



Desarrollo de un modelo de lesión de retina basado en láseres de bajo costo

Cynthia Pardines Candela

Tutores:

Eduardo Fernández Jover

Co-tutora:

Ariadna Díaz Tahoces

Instituto de Bioingeniería

Departamento de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado de Biotecnología 2011/2015

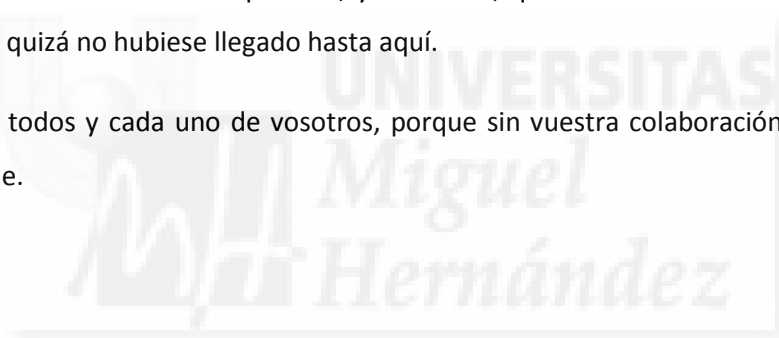
Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi tutor el Doctor Eduardo Fernández Jover director del Grupo de Neuroingeniería Biomédica de la Universidad Miguel Hernández el haberme permitido embarcarme en este proyecto con el que tanto he disfrutado; y a mi co-tutora Ariadna Díaz Tahoces por toda la ayuda que me ha brindado y lo mucho que he aprendido con ella. Sin su ayuda y apoyo este proyecto no habría sido posible.

Deseo hacer especial mención a Antonio Fimia Gil, catedrático de la Universidad Miguel Hernández en el área de óptica y a Alejandro García Mol. También, agradecerle a Sonia Andreu Vera, técnico en el laboratorio de Eduardo Fernández Jover, por enseñarme tantos métodos y protocolos y ser paciente conmigo.

Por último, agradecerle a mi familia todo el apoyo que me ha dado durante estos 4 años de carrera y en especial en este último periodo; y a Pascual, que tantas veces me ha levantado si he caído y sin el cual quizá no hubiese llegado hasta aquí.

Gracias a todos y cada uno de vosotros, porque sin vuestra colaboración esta memoria no habría sido posible.



Resumen

Las enfermedades que afectan a la retina son la primera causa de ceguera irreversible mundial y su prevalencia va en aumento. Este hecho ha desencadenado un aumento en la investigación de este tipo de patologías para generar terapias curativas y/o paliativas. Actualmente, existen diferentes modelos de degeneración retiniana en ratón que son utilizados para este propósito. De estos, los que permiten una mayor modelación de la lesión son los generados con un haz de láser quirúrgico. El inconveniente de esta técnica subyace en el alto precio de los equipos utilizados, que limita su uso a algunos laboratorios de investigación.

Este proyecto ha sido realizado con el objetivo de generar modelos de degeneración retiniana de menor coste, permitiendo la expansión de su uso. Para este fin, se realizaron impactos desde diferentes distancias con un láser de 532nm, de amplia distribución en el mercado, en retinas de ratones C57Bl6 (*wild type*). Dichos impactos resultaron en la generación de una lesión en la retina que se mantiene en el tiempo y conlleva la pérdida de la capa de los fotorreceptores,.

Abstract

Diseases affecting the retina are the first cause of irreversible blindness in the world and its prevalence is increasing. This has triggered an increase in the investigation into degenerative retinal pathologies in order to generate therapies. Nowadays, there are several mouse models with similar pathologies. Such degeneration can be induced artificially using surgical lasers to characterize the process. The main inconvenience of this technique is the high price of the laser system that limits its use in some laboratories.

This project has been developed in order to generate more affordable animals models. These models will increase the output of investigation. For this purpose, pulses with a reasonable priced 532nm laser were performed at several distances in the retina of C57Bl6 mice (wild type). The pulses resulted in a retinal lesion, more specifically in the destruction of the photoreceptor layer. Damage caused by the laser pulses was maintained for up to a month.

Contenido

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
Abstract	3
Introducción	5
Sistema visual	5
Patologías	6
Ensayos clínicos	8
Antecedentes	12
Objetivos	13
Métodos	14
Características del láser y hardware de activación	14
Tomografía de Coherencia Óptica (OCT).....	15
Estudio de la lesión in vivo	16
Metodología de lesión.....	16
Electroretinograma (ERG)	17
Inclusión y seccionado del tejido	19
Tinción Hematoxilina-Eosina	20
Microscopía óptica y análisis de imágenes	21
Resultados	22
Situación óptima del láser	22
OCT e histología.....	22
Electrorretinograma	33
Bibliografía.....	36

Introducción

Sistema visual

El órgano receptor del sentido de la vista es el ojo. Este es un sistema óptico complejo capaz de captar la luz, regular su intensidad, enfocar y convertir esa información en un conjunto de señales eléctricas. Dichas señales llegan al cerebro a través de rutas neuronales complejas que conectan el ojo a la corteza visual y otras áreas cerebrales [1]. El ojo está formado por tres capas concéntricas, que de dentro hacia fuera son:

- Retina o capa sensorial: se encarga de transformar los estímulos luminosos que llegan al ojo en impulsos eléctricos, que se transmiten al cerebro por el nervio óptico.
- Úvea o capa vascular: a ella llegan los vasos sanguíneos que nutren a la retina. Se subdivide en tres capas: la coroides, en contacto con la retina por la membrana de Bruch, el cuerpo ciliar que genera el humor acuoso y regula la forma del cristalino y el iris, que regula la cantidad de luz que entra a la retina.
- Capa fibrosa: formada por tejido denso avascular; su función es la de proteger el resto de las estructuras y dar soporte. Está formada por la esclerótica y la córnea.

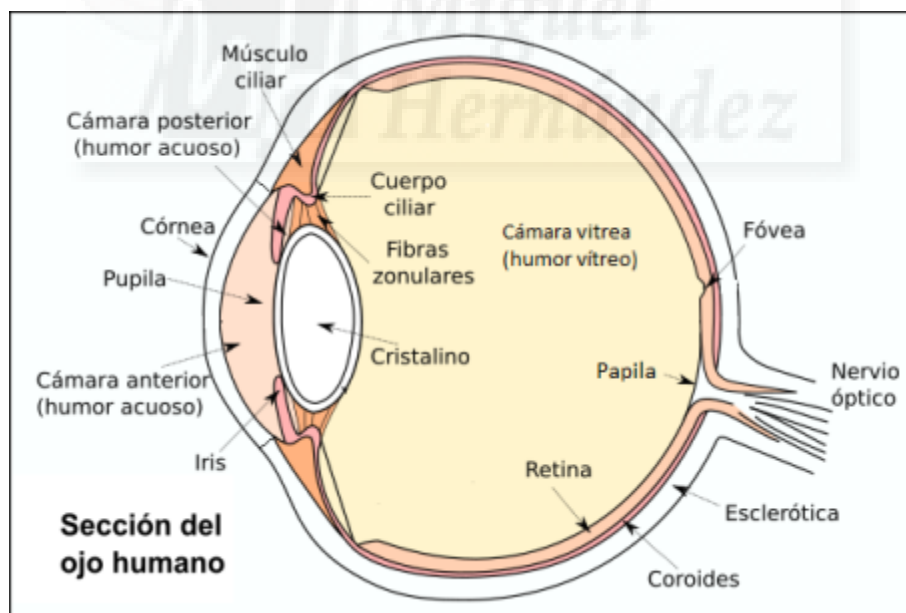


Figura 1. Esquema de la sección de un ojo humano.

La retina es un tejido sensorial organizado en capas de células que forman microcircuitos en los que se modela y codifica la información visual. Las retinas de todos los vertebrados comparten la misma estructura fundamental, que comprende cinco tipos de neuronas diferentes [2]. En la capa

adyacente a la coroides, la nuclear externa, se encuentran los fotorreceptores (conos y bastones) encargados de la fototransducción, proceso mediante el cual un fotón genera una respuesta nerviosa en dichas células. Este mecanismo comprende la recepción de la información visual y la traducción de la misma a pulsos eléctricos. Una vez generado, el impulso se propaga a las neuronas de la capa nuclear interna (células bipolares, amacrinas y horizontales) que lo transmiten al último estrato, la capa de las células ganglionares, donde la información es procesada y enviada hacia el cerebro a través del nervio óptico [3][4].

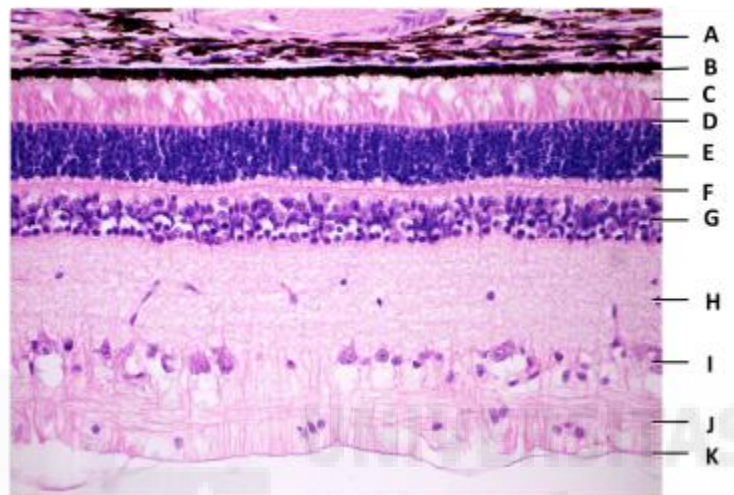


Figura 2. Corte sagital de ojo con tinción por el método hematoxilina-eosina. Coroides (A), Epitelio Pigmentario (B), capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (C), membrana limitante externa (D), capa nuclear externa (E), capa plexiforme externa (F), capa nuclear interna (G), capa plexiforme interna (H), células ganglionares (I), capa de las fibras del nervio óptico (J) y membrana limitante interna (K).

Patologías

Las enfermedades que afectan a la retina son la primera causa de ceguera irreversible mundial y su prevalencia va en aumento. Actualmente, en nuestro país se estima que alrededor de 979.200 personas (de 6 o más años) padece algún tipo de discapacidad visual, esto supone más del 2% de la población española [5]. Los datos recogidos en 2008 por el INE (Instituto Nacional de Estadística) en la encuesta de discapacidad, autonomía personal y situaciones de dependencia, muestran que enfermedades como el glaucoma, la retinopatía diabética (RD), la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la miopía magna y la retinosis pigmentaria son las principales patologías causantes de discapacidad (las cataratas no fueron incluidas en el estudio al considerarse una patología visual de fácil corrección mediante intervención quirúrgica) [5].

Todas estas patologías tienen en común la degeneración de la retina y más en concreto de los fotorreceptores en el caso de la retinopatía diabética [6], la DMAE [7] y la retinosis pigmentaria [1][10].

- La retinopatía diabética es una afección que están en riesgo de padecer los enfermos de diabetes mellitus tipo 1 y 2. El mantenimiento de elevados niveles de glucemia provoca que las paredes de los vasos retinianos se alteren y se vuelvan más permeables, dejando pasar fluido al espacio extracelular. En casos más avanzados, se produce una proliferación de vasos sanguíneos anómalos que originan hemorragias [8]. Se ha demostrado que las proteínas intersticiales de unión al retinol (IRBP), esenciales para el mantenimiento de los fotorreceptores [9], están inhibidas incluso en etapas tempranas de la retinopatía diabética, lo que conduce finalmente a la muerte de estos y las demás capas de la retina [6].
- La degeneración macular asociada a la edad es la principal causa de ceguera en las personas mayores de 60 años y se estima que el 23% de personas con discapacidad visual en España la padecen [5]. Debido a su alta tasa metabólica, los fotorreceptores generan gran cantidad de desechos, que al no ser procesados se depositan impidiendo que se nutran. La falta de nutrientes provoca la apoptosis de las células de la retina y por tanto la pérdida de visión [7][10].
- La retinosis pigmentaria o retinitis pigmentosa es la causa más habitual de ceguera de origen genético en los adultos [4]. No es una sola enfermedad, sino todo un conjunto de patologías que se engloban bajo este término. La herencia de genes mutados determina la manifestación de la enfermedad que cursa con la apoptosis de los conos y bastones por unos mecanismos no del todo conocidos pero que implican un aumento de calcio intracelular [11].

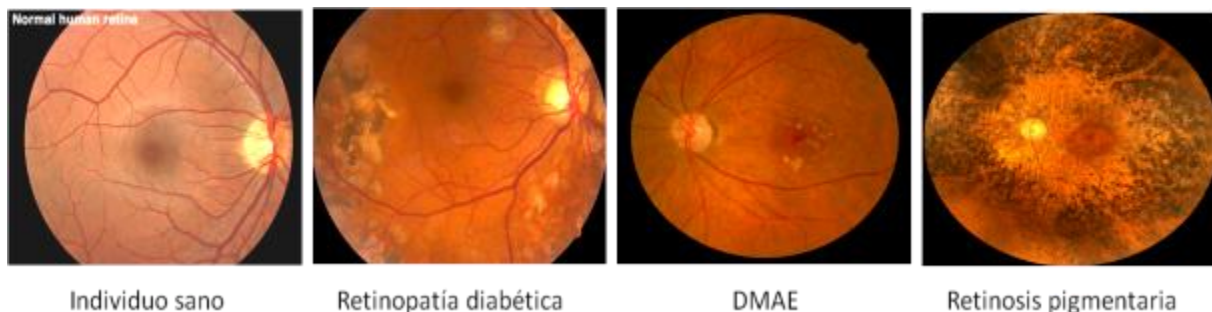


Figura 3. Fondo de ojo. Imágenes de tomografía de coherencia óptica (OCT) que muestran las alteraciones que causan sobre la retina las diferentes patologías.

Ensayos clínicos

Análogamente a otros tejidos altamente especializados, la retina ha perdido la capacidad de regenerarse, por lo que cualquier alteración patológica a nivel de la misma suele tener graves consecuencias [1][4]. Este hecho, ligado a la alta incidencia mundial de las alteraciones retinianas, ha llevado a la comunidad científica a investigar su etiología para desarrollar terapias regenerativas o paliativas para las mismas.

Por todo lo anterior, se hace notable la necesidad de modelos animales que desarrollen degeneraciones retinianas similares a las acusadas por el padecimiento de las enfermedades enumeradas anteriormente. El disponer de animales que padezcan este tipo de patologías, permite avanzar en el estudio de las causas de las mismas, así como en la búsqueda de nuevas terapias.

Actualmente las estrategias que se siguen para lo obtención de estos modelos animales están basadas en:

- Individuos transgénicos que portan genes mutados que causan las patologías [13]
- Inducción de la apoptosis mediante compuestos químicos [15][16]
- Daño mecánico de la retina mediante cirugía [17] o haz de láser [18][19][20]

Animales transgénicos

Existen cepas transgénicas de ratón que simulan diversas patologías de la retina humana. Estas cepas portan mutaciones en genes ortólogos u homólogos, dependiendo de la enfermedad, que son los responsables de las alteraciones fisiológicas que terminan en la degeneración de las capas de la retina.

Un ejemplo de ello son los ratones Rd8 (JAX®Mice), que presentan lesiones discretas por toda la retina ya que poseen una mutación puntual en el gen *Crb1* (*Crumbs homolog 1*) homólogo de *Drosophila melanogaster*, relacionado con la morfogénesis de los fotorreceptores [21]. Esta mutación en humanos parece estar relacionada con la aparición de retinosis pigmentaria [22]. También se dispone de ratones deficientes en la proteína ApoE que presentan acumulación de depósitos lipídicos en el epitelio pigmentario y en la membrana de Bruch, que imitan la patología de la degeneración macular asociada a la edad [12]. Finalmente, el modelo animal más utilizado es el ratón Rd10 (JAX®Mice). Este ratón desarrolla una degeneración progresiva de los fotorreceptores conforme avanza su edad al verse mutado el gen de la guanosín monofosfato cíclico fosfodiesterasa 6B (PDE6B) de los fotorreceptores, participe en la generación del impulso nervioso [23]. Dado que la

degeneración comienza en la capa de los fotorreceptores es utilizado como modelo para la retinosis pigmentaria [12].

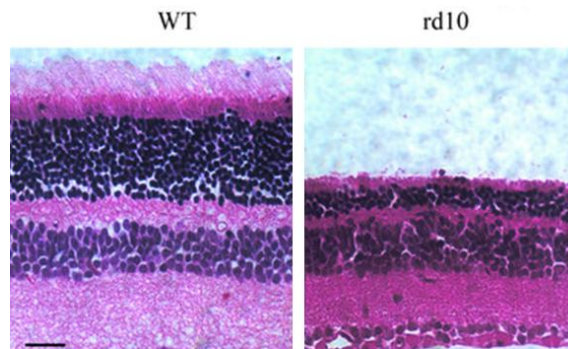


Figura 4. Cortes histológicos de retinas teñidas con hematoxilina-eosina. A la izquierda, la retina de un ratón *wild type* C57BL/6J de tres meses. A la derecha, la retina de un ratón transgénico rd10 de 24 días, donde se puede observar la disminución de la capa de los fotorreceptores. Imagen tomada de [14]. Escala: 20 μ m.

Inducción de apoptosis por químicos

La inducción de una alteración en la retina inyectando compuestos químicos ha sido ampliamente estudiada [15]. El mecanismo de acción de estos compuestos cursa generalmente con la alteración de los niveles fisiológicos de iones, ya que el mantenimiento de esta alteración a largo plazo provoca la activación de la vía apoptótica de las células.

Los fármacos de uso más extenso son el glutamato y/o el NMDA (N-metil-D-aspartato) [15][16] que son inyectados en la cavidad vítrea o en la región subretiniana según la necesidad del estudio. Estos compuestos estimulan los receptores de NMDA de la superficie celular. Consecuentemente, la sobreestimulación de estos receptores genera una sobrecarga de calcio intracelular que provoca un daño excitotóxico que lleva a la célula a la muerte [15].

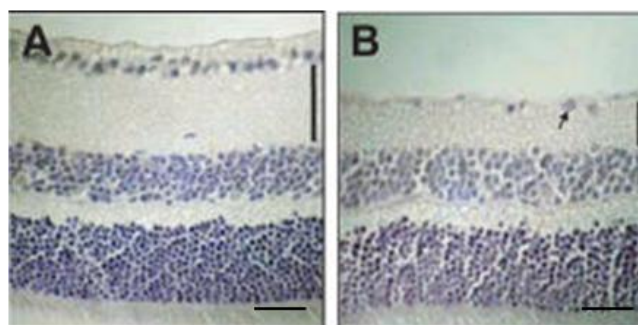


Figura 5. Imágenes de retina de ratón 7 días después de la inyección intravítrea de NMDA. Tinción de Hematoxilina-eosina. A) Retina sana. B) Se observa la reducción de la capa plexiforme interna y las células ganglionares (flecha) [16]. Escala: 25 μ m.

Lesiones mecánicas

La axotomía implica la lesión del nervio óptico mediante su sección o aplastamiento total o parcial. Este método quirúrgico es utilizado para provocar la apoptosis de las células de la retina, más concretamente de las neuronas ganglionares [17].

Por otro lado, el impacto de un haz de láser de determinada longitud de onda es capaz de provocar un deterioro en la retina [24][25]. Las longitudes de onda más utilizadas para generar estos modelos se encuentran en la región verde del espectro visible (495-570 nm). Para efectuar la lesión en la retina se emplean láseres quirúrgicos de gran precisión que permiten controlar la intensidad y potencia del haz además de visualizar el lugar de impacto del mismo [26][27]. Estas características han hecho que este procedimiento sea cada vez más utilizado ya que es adaptable al tipo de ensayo y se puede realizar en animales *in situ*.

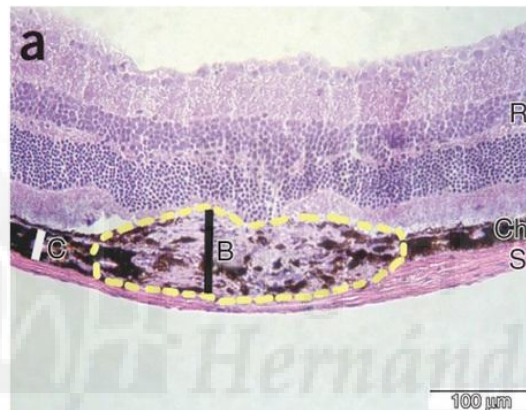


Figura 6. Sección de retina dañada tras lesión con láser. Tinción hematoxilina-eosina. La lesión está delimitada por la línea discontinua. Las barras indican el grosor de la lesión (B) y el grosor de la coroides sana (C). R, retina; Ch, coroides; S, esclera [18].

Sin embargo, todos estos modelos presentan algún tipo de inconveniente. Por ejemplo, los animales transgénicos tienen un elevado coste, además de que en algunos casos la destrucción de la retina ocurre con demasiada rapidez. Por otro lado, tanto la inyección intravítrea como la subretiniana de compuestos excitotóxicos pueden causar daños mecánicos que influyan en el estudio. Por último, aunque la lesión con un haz de láser tiene múltiples ventajas, el precio de los equipos quirúrgicos hace que este tipo de técnica no sea accesible para todos los laboratorios de investigación.

Además, una de las características ideales que buscamos en estos modelos animales, es su adaptabilidad o modelación en función de las necesidades de cada ensayo. Variables como la

localización de la lesión, las capas que se ven afectadas o el tamaño de la misma, deben ser moldeables en función de la patología que se quiera simular.

Es por esto que proponemos una metodología de lesión con haz de láser capaz de adaptarse a las necesidades de cada estudio y económicamente más accesible. Para tal fin, se ha estudiado la modelación y evolución de una lesión de retina empleando un láser de 532nm más asequible que los empleados actualmente y de amplia distribución en el mercado. Además, se ha profundizado en el estudio de un protocolo de lesión, que simula en ratones C57BL/6, la muerte de los fotorreceptores que se da en diversas patologías humanas [4].



Antecedentes

Los diferentes protocolos para dañar la retina con un haz de láser fueron empleados por primera vez en 1979 cuando Stephen J. Ryan creó un nuevo modelo de neo-vascularización coroidea (CNV) en mono (*Macaca speciosa*) [20]. Más tarde en 1998, Tobe *et al* utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresaban el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y desarrollaban CNV para ensayar compuestos antiangiogénicos (agente químico o biológico que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) [28].

Salinas-Navarro *et al* en su artículo de 2009 "**Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice**" utilizaron un láser quirúrgico de diodo de 532nm y 0,3W (Quantel Medical) para causar hipertensión ocular mediante la fotocoagulación de las venas límbicas y episclerales. En este estudio los ratones fueron sometidos en una única sesión a 72 pulsos de 0,5s de duración; el diámetro del punto de incidencia estaba entre 50 y 100µm. Como consecuencia de la fotocoagulación la presión intraocular se dobló respecto a su nivel basal, dañando las células ganglionares y con ellas, el transporte axonal retrógrado que se vio reducido en un 75%.

Recientemente, Lambert *et al* en el artículo "**Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice**" (2013) establece un protocolo de lesión utilizando un láser de Argón quirúrgico. En este estudio buscaban perforar la membrana de Bruch con la intención de formar nuevos vasos sanguíneos subretinales desde la coroides. Obtenían así un modelo animal de degeneración macular húmeda. Para ello se sirvieron de un solo impacto con un láser de 532nm de longitud de onda, 0,34W de potencia y una magnificación del haz de x30. El diámetro del punto de incidencia era de 50µm y la duración del pulso de 0,05s. En sus "resultados anticipados" Lambert *et al* aseguraron que la formación de nuevos vasos comienza a apreciarse en los cinco primeros días tras la lesión y remite después del día 21.

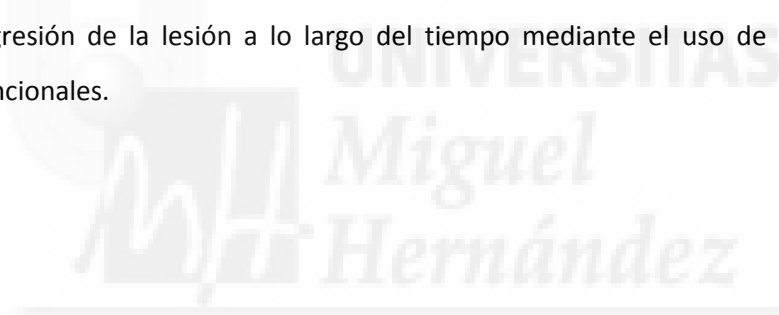
Por último, Zhu *et al* (2014) también trató de inducir neovascularización en ratones silvestres C57BL/6 mediante la ruptura de la membrana de Bruch en el artículo "**Improvement and Optimization of Standards for a Preclinical Animal Test Model of Laser Induced Choroidal Neovascularization**". En este estudio emplearon un láser de diodo OcuLight GL (Iridex) de 532nm y 100mW de potencia. Como resultado final observaron una mayor neovascularización en hembras que en machos. Además esta también aumentaba cuanto más cerca del nervio óptico se encontraba, produciéndose el mayor incremento del área neovascularizada 14 días tras la lesión.

Objetivos

Expuesta la carencia de modelos más asequibles para la investigación ocular, el propósito de este trabajo es establecer y caracterizar un modelo de degeneración retiniana empleando un haz láser de amplia accesibilidad en el mercado. Basándonos en la bibliografía existente, para tal fin se han empleado roedores *wild type* como individuos y un haz de láser de 532nm como efector del daño.

Mediante numerosos impactos de laser sobre las retinas se pretende degradar la capa de los fotorreceptores, creando así, un modelo animal de enfermedades retinianas como la retinosis pigmentaria o la degeneración macular asociada a la edad. Además, se moldearán diferentes variables para dar lugar a metodologías de lesión que simulen estas enfermedades y/o grados de las mismas.

La caracterización de estas lesiones es un requisito indispensable para su utilización en ensayos farmacológicos de compuestos regenerativos/paliativos en desarrollo. Es por esto que se evaluará la progresión de la lesión a lo largo del tiempo mediante el uso de diferentes técnicas histológicas y funcionales.



Métodos

Características del láser y hardware de activación

Para inducir la lesión en la retina se utilizó un haz de láser verde con las siguientes especificaciones:

Longitud de onda	Voltaje de funcionamiento	Voltaje de salida	Corriente
532 +/- 10 nm	3,7 – 4,4 V	50 mV	<200 mA

Tabla 1. Características del láser.

Dado que se trataba de un láser focalizable, se estableció el tamaño óptimo del punto de incidencia (spot) y la distancia de enfoque respecto al ojo. Así, el tamaño del spot se fijó en 1 mm y la distancia de mayor enfoque en 5,5 cm.



Figura 5. Imagen del láser de 532 nm utilizado.

Para controlar el láser electrónicamente se conectó a un sistema electrónico compuesto por un relé conectado al puerto paralelo de un equipo informático. Dicho relé suministra o no corriente al láser dependiendo de las instrucciones programadas en un archivo Python. Este programa se modificó en función de los requerimientos de cada ensayo en referencia a la duración del pulso y el tiempo entre pulsos.



Figura 6. Imagen del sistema electrónico LCU (Laser Central Unit).

A fin de mantener la reproducibilidad de los experimentos, se fijó la posición de los animales en un novedoso sistema de retención construido a medida. Dicho equipo se adhirió sobre un sistema de orientación angular que permitía conocer en todo momento la posición exacta del láser.

Por otro lado, el láser se fijó con unas agarraderas y velcro a un soporte plástico para poder desplazarlo sobre la mesa de trabajo en función de las características de cada ensayo. Además se utilizaron diferentes objetos para modificar la altura del mismo y conseguir la correcta incidencia del haz de láser.

Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de diagnóstico, control y seguimiento, que nos permite el estudio de cortes histológicos de la retina *in vivo*. Se basa en la interferometría de baja coherencia. Los rayos reflejados por las estructuras oculares son analizados por un detector y el resultado se interpreta en una escala de color, donde podemos observar las distintas capas de la retina.

El equipo utilizado fue Heidelberg Engineering Spectralis® OCT Plus (Fig.7). Este equipo consta de tres láseres de distintas longitudes de onda (infrarrojo≈815nm, azul≈488nm y verde≈518nm) que proporcionan información procedente de las diferentes estructuras y a distintos niveles de la retina.



Figura 7. Imagen de un equipo de OCT Heidelberg Engineering Spectralis®.

Antes de ejecutar la lesión se llevaron a cabo estudios de OCT en los animales para comprobar que no existieran daños previos en la retina. Del mismo modo, se realizó de nuevo el

examen tras la exposición al láser para verificar la presencia de la lesión. Además, se efectuó un seguimiento de la misma realizando exámenes de OCT cada 3 días.

Para practicar el examen es necesaria la dilatación de la pupila del animal con 1% tropicamida (COLIRCUSÍ®, Alcon Cusí, S.A, El Masnou, Barcelona) y la colocación de una lente en el ojo a examinar, con el objetivo de obtener imágenes de mayor calidad. Tras cada análisis se aplicó gel oftálmico (Lipolac®, Angelini Farmacéutica, S.A., Barcelona, España) en ambos ojos para evitar su desecación.

Estudio de la lesión in vivo

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en concordancia con la normativa Europea y Española reguladora del uso de animales en investigación.

Se utilizaron ratones adultos C57bl/6 como animales de experimentación, procedentes de la colonia de cría del Servicio de Experimentación Animal de Elche de la Universidad Miguel Hernández. Los animales se mantuvieron siguiendo un ciclo de 12h:12h (luz-oscuridad) y tuvieron suficiente comida y agua *ad libitum*.

Tanto los ensayos para realizar la lesión con el haz de láser, como el análisis de las estructuras de la retina por Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) fueron realizadas bajo anestesia general. Para tal fin se procedió a la inyección intraperitoneal de ketamina (70mg/kg, Ketamidol®, Richter pharmag, Wels, Austria) y xilacina (10mg/kg, Xilagesic®2%, CALIER, S.A, Barcelona, España). El electroretinograma fue también realizado bajo anestesia general, pero en este caso con una combinación de ketamina y medetomidina (1mg/kg, SEDIN®, Vetpharma Animal Health, S.L, Barcelona, España). Todas las anestias fueron realizadas previa sedación con isoflurano (IsoFlo®, Abbot Laboratories Ltd, Barcelona, España) para evitar movimientos durante la inyección. Transcurridos 15 ó 30 días de la lesión, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Metodología de lesión

En primer lugar los animales fueron pesados en una báscula SALTERelectroscale®, para calcular la dosis de anestesia necesaria. A continuación, se les dilató la pupila con tropicamida al 1% para favorecer la incidencia del haz en la retina. En cada sesión de lesión, se efectuaron 70 impactos

de 1s de duración y con un tiempo entre pulsos de 0,5s. El láser fue situado en un ángulo de 70° respecto de la horizontal, modificable según los requerimientos del estudio.

A fin de demostrar la capacidad de modelado del ensayo, se definieron 3 grupos de animales. Los grupos fueron situados a diferentes distancias del origen del haz de láser con el objetivo de obtener lesiones de distinta gravedad.

- Grupo I: distancia de 10,5 cm entre el láser y el ojo.
- Grupo II: distancia de 7,5 cm entre el láser y el ojo.
- Grupo III: distancia de 5,5 cm entre el láser y el ojo.

Electroretinograma (ERG)

A fin de comprobar si las lesiones realizadas alteraban la visión de los individuos se les realizaron exámenes electroretinográficos que valoran la funcionalidad retiniana. El electroretinograma consiste en el registro de los cambios de potencial eléctrico en la retina tras un estímulo luminoso [28]. En la ejecución de este ensayo se siguió el estándar para electroretinografía del ISCEV (2008) [29].

Para realizar el registro los ratones fueron adaptados a la oscuridad durante al menos 2 horas para que todas las neuronas retinianas presentaran el potencial eléctrico basal. A continuación, las pupilas fueron dilatadas con tropicamida para maximizar la cantidad de luz que alcanzaba la retina y así obtener mayor estimulación. El animal anestesiado fue introducido en una caja de Faraday. En el interior de dicha caja el campo electromagnético es nulo para evitar las interferencias de campos externos en la obtención de datos. Para optimizar el registro electrofisiológico y preservar la superficie de la cornea de la desecación, se administró tópicamente Methocel® (Ciba VisionAG) al 2% en cada ojo.

Para detectar las respuestas de las células se colocaron dos electrodos de oro, uno en cada ojo. Además, se introdujo el electrodo de referencia en la cavidad bucal y el electrodo de tierra de forma subcutánea en la cola. Todos los procedimientos fueron realizados bajo luz roja para evitar la estimulación de la retina y que los potenciales basales se vieran alterados.

La señal electrofisiológica registrada fue amplificada x1000 y filtrada con un amplificador (Differential AC Amplifier 1700, AM Systems, WA, U.S.A) y digitalizada con un sistema de adquisición de señales PowerLab 4/25T (ADInstruments Ltd., Oxfordshire, Reino Unido) (Figura 7). En el análisis

se utilizó un filtro de paso alto de 500Hz y un filtro de paso bajo de 0,1Hz. Además, el sistema de adquisición de señales es el encargado también de ejecutar el estímulo lumínico.

Para conseguir una iluminación uniforme los LEDs de estimulación fueron colocados en el interior de una pantalla de Ganzfeld. Dicha pantalla consiste en una semiesfera que permite que la iluminación de la misma se distribuya de forma homogénea por todo su interior.

Tanto para la representación gráfica de las señales registradas como para el control del estimulador luminoso se empleó el software comercial Scan® for Windows del PowerLab.

En concreto, con la electroretinografía se detectan los pulsos eléctricos generados por los dos tipos de fotorreceptores, conos y bastones, responsables del inicio de la fototransducción. Se llevaron a cabo dos tipos de estimulación para examinar la funcionalidad de la retina. En primer lugar se evaluó la función de los bastones operando en condiciones de baja iluminación (condiciones escotópicas) o nocturnas. Tras esto, se procedió a valorar la respuesta combinada de los bastones y los conos en condiciones luminosas (condiciones fotópicas), ya que los conos solo se activan con intensidades de luz altas y moderadas (condiciones diurnas).

Respuesta escotópica

Se registraron las respuestas de los bastones y la combinada de conos y bastones, a flashes de luz LED blanca. Para inducir la respuesta escotópica de los bastones el estímulo consistió en flashes tenues de $0,01\text{cd/m}^2$ durante 20s repetidos 10 veces. En el caso de la respuesta combinada, se utilizó 10 repeticiones de 20s de flashes de luz intensa (3cd/m^2) para inducirla.

Respuesta fotópica

Tras el ensayo escotópico, el animal fue adaptado a la luz tenue (30cd/m^2) durante cinco minutos para registrar la respuesta fotópica. En este ensayo se detectan dos respuestas diferentes, la respuesta de conos y la respuesta Flicker. El patrón de estímulo para el análisis de la respuesta fotópica de conos consistió en estímulos luminosos de $3\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ durante un segundo repetido 20 veces. El estímulo en la respuesta Flicker fue igual al utilizado en la inducción de la respuesta fotópica de conos con una frecuencia de 22 Hz (22 flashes en un segundo) repetido 20 veces.

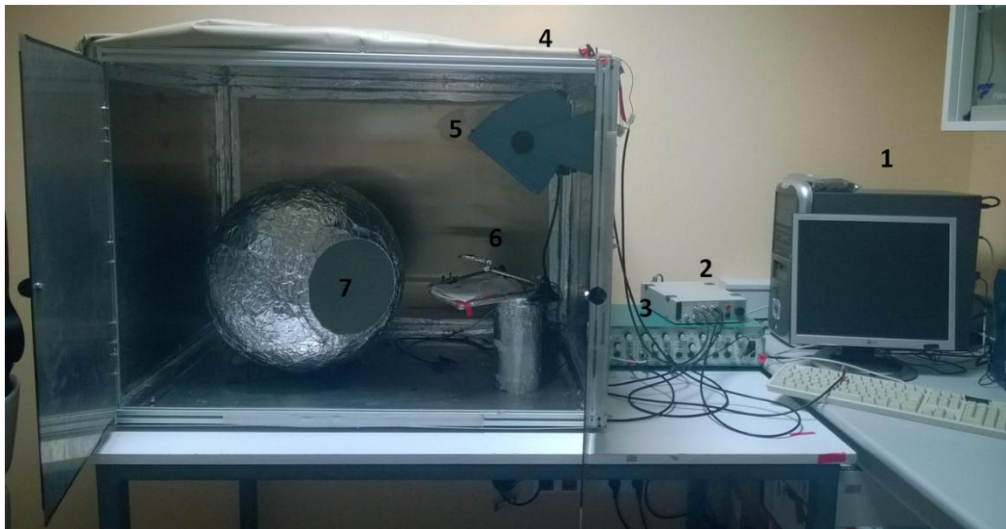


Figura 8. Equipo de electroretinograma. En la imagen se pueden observar el equipo informático (1), el sistema de adquisición de señales (2), el amplificador/filtro (3), la caja de Faraday (4), la fuente de iluminación roja (5), los electrodos (6) y la pantalla de Ganzfeld con el sistema de luces LED en su interior (7).

Inclusión y seccionado del tejido

Tras el sacrificio de los ratones, los ojos fueron fijados durante 90 minutos en PF (paraformaldehído) al 4%, realizándoles una incisión en la córnea para favorecer la penetración del mismo. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón fosfato (PB) 0,1M para eliminar el PF y se procedió a su inclusión en parafina.

- Retirar el PB y comenzar con la deshidratación del tejido:
 1. Alcohol 70% durante 45 minutos.
 2. Alcohol 80% durante 45 minutos.
 3. Alcohol 90% durante 45 minutos.
 4. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 5. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 6. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 7. Xileno durante 45 minutos.
 8. Xileno durante 45 minutos.
 9. Xileno durante 45 minutos.
 - Tanto los alcoholes como el xileno fueron desechados en el contenedor de alcoholes y manipulados en la vitrina de extracción de gases (AIRFLOW-CONTROL EN 14175, Schneider).

- Una vez terminada la deshidratación, comenzar con la inclusión en parafina:
 1. Incubar ambos ojos durante 45 minutos en Parafina I (Surgipath®) a 56°. Extraer la Parafina I.
 2. Incubar 45 minutos en Parafina II a 56°. Extraer de Parafina II
 3. Situar el tejido en la orientación correcta dentro de los soportes plastificados, rellenar de parafina y dejar solidificar en el equipo de inclusión (Myr®).

Finalmente, para realizar el seccionado del tejido ya procesado, se utilizó un microtomo Microm® Heidelberg. El grosor de los cortes fue de 7µm y se utilizaron portaobjetos pretratados con TESPA (3-aminopropil-trietoxisilano) para su almacenamiento.

Tinción Hematoxilina-Eosina

Este método consta de dos etapas, una primera etapa de hidratación y una segunda etapa de deshidratación. Con esta tinción se pueden diferenciar las células de los núcleos, ya que se tiñen de forma diferenciada. La hematoxilina (color morado) es un compuesto catiónico (carga positiva), por lo que tiene la capacidad de unirse a aniones (carga negativa) como el ADN, por lo tanto los núcleos se verán violeta. Sin embargo, la eosina (color rosa), al tratarse de un compuesto aniónico, se unirá a compuestos con cargas positivas, como el citoplasma celular, que se coloreará de rosa.

Los portaobjetos fueron colocados en cestillos de 25 portaobjetos e introducidos secuencialmente en cubetas de tinción de nylon verde con cada uno de los reactivos. El protocolo de tinción fue el que sigue:

- Etapa de hidratación:
 1. Xilol I durante 5 minutos.
 2. Xilol II durante 5 minutos.
 3. Alcohol 100% durante 3 minutos.
 4. Alcohol 96% durante 3 minutos.
 5. Alcohol 70% durante 3 minutos.
 6. Agua destilada durante 5 minutos.
 7. Hematoxilina durante 15 minutos.
 8. Agua destilada durante 5 minutos (x2)
 9. Eosina 1% durante 6 minutos.
 10. Agua destilada durante 3 minutos.

- Etapa de deshidratación:
 1. Alcohol 70% durante 3 minutos.
 2. Alcohol 96% durante 3 minutos.
 3. Alcohol 100% durante 3 minutos.
 4. Xilol I durante 3 minutos.
 5. Xilol II durante 5 minutos.

Tras la tinción, se aplicó medio de montaje Eukitt (akralab, Barcelona, España) sobre los cortes y se cubrieron con un cubreobjetos, con el objetivo de evitar su deterioro durante su almacenamiento.

Microscopía óptica y análisis de imágenes

La histología nos permite analizar las estructuras de las diferentes capas de la retina y la presencia de células desplazadas y/o muertas. Para la toma de imágenes de los cortes teñidos se eligió un microscopio óptico Olympus® AX70. Se tomaron imágenes a 4, 10 y 20 aumentos en cada uno de los cortes que presentaban la lesión.

En las imágenes de OCT se midió el diámetro de la lesión y la profundidad de la misma para evaluar su alcance. Para tal fin se utilizó el software libre ImageJ® (National Institutes of Health, USA) y el programa Microsoft Office Excel 2007. En este último se realizó un análisis estadístico, calculándose la media y la desviación estándar de las medidas tomadas de los animales de cada grupo. Además se calculó el área de la lesión y el porcentaje de retina dañado con respecto al área total.

Resultados

A continuación se detallan los resultados del análisis de la lesión en los tres grupos formados. En general nuestros resultados indican que la lesión se mantiene durante al menos un mes y que su área es mayor cuanto más cerca se encuentra el ojo del haz de láser.

Situación óptima del láser

Puesto que el láser utilizado era focalizable se procedió a determinar la distancia de mejor enfoque en el ojo, la cual se estableció en 5,5cm. Además, se ensayaron diferentes ángulos de incidencia del haz en la retina utilizando para ello el sistema de orientación angular diseñado. Se eligió el ángulo de 70° grados sobre la horizontal por ser el más adecuado para el posterior análisis por OCT de la lesión.

OCT e histología

Para efectuar el análisis de las lesiones producidas a diferentes distancias, se recurrió al examen con un equipo de tomografía de coherencia óptica (OCT) y al estudio histológico, del estado de las diferentes capas que conforman la retina. Además se procedió a su comparación con las imágenes obtenidas de animales control (Fig.9 y 10).

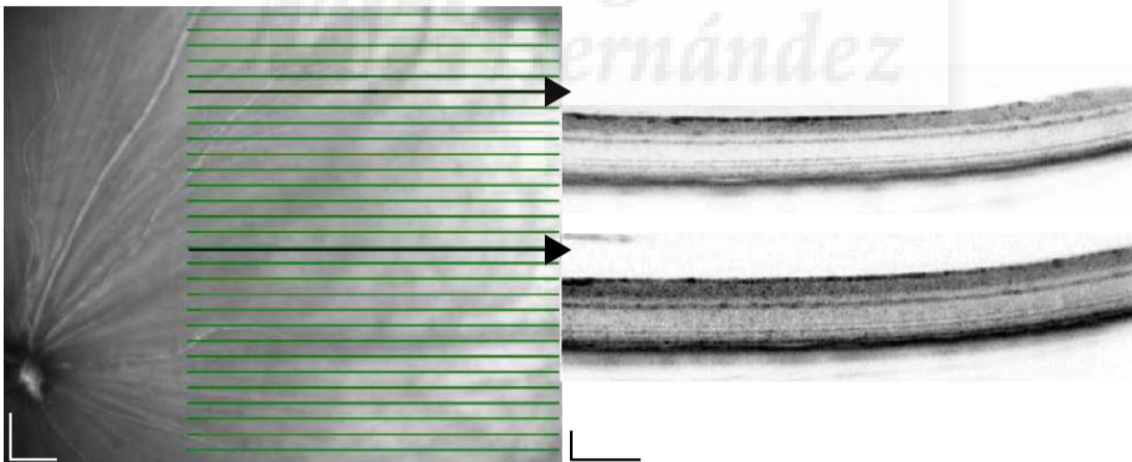


Figura 9. Imagen obtenidas por el equipo de OCT de un ojo control. A la izquierda se observa el fondo de ojo y a la derecha dos cortes transversales de la retina. Las flechas indican la posición del corte tomado. Escala: 100µm

Utilizando los diferentes modos de adquisición de imágenes del equipo de OCT se realizaron diferentes fotografías del fondo de ojo y la retina. Así, las imágenes generadas por el barrido del láser infrarrojo permiten ver el fondo de ojo, proporcionando información sobre la localización y forma de la lesión. Por otro lado, el modo multicanal del equipo de OCT utiliza el uso simultáneo de tres láseres (azul, verde e infrarrojo) para generar una composición de imágenes superpuestas. Dicha

composición posibilita visualizar los detalles estructurales de las distintas capas de la retina. Además, el equipo de OCT produce imágenes de cortes transversales de la retina *in vivo*. Esto permite generar un mapa de densidad en el que se observa el grosor de la retina en la zona dañada y la adyacente, además de valorar el tamaño de la zona afectada.

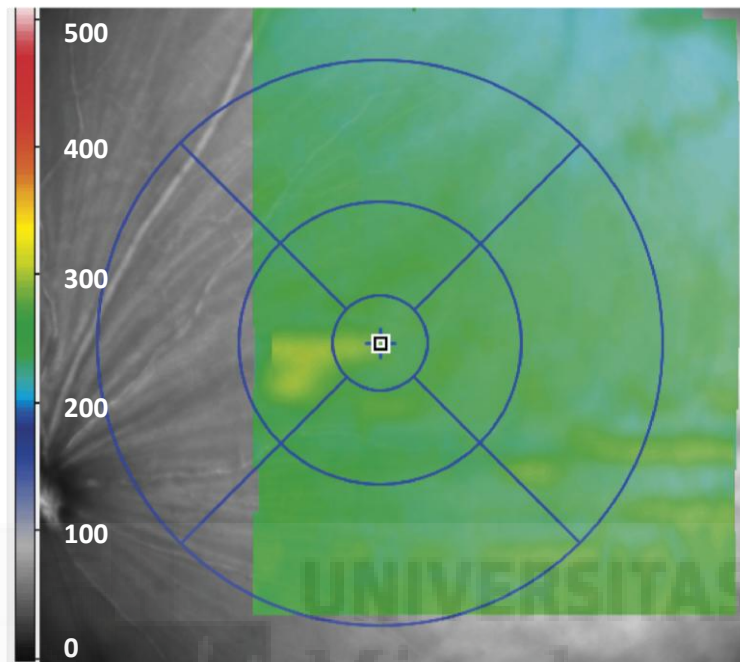


Figura 10. Mapa de densidad de la retina de un ojo control. A la izquierda de la imagen, a modo de escala de color se representa el grosor de la retina (μm) en la zona coloreada.

Por último, tras el sacrificio de los animales se preparó el tejido para su sección y tinción con hematoxilina-eosina. El análisis de la histología permitió estudiar cambios estructurales a nivel celular en la retina que no pueden observarse en los análisis por OCT.

- **Grupo I**

Para efectuar la lesión en los individuos del grupo I se situó el láser a 10,5cm de distancia del ojo. Realizada la lesión, se evaluaron los efectos de la misma mediante su seguimiento por tomografía de coherencia óptica. Las imágenes y resultados obtenidos se muestran a continuación.

Utilizando las imágenes obtenidas por OCT (Fig.13) se determinó el porcentaje de retina afectada respecto al área de retina total. Dicho porcentaje se encontraba entre 0,44% el tercer día tras la lesión, y 0,29% el día 30. La disminución en el porcentaje de retina afectada coincide con lo observado en el análisis de las imágenes multicanal generadas por el OCT (Fig.11). En tales imágenes podemos advertir la reducción en el tiempo del tejido inflamado (verde), encontrándose el día tres la máxima inflamación.

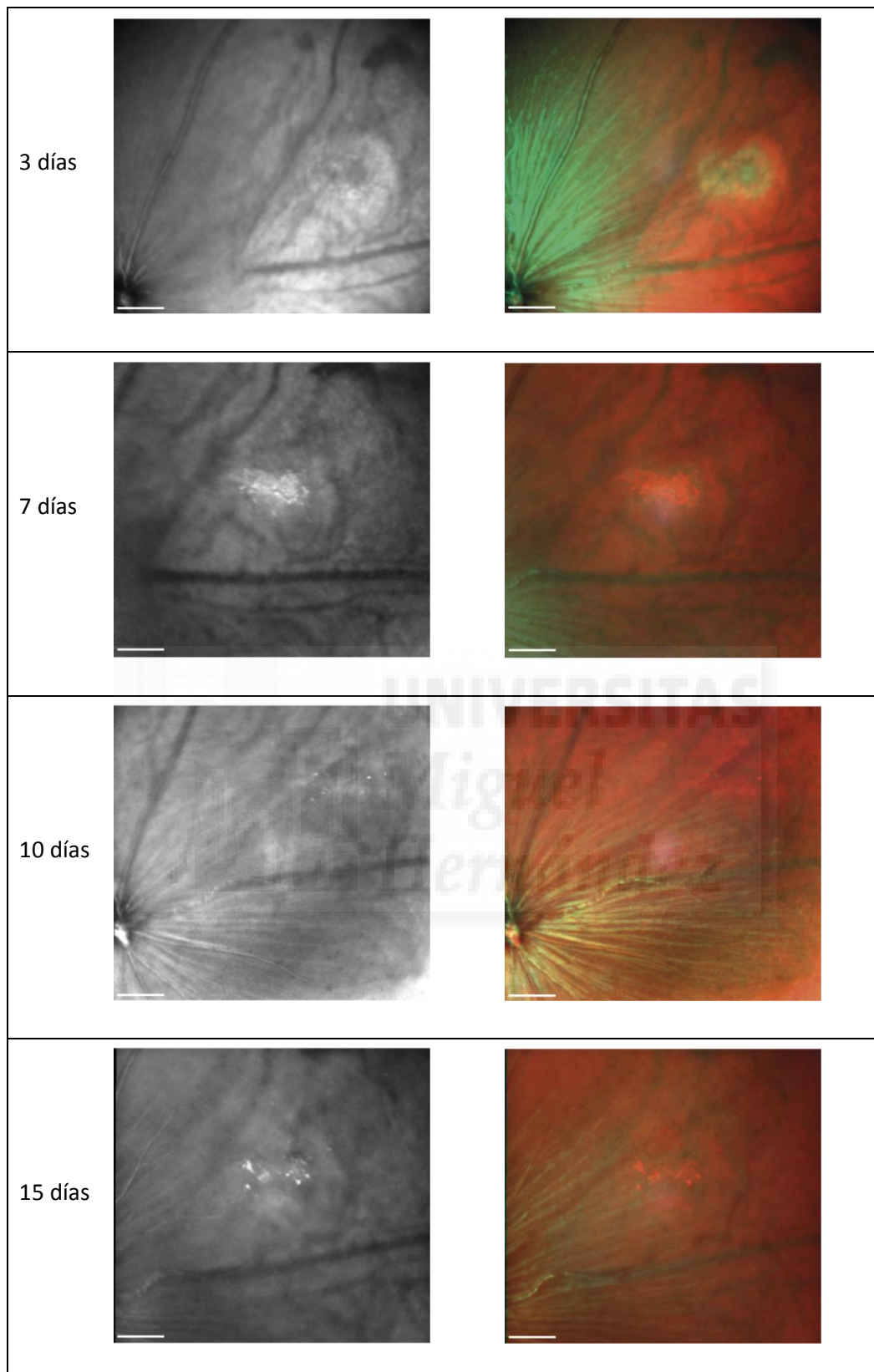


Figura 11. Evolución de la lesión con láser a 10,5cm. Imágenes tomadas por tomografía de coherencia óptica. A la izquierda se muestran las imágenes generadas por el uso del láser infrarrojo y a la derecha las imágenes multicanal. En las imágenes de multicanal se observa el descenso de la inflamación tras 3, 7, 10 y 15 días desde el día de lesión. Barra de escala: 200 μ m.

Además, el análisis de la lesión mediante microscopía óptica reveló cambios morfológicos generales en la retina. El impacto del haz de láser destruyó la capa de los fotorreceptores como se observa en la Figura 12.

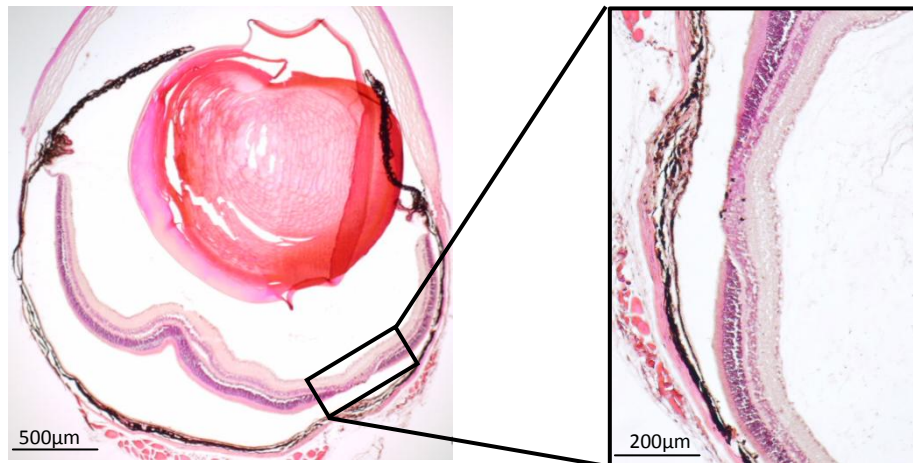


Figura 12. Imagen de microscopía óptica de un corte transversal de retina 15 días tras la lesión. Tinción de hematoxilina-eosina de una retina lesionada a una distancia del láser de 10,5cm.

Como análisis adicional se obtuvieron por OCT cortes transversales de la retina en el área dañada con los que se generaron mapas de densidad de la retina (Fig,13). En estos mapas de densidad se representa en una escala de color la profundidad de la retina en la zona de la lesión y la zona adyacente. Además, se muestran cortes transversales de retina junto a cada mapa de densidad correspondientes al centro del área afectada tras 7, 15, 21 y 30 días desde la lesión. En los mapas de densidad se observó como el grosor de la retina disminuía hacia el centro de la lesión (aproximadamente 100µm) mientras que se mantenía inalterado en el área circundante (200µm).

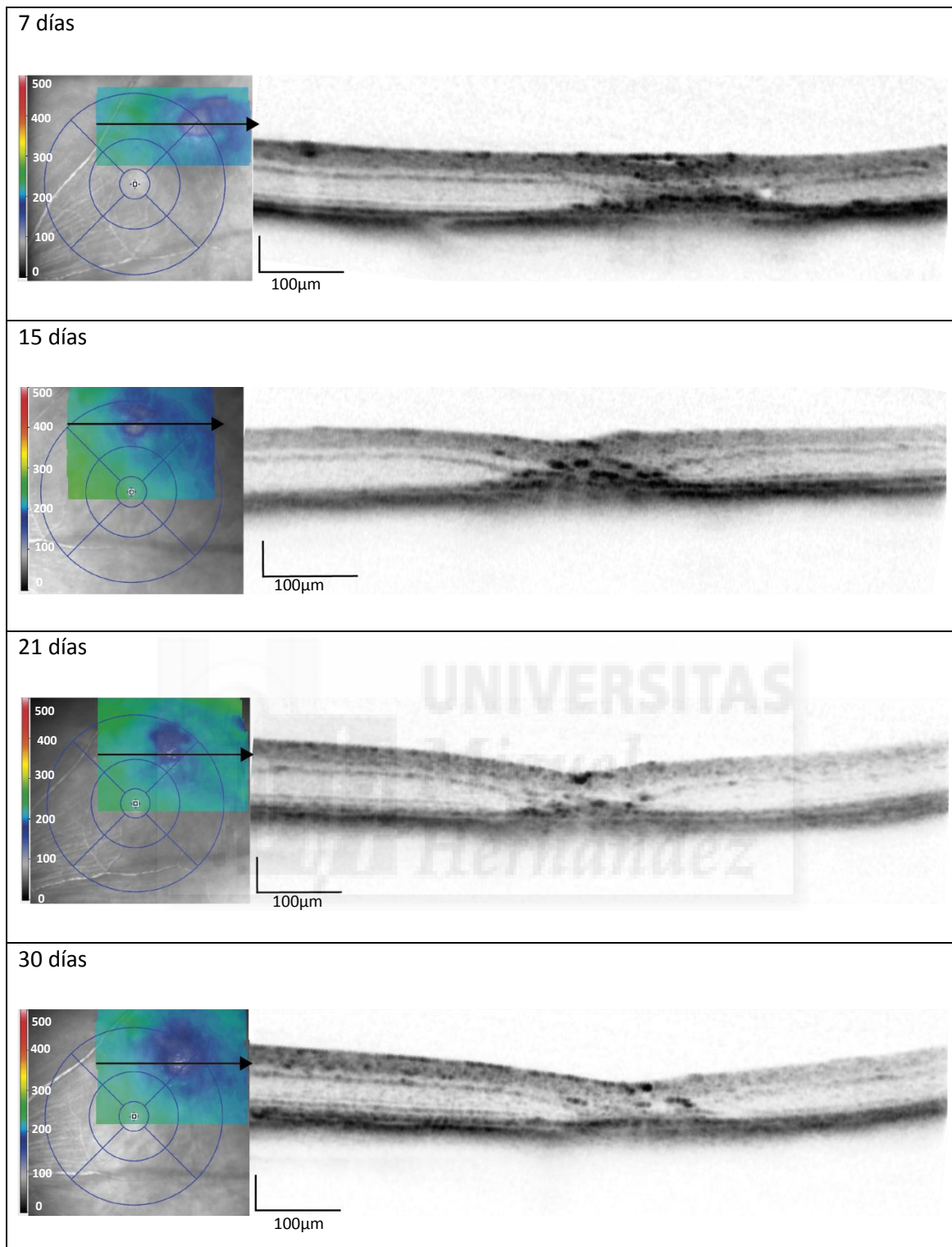


Figura 13. Evolución de la lesión realizada a 10,5cm. Cortes transversales de la retina *in vivo* a 7, 15, 21 y 30 días generados por el equipo de OCT (derecha). Mapa de densidad (izquierda) de la zona afectada y la circundante a la misma.

- Grupo II

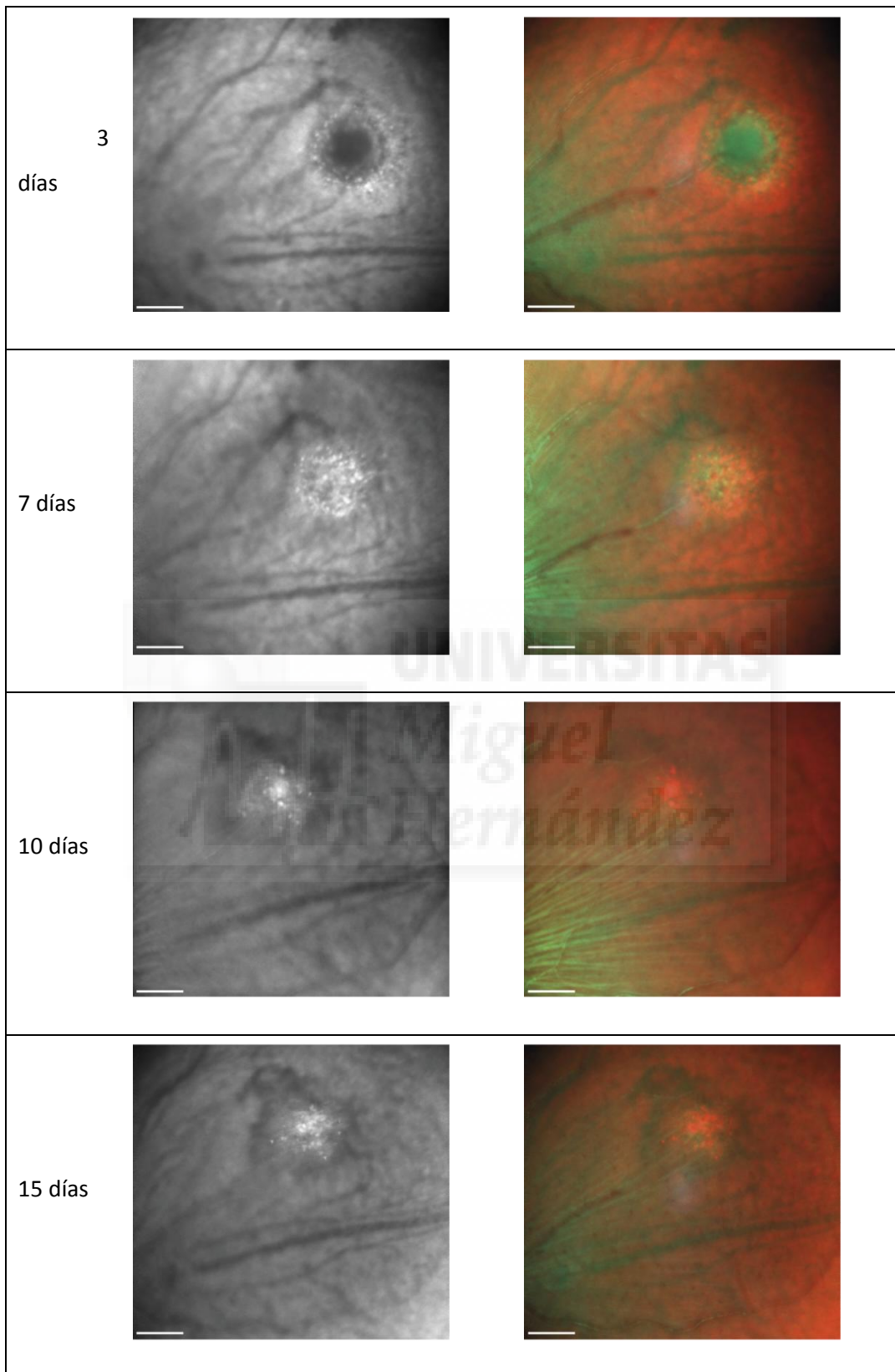


Figura 14. Evolución de la lesión con láser a 7,5cm. Imágenes tomadas por tomografía de coherencia óptica. A la izquierda se muestran las imágenes generadas por el uso del láser infrarrojo y a la derecha las imágenes multicanal a 3, 7, 10 y 15 días desde el día de lesión. Barra de escala: 200 μ m

Una vez los individuos del grupo II estuvieron inmobilizados en el sistema de sujeción, se situó el láser a una distancia de 7,5cm del ojo con una orientación de 70° sobre la horizontal. Tras esto, se efectuaron 70 impactos con el haz de láser de 1s de duración. Se realizó un seguimiento de la lesión con OCT en los 15 ó 30 días siguientes hasta el sacrificio, tras el cual se preparó el tejido para la histología.

Análogamente a lo sucedido en los individuos del grupo I, las imágenes obtenidas con multicanal demuestran una disminución en la inflamación del tejido en los días siguientes a la ejecución de la lesión (Fig.14).

En este caso el porcentaje de área afectada fue mayor que en los animales del grupo anterior, situándose en un rango entre 0,88% y 0,39%.

Se realizaron cortes de tejido ocular para su posterior tinción con hematoxilina-eosina. Dichos cortes fueron observados con el microscopio óptico obteniéndose las imágenes de la Figura 15. Como se puede observar el impacto con el haz de láser causó la pérdida de la capa de los fotorreceptores y la capa plexiforme externa .

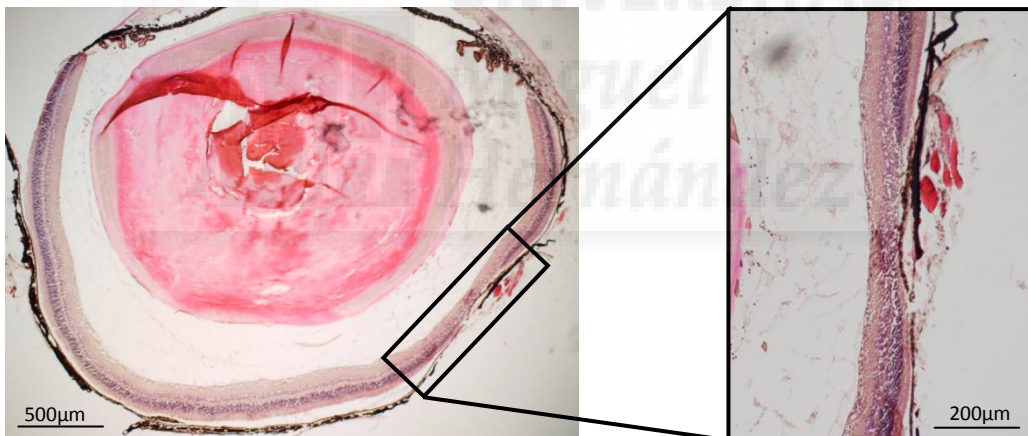


Figura 15. Imagen de microscopía óptica de un corte transversal de retina tras 15 días desde la lesión. Tinción de hematoxilina-eosina de una retina lesionada a 7,5cm.

En la figura 16 se muestran conjuntamente los mapas de densidad y el corte transversal de retina correspondiente al centro del área afectada tras 7, 15, 21 y 30 días desde la lesión. En el mapa de densidad se advierte, igual que en el grupo anterior, la disminución del grosor de la retina en el centro de la lesión (aproximadamente 100 µm).

A partir de las imágenes de cortes transversales de la retina se determinó el área afectada de la misma tras 7, 15, 21 y 30 días desde la lesión. Los valores obtenidos se muestran en la figura 20.

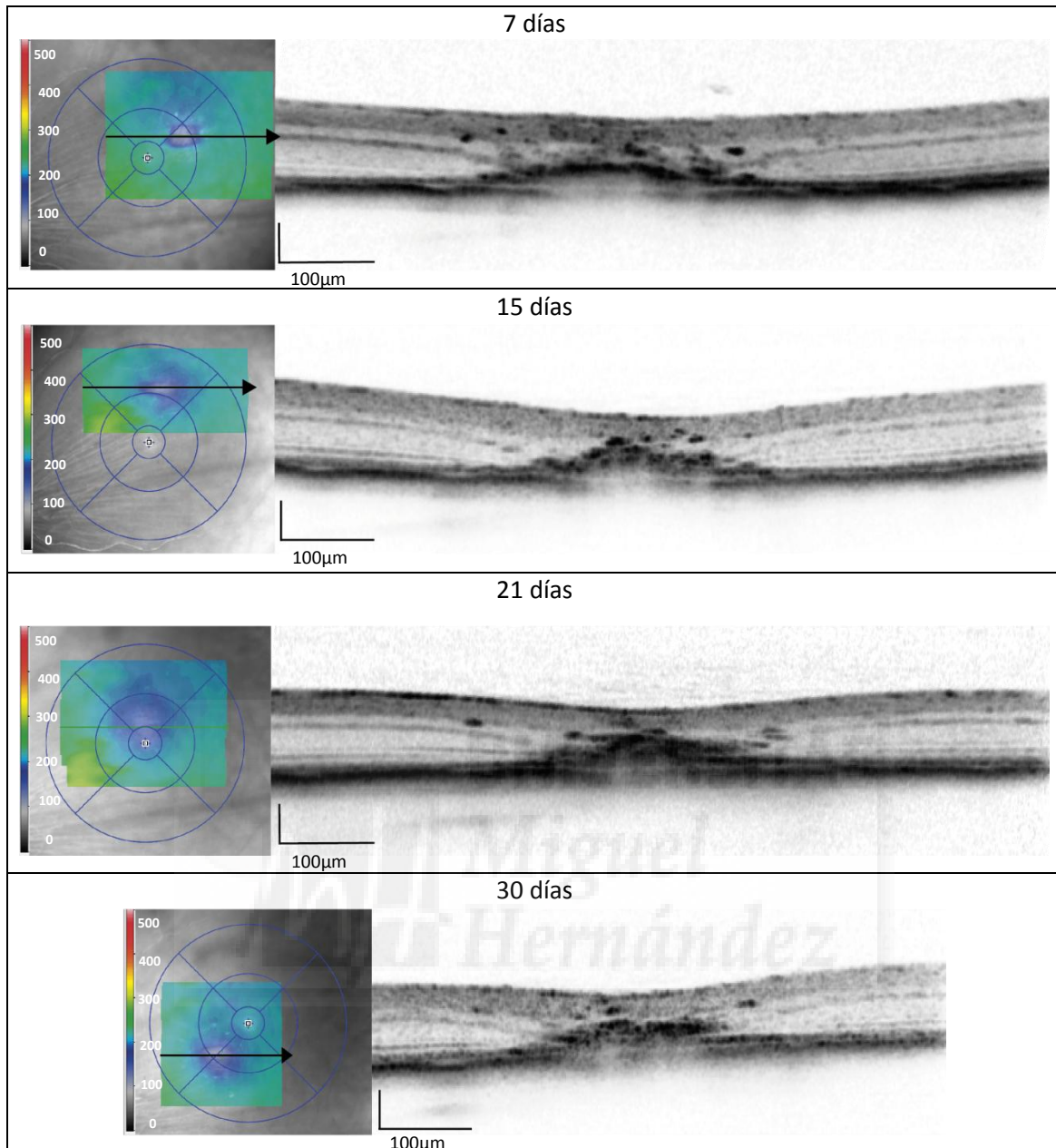


Figura 16. Evolución de la lesión realizada a 7,5cm. Cortes transversales de la retina *in vivo* a 7, 15, 21 y 30 días generados obtenidos por el equipo de OCT (derecha). Mapa de densidad (izquierda) de la zona afectada y la circundante a la misma.

- **Grupo III**

A los individuos del grupo III se les realizó la lesión colocando el láser a una distancia de 5,5cm del ojo, la menor de las distancias ensayadas y la de mayor focalización. Siguiendo el mismo protocolo que en los dos grupos anteriores se realizó el estudio de la lesión por OCT *in vivo*, y su histología tras el sacrificio a 15 días.

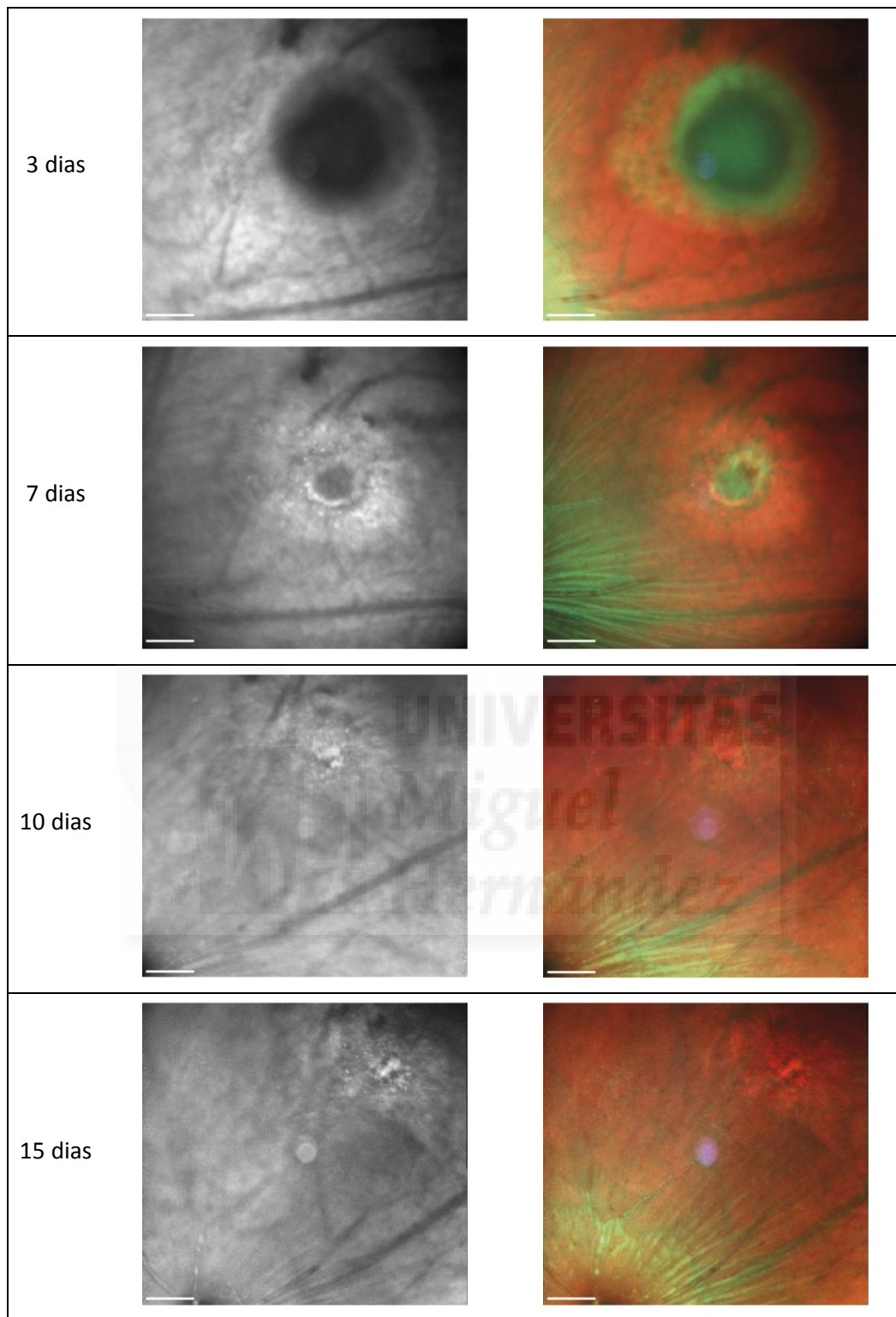


Figura 17. Evolución de la lesión con láser a 5,5cm. Imágenes tomadas por tomografía de coherencia óptica. A la izquierda se muestran las imágenes generadas por el uso del láser infrarrojo y a la derecha las imágenes multicanal a 3, 7, 10 y 15 días desde el día de lesión. Barra de escala: 200 μ m

Tal y como ya sucedió en los anteriores grupos, las imágenes multicanal reflejaron un marcado descenso de la inflamación del área irradiada con el láser. El porcentaje de área afectada evoluciono entre un 1,24% el tercer día y un 0,47% el día 30 tras la lesión.

En las imágenes de histología (Fig.18) se puede apreciar la pérdida de la capa de los fotorreceptores y la capa de la plexiforme externa. Además, se observan restos necróticos en la capa nuclear interna. Esto indica un mayor grado de lesión que en los otros dos grupos de ensayo.

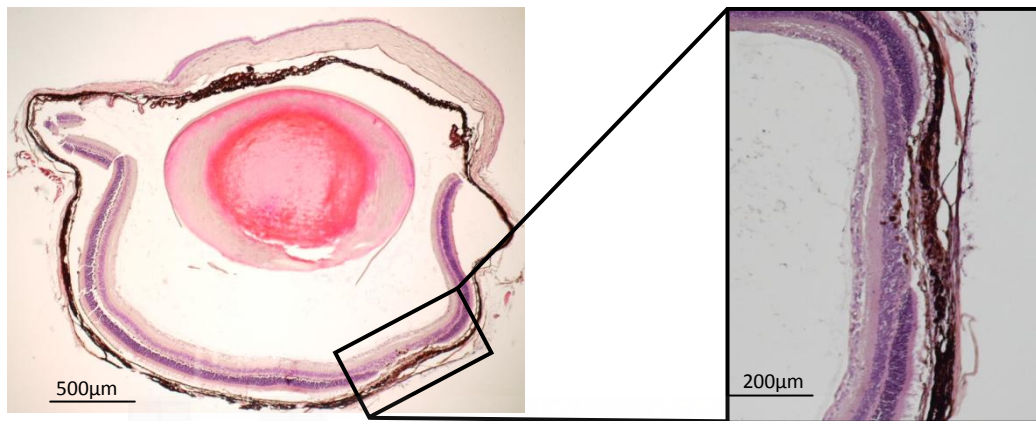


Figura 18. Imagen de microscopía óptica de un corte transversal de retina tras 15 días desde la lesión. Tinción de hematoxilina-eosina de una retina lesionada a 5,5cm.

En la figura 19 se muestran conjuntamente los mapas de densidad y el corte transversal de retina correspondiente al centro del área afectada tras 7, 15, 21 y 30 días desde la lesión. En el mapa de densidad se advierte la disminución del grosor de la retina en el centro de la lesión (aproximadamente 70 µm). En los cortes transversales de la retina se determinó el área de afectada y el alcance de la misma. Los resultados sobre la evolución y el área afectada se muestran en la figura 20.

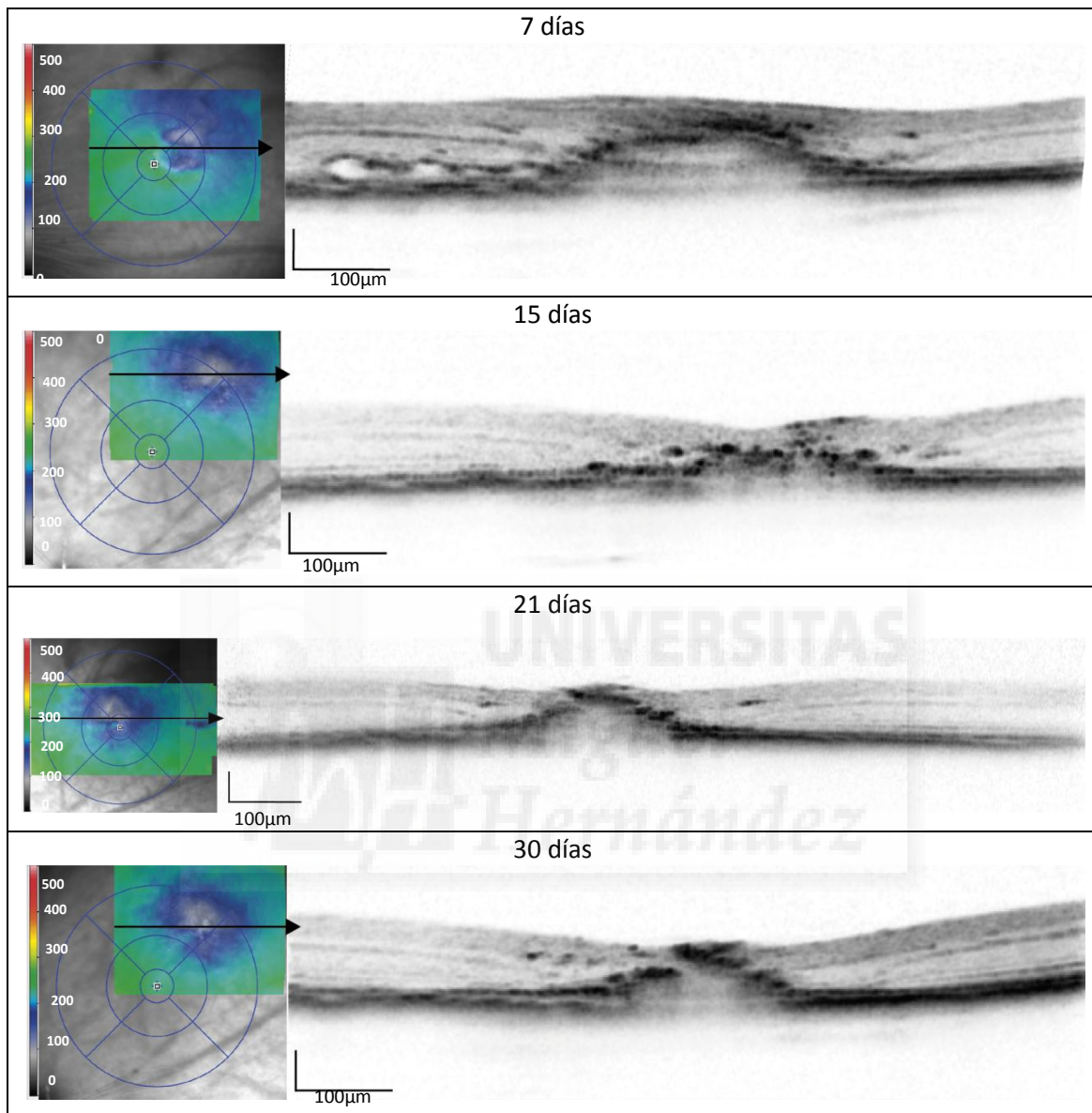


Figura 19. Evolución de la lesión realizada a 5,5cm. Cortes transversales de la retina *in vivo* a 7, 15, 21 y 30 días generados por el equipo de OCT (derecha). Mapa de densidad (izquierda) de la zona afectada y la circundante a la misma.

En la siguiente figura podemos ver una comparación del área afectada para las tres distancias ensayadas, 10,5cm, 7,5cm y 5,5cm. Las áreas de retina afectadas aumentaron cuanto menor era la distancia al ojo del láser. Como se puede observar, el tamaño de la zona afecta comienza a disminuir al tercer día tras la lesión, llegando a estabilizarse alrededor del día 21. La variabilidad de la respuesta inmunológica entre individuos explica porque el área inflamada en los primeros días tras la lesión varía entre los individuos de un mismo grupo.

Por otro lado, se advirtió que el grosor de la retina disminuía hacia el centro de la lesión, siendo más gruesa la retina en el perímetro de la lesión que en el centro. Este efecto es causado por el efecto fototérmico que produce el haz de láser. Este resultado concuerda por el obtenido por *Jain, A. et al* en su artículo "Effect of Pulse Duration on Size and Character of the Lesion in Retinal Photocoagulation" (2008).

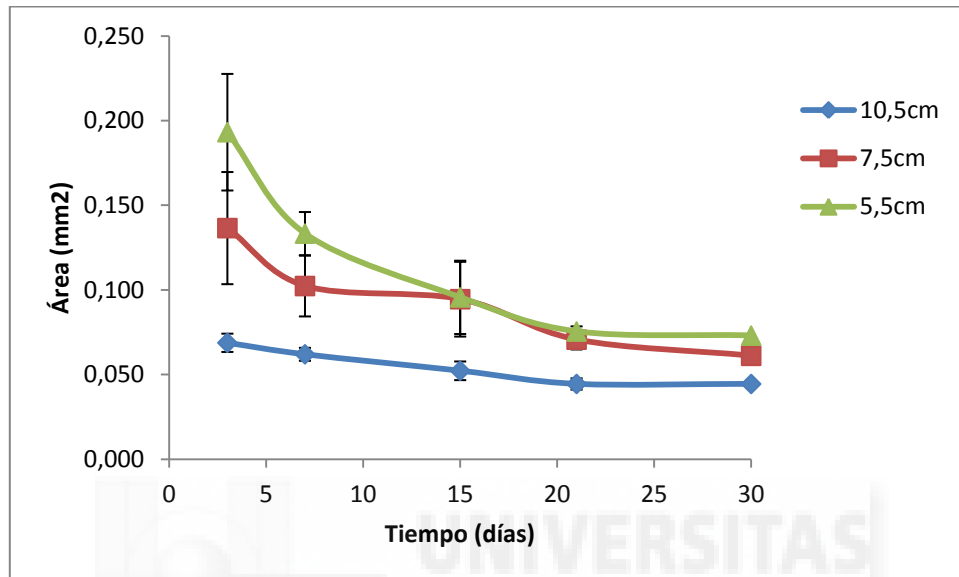


Figura 20. Evolución en el tiempo de las áreas afectadas con las tres distancias ensayadas.

Electrorretinograma

Con el objetivo de valorar la funcionalidad de las retinas dañadas se efectuaron electroretinogramas a los individuos lesionados tras 30 días desde la lesión. Mediante esta técnica se pudieron observar las respuestas de los conos y bastones ante estímulos luminosos en condiciones de luz (fotópicas) y oscuridad (escotópicas). Los resultados obtenidos en los animales lesionados fueron comparados con los obtenidos de individuos control (sin lesión).

Tanto en los individuos del grupo II como los del grupo III se produjo un aumento en la amplitud de la onda a del electroretinograma. Una búsqueda bibliográfica exhaustiva no ha logrado determinar a qué se debe este aumento. Por ello, se realizarán más ensayos para determinar la causa.

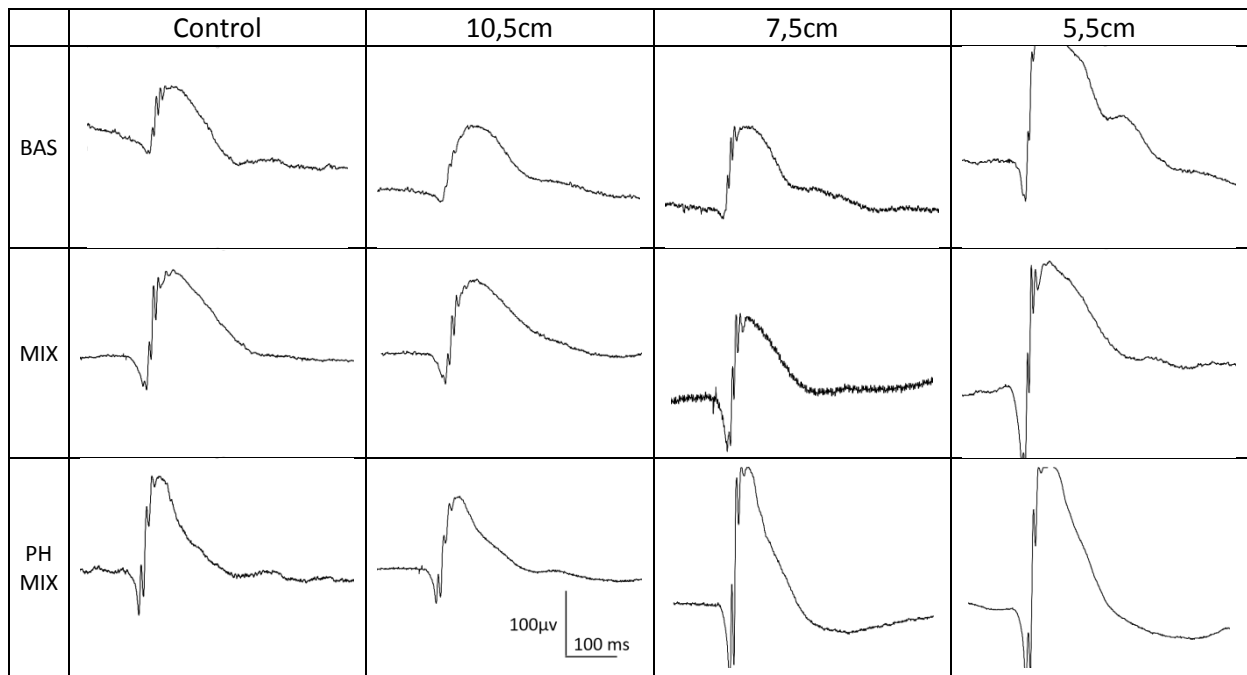
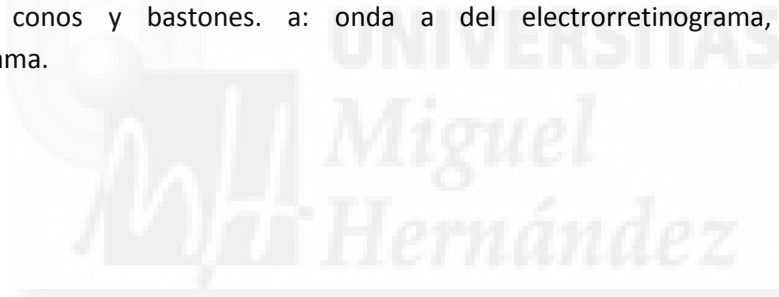


Figura 18. Electroretinogramas. En la figura se muestran los perfiles electroretinográficos obtenidos para cada grupo de distancias a los 30 días tras la lesión. BAS: respuesta escotópica de bastones, MIX: respuesta escotópica combinada de conos y bastones y PH MIX: respuesta fotópica combinada de conos y bastones. a: onda a del electroretinograma, b: onda b del electroretinograma.



Conclusiones

En los tres grupos se obtuvieron resultados satisfactorios, creando una lesión en la retina que se mantiene en el tiempo. En concreto, el haz de láser causa la muerte de la capa de los fotorreceptores y destruye la plexiforme externa, disminuyendo el grosor de la retina.

Además, esta lesión produce una inflamación en el tejido que va decayendo hasta normalizarse a los 21 días. La inflamación observada en las imágenes multicanal es producida por un infiltrado de células inmunes que llegan a la retina como consecuencia de una lesión aguda. Con el avance de los días desde el día de la lesión las células inmunes desaparecen y se produce una reorganización en las capas de la retina. Además, esta reducción del área inflamada concuerda con la reducción del área afectada observada en los cortes transversales *in vivo* de la retina.

Por otro lado, del análisis de los electroretinogramas se obtuvo como conclusión que sí existe una diferencia en la funcionalidad retiniana de los individuos del grupo II y III respecto a los individuos control. Sin embargo, hasta el momento no se determinó la razón.

Finalmente, tras el análisis de los resultados obtenidos llegamos a la conclusión de que los láseres de bajo coste son útiles en el desarrollo de lesiones degenerativas en la retina. Este novedoso resultado abre la puerta a la futura investigación de nuevos modelos generados con este tipo de equipos.

Bibliografía

1. Kolb, H., Fernández, E. y Nelson, R. Webvision The Organization of the Retina and Visual System. 1995. University of Utah Health Sciences Center.
2. Cajal, S.R. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. 1909, 1911. Translated into English as Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates (N. Swanson and L.W. Swanson, trans.). New York: Oxford University Press, 1995.
3. Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. y Wong, R.O.L. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2014; 42, 44–84.
4. Fernández, E. Cátedra de Investigación en Retinosis Pigmentaria “Bidons Egara”. Retinosis Pigmentaria: Preguntas y Respuestas. 2007.
5. Ernst & Young S.L. Informe sobre la ceguera en España. 2012.
6. Garcia, M., Hernández, C., Villarroel, M., Canals, F., Alonso, M.A., Fortuny, R., Masmiquel, L., Navarro, A., García, J., Simó, R. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy. *Diabetología*, 2009; 52 (12).
7. García, A. Degeneración macular asociada a la edad. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra*, 1998; 42 (1), 42-48.
8. Ventura, A. A. C. M., Dadgostar, H., & Taban, M. Diabetic retinopathy, 2014.
9. Gonzalez-Fernandez, F., Betts-Obregon, B., Yust, B., Mimun, J., Sung, D., Sardar, D., & Tsin, A. T. (2015). Interphotoreceptor retinoid-binding protein protects retinoids from photodegradation. *Photochemistry and Photobiology*, 2015; 91(2), 371-378.
10. Schwartz, S. D., Pan, C. K., Klimanskaya, I., & Lanza, R. Retinal degeneration, 2013.
11. Fain, G. L. Why photoreceptors die (and why they don't). *BioEssays*, 2006; 28(4), 344-354.
12. Fletcher, E.L., Jobling, A.I., Greferath, U., Millst, S.A., Waugh, M., Ho, T., de longh, R.U., Phipps, J.A. y Vessey, K.A. Studying Age-Related Macular Degeneration Using Animal Models. *Optometry and Vision Science*, 2014; 91, 8, 878-886.
13. Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., Heckenlively, J.R. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 2002; 42, 517–525.
14. Wang, K., Xiao, J., Peng, B., Xing, F., So, K., Tipoe, G. y Lin, B. Retinal structure and function preservation by polysaccharides of wolfberry in a mouse model of retinal degeneration. *Scientific Reports*, 2014; 4, 7601.
15. Zhang, J., Wu, S.M., Gross, R.L. Effects of beta-adrenergic blockers on glutamate-induced calcium signals in adult mouse retinal ganglion cells. *Brain Research*, 2003; 59, 111-119.

16. Schuettauf, F., Stein, T., Choragiewicz, T. J., Rejdak, R., Bolz, S., Zurakowski, D., Varde, M.A., Laties, A.M. y Thaler, S. Caspase inhibitors protect against NMDA-mediated retinal ganglion cell death. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2011; 39(6), 545-554.
17. Berkelaar, M., Clarke, D.B., Wang, Y.C., Bray, G. M. y Aguayo, A.J. Axotomy Results in Delayed Death and Apoptosis of Retinal Ganglion Cells in Adult Rats. *The Journal of Neuroscience*, 1994; 14(7), 4368-4374.
18. Lamber, V., Lecomte, J., Hansen, S., Blacher, S., Gonzalez, M.L., Struman, I., Sounni, N.E, Rozet, E., de Tulli, P., Foidart, J.M, Rakic, J.M. y Noel, A. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *NATURE PROTOCOLS*, 2013; 8, 11, 2197-2211.
19. Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., de la Villa, P. y Vidal-Sanz, M. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino swiss mice. *Molecular Vision*, 2009; 15, 2578-2598.
20. Ryan, S.J. The development of an experimental model of subretinal neovascularization in disciform macular degeneration. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 1979; 77, 707-745.
21. Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F., & Tepass, U. Crumbs, the drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, 2002; 416(6877), 143-149.
22. Den Hollander, A. I., Ten Brink, J. B., De Kok, Y. J. M., Van Soest, S., Van Den Born, L. I., Van Driel, M. A., Van De Pol, D.J.R., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Kellner, U., Hoyng, C.B., Westerveld, A., Brunner, H.G., Bleeker-Wagemakers, E.M., Deutman, A.F., Heckenlively, J.R., Cremers, F.P.M. y Bergen, A. A. B. Mutations in a human homologue of drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nature Genetics*, 1999; 23(2), 217-221.
23. Han, J. & Pang, J. Research progress in the treatment of retinitis pigmentosa degeneration with phosphodiesterase 6b gene mutation mouse. *Chinese Journal of Experimental Ophthalmology*, 2013; 31(7), 693-696.
24. Barkana, Y. y Belkin M. Laser eye injuries. *Surv Ophthalmol*, 2000; 44, 459-478.
25. Obeso, J.M. Láser y retina: longitudes de onda lesivas y efectos que producen (y II). *Gaceta óptica*, Julio/Agosto 2007, 20-26.
26. Belokopytov, M., Belkin, M., Dubinski, G., Epstein, Y. y Rosner, M. Development and recovery of laser-induced retinal lesion in rats. *The journal of retinal and vitreous diseases*, 2009; 10 (10).

27. Zhu, Y., Lu, Q., Shen, J., Zhang, L., Gao, Y., Shen, X. y Xie, Bing. Improvement and Optimization of Standards for a Preclinical Animal Test Model of Laser Induced Choroidal Neovascularization. *PLoS One*, 2014; 9, 4.
28. Tobe, T., Okamoto, N., Viores, M. A., Derevjanik, N. L., Viores, S. A., Zack, D. J., & Campochiaro, P. A. Evolution of neovascularization in mice with overexpression of vascular endothelial growth factor in photoreceptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1998; 39(1), 180-188.

