J. M. Hyttinen, J. Kopitz, K. Rilla, E. Kuusisto, E. Mannermaa, J. Viiri, C. I. Holmberg, I. Immonen, S. Meri, J. Parkkinen, E. L. Eskelinen, H. Uusitalo, A. Salminen yK. Kaarniranta (2009). "Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells." J Cell Mol Med **13**(9B): 3616-31.
- Saha, S. yK. P. Das (2004). "Relationship between chaperone activity and oligomeric size of recombinant human alphaA- and alphaB-crystallin: a tryptic digestion study." Proteins **57**(3): 610-7.
- Sakaguchi, H., M. Miyagi, R. M. Darrow, J. S. Crabb, J. G. Hollyfield, D. T. Organisciak yJ. W. Crabb (2003). "Intense light exposure changes the crystallin content in retina." Exp Eye Res **76**(1): 131-3.
- Santhoshkumar, P. yK. K. Sharma (2004). "Inhibition of amyloid fibrillogenesis and toxicity by a peptide chaperone." Mol Cell Biochem **267**(1-2): 147-55.

- Santoro, M. M. yD. W. Bolen (1988). "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants." Biochemistry **27**(21): 8063-8.
- Schmitz-Valckenberg, S., M. Fleckenstein, H. P. Scholl yF. G. Holz (2009). "Fundus autofluorescence and progression of age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **54**(1): 96-117.
- Schutt, F., B. Ueberle, M. Schnolzer, F. G. Holz yJ. Kopitz (2002). "Proteome analysis of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells." FEBS Lett **528**(1-3): 217-21.
- Shaban, H. yC. Richter (2002). "A2E and blue light in the retina: the paradigm of age-related macular degeneration." Biol Chem **383**(3-4): 537-45.
- Siik, S. (1999). Lens autofluorescence
In aging and cataractous human lenses. Clinical applicability. Academic dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Medicine, University of Oulu, for public discussion in Auditorium 5 of the University Hospital of Oulu, on June 11th, 1999, at 12 noon. University Hospital of Oulu, UNIVERSITY OF OULU, OULU FINLAND 1999
- Siik, S., L. T. Chylack, Jr., J. Friend, J. Wolfe, J. Teikari, H. Nieminen yP. J. Airaksinen (1999). "Lens autofluorescence and light scatter in relation to the lens opacities classification system, LOCS III." Acta Ophthalmol Scand **77**(5): 509-14.
- Slakter, J. S. yM. Stur (2005). "Quality of life in patients with age-related macular degeneration: impact of the condition and benefits of treatment." Surv Ophthalmol **50**(3): 263-73.
- Sliney DH, W. M. (1980). Safety With Lasers and Other Optical Sources: A Comprehensive Handbook. New York, NY:.
- Sparrow, J. R., N. Fishkin, J. Zhou, B. Cai, Y. P. Jang, S. Krane, Y. Itagaki yK. Nakanishi (2003). "A2E, a byproduct of the visual cycle." Vision Res **43**(28): 2983-90.
- Sparrow, J. R., Y. Wu, T. Nagasaki, K. D. Yoon, K. Yamamoto yJ. Zhou (2010). "Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina." Photochem Photobiol Sci **9**(11): 1480-9.
- Sparrow, J. R., K. D. Yoon, Y. Wu yK. Yamamoto (2010). "Interpretations of fundus autofluorescence from studies of the bisretinoids of the retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(9): 4351-7.
- Strohalm, M., M. Hassman, B. Kosata yM. Kodicek (2008). "mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(6): 905-8.
- Strohalm, M., D. Kavan, P. Novak, M. Volny yV. Havlicek (2010). "mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data." Anal Chem **82**(11): 4648-51.
- Sundelin, S. P., S. E. Nilsson yU. T. Brunk (2001). "Lipofuscin-formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to their melanin content." Free Radic Biol Med **30**(1): 74-81.

- Tarita-Nistor, L., E. G. Gonzalez, S. N. Markowitz yM. J. Steinbach (2006). "Binocular function in patients with age-related macular degeneration: a review." Can J Ophthalmol **41**(3): 327-32.
- Teesalu, P., P. J. Airaksinen, A. Tuulonen, H. Nieminen yH. Alanko (1997). "Fluorometry of the crystalline lens for correcting blue-on-yellow perimetry results." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(3): 697-703.
- Terman, A. yU. T. Brunk (2004). "Lipofuscin." Int J Biochem Cell Biol **36**(8): 1400-4.
- Thompson, D. A. yA. Gal (2003). "Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases." Prog Retin Eye Res **22**(5): 683-703.
- van Groen, T., I. Kadish, N. Popovic, M. Popovic, M. Caballero-Bleda, B. Bano-Otalora, P. Vivanco, M. A. Rol yJ. A. Madrid (2009). "Age-related brain pathology in Octodon degu: Blood vessel, white matter and Alzheimer-like pathology." Neurobiol Aging.
- van Leen, R. W., K. E. van Roozendaal, N. H. Lubsen yJ. G. Schoenmakers (1987). "Differential expression of crystallin genes during development of the rat eye lens." Dev Biol **120**(2): 457-64.
- van Montfort, R. L., E. Basha, K. L. Friedrich, C. Slingsby yE. Vierling (2001). "Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein." Nat Struct Biol **8**(12): 1025-30.
- van Rijk, A. F. yH. Bloemendal (2000). "Alpha-B-crystallin in neuropathology." Ophthalmologica **214**(1): 7-12.
- Wang, X., C. M. Garcia, Y. B. Shui yD. C. Beebe (2004). "Expression and regulation of alpha-, beta-, and gamma-crystallins in mammalian lens epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(10): 3608-19.
- Warburton, S., W. E. Davis, K. Southwick, H. Xin, A. T. Woolley, G. F. Burton yC. D. Thulin (2007). "Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin." Mol Vis **13**: 318-29.
- Warburton, S., K. Southwick, R. M. Hardman, A. M. Secrest, R. K. Grow, H. Xin, A. T. Woolley, G. F. Burton yC. D. Thulin (2005). "Examining the proteins of functional retinal lipofuscin using proteomic analysis as a guide for understanding its origin." Mol Vis **11**: 1122-34.
- Winkler, B. S., M. E. Boulton, J. D. Gottsch yP. Sternberg (1999). "Oxidative damage and age-related macular degeneration." Mol Vis **5**: 32.
- Yuan, X., X. Gu, J. S. Crabb, X. Yue, K. Shadrach, J. G. Hollyfield yJ. W. Crabb (2010). "Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes" Mol Cell Proteomics **9**(6): 1031-46.