

**Universidad de Oviedo**  
**Departamento de Morfología y Biología Celular**

**DESARROLLO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES  
RETINIANAS FOTOSENSIBLES DEL RATÓN.  
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES EXTERNAS DE  
ILUMINACIÓN.**

**IRENE GONZÁLEZ MENÉNDEZ**

**Tesis Doctoral, 2010**



La presente tesis doctoral ha sido elaborada en el marco del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo y adscrita al programa de doctorado interdepartamental “Neurociencias”, siendo Irene González Menéndez beneficiaria del programa “Severo Ochoa” de ayudas predoctorales para la formación en investigación y docencia de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT).

Este trabajo ha sido financiado dentro del siguiente proyecto de investigación:

“Desarrollo postnatal y organización del sistema de fotorrecepción no visual de la retina de mamíferos” del Ministerio de Ciencia y Tecnología con referencia BFU2006-15576/BFI.



*A Nando,*

*Y es poco lo que tengo  
y todo te lo doy,  
el oro de mi tiempo  
para que te hagas un reloj,  
la flor de mis neuronas  
para que adornen tu pelo,  
y por supuesto, la Luna.*



Y ahora, tras finalizar la escritura de la Tesis llega el esperado momento de los agradecimientos. Y si bien es cierto que resumir cinco años de trabajo ha sido difícil, creo que intentar recordar en un par de páginas a todas aquellas personas de que de un modo u otro han participado en ella lo será aun más.

A los doctores José Manuel García Fernández y Rafael Cernuda Cernuda por la confianza depositada en mí y sobre todo, la oportunidad de realizar esta Tesis bajo su dirección. Gracias a los dos por vuestras enseñanzas, apoyo, ánimos y por todas las cosas que hemos compartido, incluidas bodas.

Al Gobierno del Principado de Asturias, FICYT, por la concesión de la beca predoctoral que me ha financiado durante la mayor parte del periodo de realización de esta Tesis Doctoral.

A todo el personal del Animalario de la Universidad de Oviedo, por su ayuda siempre que fue necesaria.

A Marta, la del confocal. Han sido muchas (muchas, muchas) las horas que he pasado en esa sala oscura, gracias por tu ayuda y por tener siempre una palabra amable hacia mis fotos.

A Felipe, por su inestimable ayuda durante los tres últimos años, especialmente por ayudarme a vigilar hembras preñadas en medio de la noche, y por hacer que el tiempo que pasamos en el laboratorio sea más agradable (a veces) con su “música”.

A mis compañeros del departamento (y acompañantes), porque después de estar tantas horas (y más) en el labo se convierten en parte de mi familia. Gracias a todos por vuestra amistad y por hacer de las comidas, cafés, cenas y demás un rato divertido. Quisiera aquí hacer una mención especial a David y Eva, ¡os voy a echar un mundo de menos!

A todo el personal del Área de Morfología y Biología Celular, por preguntar cada mañana un qué tal estás y por escuchar la respuesta cuando fue necesario. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

Al Doctor Nicolás Cuenca por su amabilidad mientras estuve en su laboratorio y por su paciencia al explicarme las cosas, que el cerebro de alguien del norte va realmente despacio cuando tiene que trabajar a 40°C.

Al Dr. Russell Foster y a la Dra. Stephanie Halford, por darme la oportunidad de conocer como se trabaja en la prestigiosa Universidad de Oxford. Gracias por vuestra amabilidad, paciencia y enseñanzas (incluido el inglés). Gracias también a mis compañeros de laboratorio en Oxford por esas cañas, o más bien tanques de cerveza, los viernes por la tarde, que hacían que mi inglés mejorara hasta límites insospechados. Y aquí, he de agradecer especialmente la compañía brindada por el cuasi doctor Alberto Manso, gracias por el tiempo que hemos pasado juntos cerveceando rodeados de ingleses con tatuajes raros, por la F1 los domingos en el White Horse y porque celebrar un mundial fuera de casa es mucho mejor cuando tienes a alguien que lo disfruta contigo.

A Laura y Gema, que me hicieron sentir como en casa y me enseñaron que se puede trabajar bajo temperaturas extremas siempre y cuando tengas un -80 cerca. Nenas, ¿nos hacemos un café?

A Claudia, Luis, Ale y Tamara. Gracias por todos los ratos que hemos pasado juntos, porque esas cañas, comidas, cafés y escapadas a la terraza hacen que un día bueno sea mejor. Os voy a echar de menos!

A ese grupo que se unió hace 5 años y pico en el desierto turco, el G4. A Marta, porque esos cafés a horas indecentes de la mañana la convierten en una parte de mi más en que en una amiga. Te echo de menos... vuelve pronto. A Helen, o más bien, a mamá, porque mientras nosotras hacemos la tesis ella nos convierte en tías postizas (por partida doble), enseñándonos que se puede llorar de alegría. A Rosa, niña, búscate un curro cerca que cada vez te nos alejas más! Te echamos mucho de menos!

A Cristina (porque antes de cuñada, fue y es mi amiga) y a Laura por todos los años de amistad que me han dado.

A Carmen, Aco, Julio y Raquel por esas cenas, charlas de cualquier tema (conquista del territorio francés, zombis,...) y partidas de trivial interminables los sábados noche. Gracias chicos por hacer de estos ratos algo tan divertido (y constructivo).

A mis suegros y cuñados, gracias por aumentar considerablemente mi número de familiares y por preocuparos por mí.

A mi familia, porque a pesar de que no entienden muchas cosas de este trabajo (y tipo de vida que le acompaña) se esfuerzan en comprenderlo. A mis padres, no creo que existan



palabras para explicar que si estoy aquí es gracias a vosotros. A Sonia, por preocuparse por mi (y por permitir que yo me preocupe por ella) y por escuchar aunque casi todo le suene a chino. Gracias también a Javi, porque ya eres parte de la familia y te lo has ganado a pulso. Dicen que la familia no la elegimos, pero yo tampoco la cambiaría.

A Nando, por ser mi mayor descubrimiento. Gracias por ser mi contrapunto, por escucharme, por entenderme (o al menos, intentarlo) y en definitiva, por hacerme feliz. Esta tesis es tan tuya como mía. Te quiero.

A todos, muchas gracias.



Índice de figuras	i
Lista abreviaturas	v
Summary	vii
Resumen	viii

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

1. Características del reloj biológico en mamíferos	2
2. Organización y funcionamiento de la vía de sincronización circadiana	3
3. Fotorrecepción	5
4. Un nuevo fotorreceptor en la retina	5
5. Estructura de la melanopsina	8
6. Anatomía de las células melanopsínicas	10
7. Conectividad intrarretiniana de las células melanopsínicas	14
8. Interacciones entre conos, bastones y células melanopsínicas	15
9. Proyecciones de las células melanopsínicas	18
10. Fototransducción de las células melanopsínicas	20
11. Ontogenia de las células melanopsínicas	23
12. Regulación de la expresión de melanopsina	25
13. La retina de los animales albinos	26

---

<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
------------------	-----------

---

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
---------------------------	-----------

1. Animales de experimentación	31
2. Diseño experimental	32
2.1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en el ratón pigmentado	32
2.1.1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en secciones de retina	32
2.1.2. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en retinas enteras	33
2.2. Desarrollo prenatal y perinatal de las células melanopsínicas en el ratón pigmentado	33
2.3. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en el ratón albino	34
2.4. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre las células que expresan la melanopsina en el ratón pigmentado	34
2.5. Efecto de las condiciones ambientales constantes sobre las células melanopsínicas en la retina albina	35
2.6. Recuperación del número de células que expresan melanopsina tras la reducción inducida por LL en la retina albina	36

2.7. Exposición de los ratones albinos a OO seguido de LL	36
2.8. Efecto de la LL sobre la retina adulta albina	37
2.9. Ritmo diario de células que expresan la melanopsina en la retina de ratón	37
2.10. Efecto de la OO sobre la oscilación diaria del número de células que expresan la melanopsina	38
<b>3. Análisis inmunohistoquímico en secciones de retina</b>	<b>39</b>
3.1. Fijación del tejido	39
3.2. Preparación del tejido para su seccionado con el micrótopo de parafina	39
3.3. Marcaje inmunocitoquímico de secciones con el método ABC	40
3.4. Inmunofluorescencia en secciones de retina	41
3.5. Análisis de las muestras	41
<b>4. Inmunofluorescencia en retinas planas</b>	<b>41</b>
4.1. Preparación del tejido para su estudio en retinas planas	41
4.2. Inmunotinción en retinas planas enteras	41
4.3. Análisis de las muestras	43
<b>5. Anticuerpos utilizados</b>	<b>44</b>
5.1. Anticuerpos primarios	44
5.2. Anticuerpos secundarios	45
<b>6. PCR en tiempo real</b>	<b>45</b>
6.1. Obtención y conservación de las muestras para PCR	45
6.2. Homogenización del tejido y purificación del RNA total	45
6.3. Transcripción reversa	46
6.4. PCR en tiempo real	47
6.5. Análisis estadístico de los datos obtenidos por PCR	48
<b>7. Análisis estadístico</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<hr/>	
<b>1. Desarrollo postnatal de las células ganglionares fotosensibles (melanopsínicas) de la retina de ratón</b>	<b>49</b>
1.1. Localización y clasificación de las células melanopsínicas en la retina de ratón	49
1.2. Estudio de las células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado	52
1.3. Desarrollo prenatal del sistema melanopsínico	57
1.4. Desarrollo de las células melanopsínicas en la retina albina	60
<b>2. Efecto de las condiciones lumínicas sobre las células melanopsínicas</b>	<b>62</b>
2.1. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado C3H	62
2.1.1. Luz continua	62
2.1.2. Oscuridad continua	64
2.2. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre la retina albina	66

2.2.1. Luz continua	66
2.2.2. Oscuridad continua	68
2.3. Exposición a LL seguido de OO	71
2.4. Exposición de los ratones albinos a OO seguido de LL	74
<b>3. Ritmo diario de las células melanopsínicas en la retina de ratón</b>	<b>77</b>
3.1. Ritmo diario del número de células en la retina de ratón pigmentado	77
3.2. Oscilación diaria de las células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal	79
3.3. Efecto de las condiciones de OO sobre el ritmo diario en el número de células que expresan melanopsina	80
3.4. Ritmo diario de las células melanopsínicas en la retina albina	83
3.5. Oscilación del RNAm de melanopsina en la retina	84
3.5.1. RNAm de la melanopsina en la retina pigmentada	85
3.5.2. RNAm de la melanopsina en la retina albino	86
3.6. Análisis de otros genes rítmicos de la retina	87
3.6.1. c-Fos	88
3.6.2. Per-2	88
3.6.3. Opsina de bastones	89
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>113</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>115</b>
<hr/>	
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>125</b>
<hr/>	



## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Estructura de la melanopsina	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de la melanopsina	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Imágenes representativas de retinas planas inmunoteñidas con el anticuerpo anti-melanopsina UF006	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo de la localización de los principales subtipos de células melanopsínicas en la retina de ratón	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Dibujo representativo de células melanopsínicas en la retina de ratón	<b>13</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo de las interacciones entre conos y bastones y las células melanopsínicas	<b>16</b>
<b>Figura 7.</b> Diagrama de las distintas regiones cerebrales inervadas por los axones de las células melanopsínicas	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo de las cascadas de fototransducción	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Vía de síntesis de la melanina	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental para el estudio del desarrollo postnatal de las células fotosensibles en secciones de retina	<b>32</b>
<b>Figura 11.</b> Diseño del estudio del desarrollo postnatal de las células fotosensibles en retinas planas enteras de ratones C3H+/+ mantenidos bajo condiciones de LO desde el nacimiento	<b>33</b>
<b>Figura 12.</b> Diseño experimental del estudio prenatal y perinatal	<b>33</b>
<b>Figura 13.</b> Diseño experimental para estudiar el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina albina	<b>34</b>
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental para el análisis del efecto de las condiciones continuas de LL u OO sobre las células melanopsínicas de la retina	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Diseño experimental para analizar el efecto de las condiciones constantes sobre las células que expresan la melanopsina en la retina albina	<b>35</b>
<b>Figura 16.</b> Diseño experimental para estudiar la recuperación de las células melanopsínicas en la retina albina	<b>36</b>
<b>Figura 17.</b> Diseño experimental para el análisis del efecto de la LL sobre la retina parcialmente desarrollada	<b>37</b>
<b>Figura 18.</b> Diseño experimental para el estudio del efecto de la LL sobre retinas albinas adultas	<b>37</b>
<b>Figura 19.</b> Representación de los tiempos elegidos para el análisis de la oscilación diaria de las células melanopsínicas y el mRNA de la melanopsina, c-fos, Per2 y opsina de bastones en los ratones C3H +/- y CD1	<b>38</b>
<b>Figura 20.</b> Representación de los tiempos elegidos para el análisis del efecto de OO sobre la variación diaria de células que expresan la proteína melanopsina en la retina del ratón pigmentado C3H+/+	<b>38</b>
<b>Figura 21.</b> Imágenes representativas del montaje de retinas planas tras el fotografiado de la retina completa en proyecciones X e Y	<b>44</b>
<b>Figura 22.</b> Imágenes representativas de retinas inmunomarcadas con el anticuerpo policlonal UF006 contra la melanopsina de ratón	<b>49</b>
<b>Figura 23.</b> Imagen representativa de una retina inmunomarcada con el anticuerpo UF006 (anti-melanopsina)	<b>50</b>
<b>Figura 24.</b> Imágenes representativas de células melanopsínicas en retinas adultas	<b>52</b>
<b>Figura 25.</b> Imágenes representativas de la retina del ratón pigmentado C3H/He	<b>53</b>
<b>Figura 26.</b> Imágenes representativas del globo ocular y de retinas enteras de ratones C3H/He	<b>53</b>
<b>Figura 27.</b> Desarrollo postnatal del sistema melanopsínico en la retina pigmentada	<b>55</b>
<b>Figura 28.</b> Imágenes representativas de retinas planas enteras del ratón C3H/He	<b>56</b>

<b>Figura 29.</b> Desarrollo postnatal de las células M1 y M2 en la retina pigmentada	<b>57</b>
<b>Figura 30.</b> Imagen representativa de E15 en la retina periférica del ratón C3H/He	<b>58</b>
<b>Figura 31.</b> Desarrollo prenatal y perinatal del sistema melanopsínico en la retina pigmentada	<b>59</b>
<b>Figura 32.</b> Desarrollo perinatal del sistema melanopsínico del ratón C3H/He	<b>59</b>
<b>Figura 33.</b> Imágenes representativas de la retina del ratón CD1	<b>60</b>
<b>Figura 34.</b> Número de células inmunopositivas durante el desarrollo postnatal en la retina albina	<b>61</b>
<b>Figura 35.</b> Desarrollo postnatal de las células M1 y M2 en la retina albina	<b>61</b>
<b>Figura 36.</b> Imágenes representativas de secciones de retina del ratón C3H/He mantenido bajo LL	<b>62</b>
<b>Figura 37.</b> Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas bajo LL en la retina pigmentada	<b>63</b>
<b>Figura 38.</b> Células M1 y M2 bajo LL en la retina pigmentada	<b>63</b>
<b>Figura 39.</b> Imágenes representativas de secciones de retina del ratón C3H/He mantenido bajo OO	<b>64</b>
<b>Figura 40.</b> Efecto de la OO sobre el desarrollo postnatal del sistema melanopsínico en el ratón pigmentado	<b>65</b>
<b>Figura 41.</b> Efecto de la OO sobre las células M1 y M2 en el ratón C3H/He	<b>65</b>
<b>Figura 42.</b> Establecimiento de las conexiones sinápticas de la retina externa del ratón C3H/He	<b>66</b>
<b>Figura 43.</b> Efecto de LL sobre la retina del ratón CD1	<b>67</b>
<b>Figura 44.</b> Número total de células melanopsina-positivas bajo LL en la retina albina	<b>67</b>
<b>Figura 45.</b> Efecto de la LL sobre las células M1 y M2 en la retina albina	<b>68</b>
<b>Figura 46.</b> Imágenes representativas de retinas albinas expuestas a OO	<b>68</b>
<b>Figura 47.</b> Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas bajo OO en la retina albina	<b>69</b>
<b>Figura 48.</b> Efecto de OO sobre las células M1 y M2 en la retina albina	<b>70</b>
<b>Figura 49.</b> Imágenes representativas de retinas albinas inmunoteñidas con anti-melanopsina y anti-sinaptofisina	<b>71</b>
<b>Figura 50.</b> Recuperación de las células melanopsínicas tras ser inhibidas por la LL en la retina albina	<b>72</b>
<b>Figura 51.</b> Imágenes representativas de retinas albinas tras el tratamiento lumínico de LO	<b>72</b>
<b>Figura 52.</b> Restauración del sistema melanopsínico tras la inhibición por LL en ausencia de la señal de conos y bastones en el ratón CD1	<b>73</b>
<b>Figura 53.</b> Recuperación de las células M1 y M2 tras ser inhibidas por LL en el ratón CD1	<b>74</b>
<b>Figura 54.</b> Efecto de la LL sobre la retina albina parcialmente desarrollada	<b>75</b>
<b>Figura 55.</b> Efecto de la LL sobre las células melanopsínicas en una retina albina parcialmente desarrollada	<b>75</b>
<b>Figura 56.</b> Efecto de la LL sobre el número de células melanopsínicas en la retina parcialmente desarrollada del ratón CD1	<b>76</b>
<b>Figura 57.</b> Efecto de la LL sobre el número de células inmunopositivas en la retina albina adulta	<b>76</b>
<b>Figura 58.</b> Número de células inmunopositivas durante el ciclo LO en el ratón C3H/He	<b>77</b>
<b>Figura 59.</b> Imágenes representativas de retinas durante el ciclo de LO en la retina del ratón pigmentado C3H/He	<b>78</b>
<b>Figura 60.</b> Oscilación diaria de las células M1 y M2 en el ratón C3H/He	<b>78</b>
<b>Figura 61.</b> Establecimiento de la oscilación diaria de las células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal en la retina pigmentada	<b>79</b>
<b>Figura 62.</b> Imágenes representativas de retinas en P5 en distintos puntos horarios en el ratón pigmentado	<b>80</b>
<b>Figura 63.</b> Oscilación diaria de las células M1 y M2 durante el desarrollo postnatal en la retina pigmentada	<b>80</b>
<b>Figura 64.</b> Número de células melanopsínicas en la retina pigmentada bajo OO a lo largo de un periodo de 24 horas	<b>81</b>
<b>Figura 65.</b> Imágenes representativas de retinas C3H/He adultas tras 6 ciclos en OO	<b>81</b>
<b>Figura 66.</b> Oscilación circadiana de las células M1 y M2 bajo OO en la retina pigmentada	<b>82</b>
<b>Figura 67.</b> Evolución del efecto de OO sobre el número de células melanopsina-positivas	



en el ratón C3H/He	83
<b>Figura 68.</b> Oscilación diaria de las células melanopsínicas en la retina albina	84
<b>Figura 69.</b> Variación diaria de las células M1 y M2 en la retina albina	84
<b>Figura 70.</b> Ritmo diario del mRNA total de la melanopsina en el ratón C3H adulto	85
<b>Figura 71.</b> Oscilación diario del mRNA de las isoformas L y S de la melanopsina	86
<b>Figura 72.</b> Oscilación diaria del mRNA total de la melanopsina en el ratón CD1 adulto	86
<b>Figura 73.</b> Ritmo diario del mRNA de las isoformas L y S de la melanopsina en la retina albina	87
<b>Figura 74.</b> Ritmo diario del mRNA de c-Fos	88
<b>Figura 75.</b> Oscilación diaria del mRNA de Per2	88
<b>Figura 76.</b> Oscilación diaria del mRNA de la opsina de bastones	89
<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados para el estudio de la melanopsina mediante RT-PCR	47
<b>Tabla 2.</b> Cebadores utilizados para normalización de los resultados obtenidos por RT-PCR	47



## Lista abreviaturas

---

**cDNA:** *complementary DNA*, DNA complementario.

**CT:** *circadian time*, hora circadiana.

**DAB:** *diaminobencidine*, diaminobencidina.

**DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole*, 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

**E:** *embryonary*, embrionario.

**GCL:** *ganglion cell layer*, capa de las células ganglionares.

**INL:** *inner nuclear layer*, capa nuclear interna.

**IPL:** *inner plexiform layer*, capa plexiforme interna.

**ipRGCs:** *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*, células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.

**L:** *long*, larga.

**LL:** luz continua.

**LO:** luz/oscuridad.

**M:** molar.

**M1:** células melanopsínicas tipo I.

**M2:** células melanopsínicas tipo II.

**M3:** células melanopsínicas tipo III.

**M4:** células melanopsínicas tipo IV.

**M5:** células melanopsínicas tipo V.

**mRNA:** *messenger RNA*, RNA mensajero.

**ONL:** *outer nuclear layer*, capa nuclear externa.

**OO:** oscuridad continua.

**OP479:** *opsin photopigment 479nm*, fotopigmento opsina 479nm.

**OPL:** *outer plexiform layer*, capa plexiforme externa.

**OPN:** *olivary pretectal nucleus*, núcleo pretectal de la oliva.

**Opn4<sup>-/-</sup>:** *knock out* para la melanopsina.

**P:** *post-natal*, postnatal.

**PACAP:** *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria.

**PB:** *phosphate buffer*, tampón fosfato.

**PBS:** *phosphate buffer saline*, tampón fosfato salino.

**PBS-T:** *phosphate buffer saline with triton*, tampón fosfato salino con tritón.

**Per2:** *Period 2*

**PF:** paraformaldehído.

**rd:** *retinal degeneration*, degeneración retiniana.

**RGCs:** *retinal ganglion cells*, células ganglionares de la retina.

**RHT:** *retinohypothalamic tract*, tracto retinohipotalámico.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**RT-PCR:** *real time- polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**S:** *short*, corta.

**SCN:** *suprachiasmatic nucleus*, núcleo supraquiasmático.

**TRPC:** *transient receptor potential channel*, canal receptor de potencial transitorio.

**WT:** *wild type*, fenotipo salvaje.

**ZT:** *zeitgeber time*, señal dadora de tiempo.

## SUMMARY

Retinal ganglion cells (RGCs) which express the photopigment melanopsin are light responsive. Such RGCs provide signals to the suprachiasmatic nucleus (SCN, the central circadian pacemaker of mammals), so that it can be synchronised on a daily basis to the environmental light/dark cycle, a process called photoentrainment. We intended to analyze the postnatal development of such photosensitive RGCs in two mouse strains: pigmented C3H/He and albino CD1. Furthermore, the effects of ambient light conditions on these photosensitive cells were also studied.

In the present thesis we demonstrate that no loss of melanopsin RGCs occurs during postnatal development in the pigmented retina. The total number does not vary significantly from postnatal day (P)1 to P21 and, therefore, a spatial reorganization of these cells, rather than cell death, can be hypothesized during this period. We have also observed that the development of the melanopsin cell system of albino mice is delayed with regard to that of the pigmented ones. The effect of constant ambient conditions during the early postnatal period was analyzed as well. When pups were exposed to constant darkness (DD) a significant increase in the number of immunopositive cells was detected in both strains. When albino pups were maintained under constant illumination (LL), the number of melanopsin-immunoreactive RGCs observed was lower than that of the light-dark controls (LD), while pigmented pups did not show any significant decrease with regard to LD controls. The effect of LL during the early postnatal period in the albino retina was reversible by simply reestablishing the standard LD conditions. The changes in the number of melanopsin-immunoreactive cells observed in the animals exposed to LL or DD suggest a functional adaptation of the retina to the external lighting conditions. Since rods and cones are not yet functional at such an early developmental stage, this regulation must necessarily be due to the responsiveness of melanopsin-expressing RGCs. When pigmented mice were kept under light/dark (LD) cycles, a daily oscillation in the number of immunostained cells was observed, which suggests that some of these retinal neurons turn on and off during the LD cycle. Nevertheless, the cells that do not apparently express the melanopsin photopigment still might transmit inputs from the cone/rod pathway to the brain. In contrast, no defined rhythm was detected in animals subjected to 6 days in DD, which suggests that the daily oscillation observed under LD is dependent on the ambient LD cycles. Finally, melanopsin mRNA was also analyzed in a group subjected to LD and no daily fluctuation was detected. This means that the regulation of melanopsin expression by LD cycles might occur at a post-transcriptional level.

## RESUMEN

Las células ganglionares de la retina que expresan el fotopigmento melanopsina son capaces de responder a los estímulos lumínicos. Estas células envían señales al núcleo supraquiasmático (SCN, suprachiasmatic nucleus, principal reloj biológico en mamíferos), de modo que pueda ser sincronizado diariamente con los ciclos ambientales de luz-oscuridad (LO), un proceso conocido como fotosincronización. Nuestro objetivo ha sido el análisis del desarrollo de las células que expresan la melanopsina en la retina de dos cepas murinas, la C3H/He (ratones pigmentados) y la CD1 (albinos). Asimismo, hemos estudiado cómo las condiciones ambientales de iluminación afectan a estas células fotosensibles.

En esta tesis hemos demostrado que en la retina pigmentada no existe una pérdida de células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal. El número total no varía significativamente desde el día postnatal (P) 1 a P21, por lo que parece que durante este periodo tiene lugar una reorganización espacial de estas células fotosensibles, más que una muerte celular de las mismas. Además, hemos observado que en la retina albina existe un retraso en el desarrollo de este sistema con respecto a la de los ratones pigmentados. Se ha estudiado igualmente el efecto de las condiciones ambientales constantes durante el desarrollo postnatal temprano. Cuando las crías fueron expuestas a oscuridad constante (OO) se produjo un incremento significativo en el número de células inmunopositivas en ambas cepas de ratones. Cuando las crías albinas fueron expuestas a condiciones de luz constante (LL), el número de células melanopsina-positivas fue menor que el observado en el grupo control sometido a ciclos de luz-oscuridad (LO), mientras que no se observó tal disminución en la retina pigmentada. El efecto de la LL durante el desarrollo postnatal temprano en la retina albina fue revertido simplemente restableciendo las condiciones de LO. Los cambios en el número de células melanopsínicas observados bajo OO o LL sugieren una adaptación funcional de la retina a las condiciones externas de iluminación. Dado que conos y bastones aún no son funcionales en este periodo postnatal temprano, la regulación se debe necesariamente a las células melanopsínicas. Cuando los animales pigmentados fueron mantenidos bajo condiciones de LO se observó una oscilación diaria en el número de células inmunopositivas. Esta variación sugiere que algunas de estas neuronas se encienden y se apagan a lo largo del ciclo diario. No obstante, las células que en algún momento no expresan aparentemente la proteína melanopsina aún podrían transmitir hacia el cerebro las señales procedentes de conos y bastones. Por el contrario, no se apreció una oscilación definida tras mantener a los animales durante 6 ciclos en OO, por lo que el ritmo diario observado parece ser dependiente

de los ciclos ambientales de LO. Finalmente, se analizó el RNAm de la melanopsina en animales pigmentados sometidos a LO, no observándose fluctuación alguna a lo largo del ciclo, por lo que la regulación de la expresión de la melanopsina por los ciclos de LO podría tener lugar a un nivel post-transcripcional.





# ***Introducción***



Todo en el universo es rítmico, desde las pulsaciones de un átomo hasta las pulsaciones de una galaxia. Los organismos no solamente están influenciados por el ritmo del Universo y de la Tierra, sino que también tienen gran cantidad de ritmos vitales. En la introducción de esta tesis intentaremos dar una visión de las vías de sincronización de los organismos con el medio ambiente.

Según la Real Academia Española el término tiempo, del latín *tempus*, tiene múltiples acepciones, entre las que se pueden mencionar las dos siguientes: i) duración de las cosas sujetas a mudanza; ii) magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro. Desde niños sabemos qué es el tiempo de una forma casi innata, y que existe un presente, un pasado y un futuro, pero si le preguntamos a un físico qué es el tiempo, la explicación podría durar horas. Desde que se comenzó el estudio del tiempo éste fue considerado una variable absoluta que se podía medir. Sin embargo, con la teoría de la relatividad de Albert Einstein a principios del siglo XX se produjo una revolución en el concepto del tiempo: el tiempo no transcurre, simplemente es.

Ya en la antigüedad se medía el paso del tiempo. La rotación de la Tierra alrededor del Sol y la de la Luna alrededor de la Tierra fueron y son una herramienta para medir el tiempo. Los calendarios modernos tienen su origen en Mesopotamia y Egipto, donde se contemplaban 3 ciclos naturales: el día solar, el mes lunar y el año solar. También las estrellas fueron utilizadas para la definición del tiempo. En base a las 12 constelaciones, los egipcios dividieron el año en 12 unidades de la misma duración, los meses. Estos calendarios permitían predecir los cambios ambientales que ocurrirían, facilitando así la adaptación al medio y la supervivencia.

El concepto del tiempo y la continua ritmicidad presente en la naturaleza han estado desde siempre muy ligados al hombre y su evolución. Los médicos de la antigüedad percibieron la importancia de los ciclos biológicos en el propio ser humano. El poeta griego Archilochus, en el siglo VII a.C., describió como los ritmos gobiernan al hombre. De la misma manera, Hipócrates, el llamado Padre de la Medicina, en el siglo IV a.C. relacionó el ritmo de aparición de ciertas enfermedades con las estaciones del año, con el momento del día y con la edad de las personas. Aristóteles, y posteriormente Galeno, estudiaron la periodicidad del sueño y la vigilia, centrándola primero en el corazón y luego en el cerebro.

## Introducción

En 1621 Robert Burton introdujo en su obra la similitud del cuerpo humano con un reloj, del cual decía que si le fallase alguna ruedecilla, el resto del conjunto se desordenaría. De la misma manera, en 1692, Juana Inés de la Cruz refleja en su obra la alternancia presente en el ser humano. Hasta ese momento, la única explicación que se atribuía al fenómeno era el de un proceso pasivo del tipo causa-efecto, en el cual un factor que era el "estimulante" producía la respuesta en el individuo. Sin embargo, esta creencia fue puesta en duda en 1729 cuando el astrónomo francés llamado Jean Jacques d'Ortous de Mairan presentó el primer experimento conocido sobre los ritmos biológicos. En su trabajo observó que las hojas de los heliotropos (una especie de mimosa) se abrían durante el día y se cerraban durante la noche. Cuando ponía la planta en oscuridad total este ritmo continuaba, a pesar de haber desaparecido la señal ambiental que aparentemente lo inducía.

En 1845 Briton J. Davy describió un ritmo diario y anual de la temperatura corporal en humanos independiente de la actividad física y de la temperatura ambiental. Esta variable se sigue siendo utilizada hoy en día como marcador del sistema circadiano en humanos. Casi un siglo después, Maynard J. Johnston estudió los ritmos de actividad motora en ratones, describiendo su persistencia en condiciones ambientales constantes. A partir de estos y otros estudios, Colin S. Pittendrigh y Jürgen Aschoff desarrollaron el marco conceptual de la cronobiología moderna aceptado en la actualidad. Hoy en día, las propiedades del reloj biológico son bien comprendidas en muchos organismos al aplicar en su estudio las técnicas más modernas de biología molecular, celular y electrofisiología.

### **1. Características del reloj biológico en mamíferos**

El ciclo de 24 horas de luz-oscuridad producido por la rotación de la Tierra produce grandes cambios, pero predecibles, en el entorno que nos rodea. Los organismos, en lugar de responder pasivamente a estos cambios, han desarrollado una representación endógena del ciclo de 24 horas, los ritmos circadianos. Estos son oscilaciones de las reacciones bioquímicas y de comportamiento en los organismos y ocurren con una periodicidad aproximada de 24 horas (cf. Latín *circa*, o "aproximado", y *dies*, o "día"). Los ritmos circadianos se caracterizan por cumplir 3 propiedades: i) Naturaleza innata: el ritmo intrínseco existe sin necesidad de ninguna señal o "input" ambiental; ii) Capacidad para compensar la temperatura: ha de mantener el periodo intrínseco, la fase y amplitud del ritmo a pesar de las fluctuaciones ambientales de temperatura; iii) Sincronización: debe existir una correlación de los ritmos circadianos con los

ritmos del ciclo de luz-oscuridad del día solar. Los ritmos circadianos predicen el momento en el que van a tener lugar acontecimientos fisiológicos o de comportamiento respecto al ciclo ambiental de 24 horas, permitiendo así al organismo anticiparse a los cambios que se van a producir. La capacidad de adaptación de los organismos a estas variaciones periódicas externas y, por tanto, la modificación de su fisiología y comportamiento, ha sido clave para su supervivencia.

Un elevado número de comportamientos y funciones de los humanos, tales como el mantenimiento de la temperatura corporal, actividad cardiaca, síntesis y liberación de hormonas y el ciclo de actividad/reposo exhiben fluctuaciones circadianas robustas. La ausencia o alteración de estos ritmos provoca varias patologías, como trastornos del sueño, desorden afectivo estacional, síndromes metabólicos e incluso cáncer, siendo estas situaciones patológicas el hecho por el que se ha dedicado tanto tiempo al estudio y comprensión de los ritmos circadianos.

## **2. Organización y funcionamiento de la vía de sincronización circadiana**

El sistema circadiano en mamíferos se caracteriza por tener una estructura modular en organización y funcionamiento. Consta de 3 módulos principalmente: i) Señal de entrada: acontecimiento ambiental que permite la sincronización de los ritmos con el medio externo; ii) Reloj principal u oscilador: estructura que se sincroniza con el medio y transmite la señal al resto del organismo; iii) Señal de salida o "output": el conjunto de señales bioquímicas que influyen en distintas variables fisiológicas, bioquímicas y del comportamiento.

El reloj biológico es un sistema fisiológico autooscilante responsable de la medida del tiempo que permite a los organismos sincronizarse diariamente con el medio que les rodea. Este es capaz de generar oscilaciones espontáneamente, pero también las transmite al resto del organismo para que funcione organizadamente. El reloj biológico posee otra particularidad: es un reloj automático independiente de las condiciones externas, con un mecanismo que le permite ser autónomo y otro que le permite ponerse en hora con el ciclo externo.

Son muchos los osciladores circadianos autónomos en mamíferos (retina, hígado, bulbo olfatorio) e incluso se observan ritmos en células en cultivo. No obstante, los mamíferos se caracterizan por la actividad de un reloj circadiano primario localizado en la zona medial del

## Introducción

hipotálamo anterior, el núcleo supraquiasmático (*suprachiasmatic nucleus*, SCN). Los trabajos de Moore y Eichler (1972) y Stephan y Zucker (1972) demostraron por primera vez que un daño en el SCN provoca la pérdida de los ritmos circadianos. La demostración definitiva de que este es el verdadero responsable de la ritmicidad en mamíferos vino dada por el trasplante de SCN en una cepa de hámster que poseía una mutación en el periodo de su ritmo endógeno (Ralph y cols., 1990). En estos experimentos se demostró que existía una recuperación de la característica de los ritmos circadianos del donante después de realizar el trasplante.

Es importante tener en cuenta que el sistema circadiano solo aporta una ventaja selectiva si los ritmos biológicos están armonizados con los ritmos ambientales. Por lo que el reloj circadiano requiere una sincronización diaria a través de las señales dadoras de tiempo (*zeitgebers*, ZT). Es importante tener en cuenta que los ciclos medioambientales (factores externos) no generan ningún ritmo en el organismo, sino que ajustan los ritmos endógenos ya existentes. Aunque son varios los factores capaces de sincronizar el reloj biológico en mamíferos, el cambio diario en la cantidad de luz ambiental (irradiancia) en el amanecer y atardecer es el principal indicador del momento del día solar. La mayoría de los organismos utilizan esta transición de irradiancia como su principal ZT para ajustar su reloj circadiano. Este proceso se denomina fotosincronización (Roenneberg y Foster, 1997). La información lumínica alcanza el SCN (Ralph y cols., 1990) a través del tracto retinohipotalámico (*retinohypothalamic tract*, RHT), una vía monosináptica que se origina en la retina (Moore y Lenn, 1972; Moore y cols., 1995; Pickard y cols., 2002). El RHT está formado por menos de un 1% del total de células ganglionares de la retina (*retinal ganglion cells*, RGCs) (Provencio y cols., 1998b).

Anatómicamente el SCN tiene dos zonas bien diferenciadas conocidas como centro y corteza (Moore y cols., 2002). El centro, que se caracteriza por la elevada cantidad de aferencias retinianas tanto directas como indirectas, (Abrahamson y Moore, 2001; Moore y cols., 2002) envía la información hacia la corteza del SCN (Kriegsfeld y cols., 2004), que parece ser el punto crítico de fotosincronización circadiana (Yan y Silver, 2002). Estas observaciones apoyan la idea de que las señales fóticas recibidas en el SCN desde la retina son críticas para la sincronización del marcapasos con el ciclo ambiental de luz-oscuridad.

### 3. Fotorrecepción

Al menos, hasta finales del siglo pasado se asumía que los vertebrados no mamíferos tenían distintas vías de fotorrecepción para la visión formadora de imágenes y la visión no formadora de imágenes, o fotorrecepción circadiana. Karl von Frisch, en 1911, fue el primero en sugerir la existencia de fotorreceptores extraoculares en su estudio de control de pigmentación en la piel de peces. En trabajos posteriores se detectaron receptores asociados a respuestas circadianas en el sistema nervioso central, piel y órganos periféricos de peces, anfibios, reptiles y aves (Menaker y cols., 1970; Taylor, 1972; Underwood, 1975; Tamotsu y Morita, 1986). Sin embargo, en mamíferos la enucleación del ojo resultaba en una pérdida total de cualquier tipo de detección de la luz (Foster y cols., 1991; Provencio y cols., 1994; Lockley y cols., 1997; Lindblom y cols., 2000). Este hecho parecía implicar que en los mamíferos, incluido el humano, las mismas células fotosensibles cuya función es la visión formadora de imágenes, los conos y los bastones, eran también las células encargadas de ajustar el reloj. No obstante, los requerimientos de la fotorrecepción circadiana son muy distintos de los de la visión formadora de imágenes: para que tenga lugar la sincronización del reloj biológico se requiere un estímulo lumínico de elevada irradiancia y larga duración (Nelson y Takahashi, 1991). El momento del día se correlaciona con la cantidad de luz ambiental (irradiancia), y es precisamente este parámetro el que define la magnitud de respuesta del SCN. Las vías implicadas en la formación de imágenes están optimizadas para una agudeza espacial y temporal, pero poseen una escasa respuesta al cambio de irradiancia. Estos datos que apoyaban la necesidad de distintos fotorreceptores para los ambos tipos de visión fueron confirmados a finales del siglo XX con el descubrimiento de otras células fotorreceptoras en la retina de mamíferos.

### 4. Un nuevo fotorreceptor en la retina

En la década de los 90 se comenzaron a investigar los ratones mutantes *rd* (*retinal degeneration*, degeneración retiniana), los cuales pierden todos los bastones y la práctica totalidad de los conos, de forma que son visualmente ciegos. A pesar de la pérdida mayoritaria de fotorreceptores, estos animales muestran respuestas circadianas normales, imposibles de distinguir de las observadas en los ratones con retinas de fenotipo normal (+/+; fenotipo salvaje) (Foster y cols., 1991). Resultados similares fueron observados en primates y humanos (Czeisler y cols., 1995; Klerman y cols., 2002; Silva y cols., 2005).

## Introducción

Estos resultados apoyaron la posibilidad de un nuevo fotorreceptor en la retina, análogo a la pineal y a los fotorreceptores encefálicos de los vertebrados no mamíferos. No obstante, esta hipótesis encontró una gran oposición dado que existía la posibilidad de que un pequeño número de conos y bastones en las retinas degeneradas fuese suficiente para llevar a cabo la sincronización (Foster y cols., 1993). Con el fin de resolver esta cuestión se generó el ratón *rd/rd cl* (Soucy y cols., 1998) que pierde todos los conos y bastones. Nuevamente, estos ratones seguían mostrando respuestas a la variación ambiental de irradiancia incluyendo sincronización circadiana, supresión de la secreción de melatonina por la luz y reflejo pupilar (Freedman y cols., 1999; Lucas y cols., 1999; Lucas y cols., 2001; Mrosovsky y cols., 2001). Nuevamente, la enucleación bilateral bloqueaba los efectos de la luz en el sistema circadiano (Lucas y cols., 1999, Lucas y cols., 2001), por lo que comenzó la búsqueda del nuevo fotorreceptor.

Si no son necesarios ni los conos ni los bastones, ¿qué otras neuronas de la retina podrían actuar como fotorreceptores? Mediante marcaje retrógrado en rata desde el SCN a través del RHT se observó que se marcaban RGCs. Además, estas RGCs contenían glutamato y el neuropéptido PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria) (Hannibal y cols., 2000). Tanto PACAP como glutamato son potentes mediadores de los ritmos circadianos en el SCN (Hannibal y cols., 1997; Mintz y cols., 1999; Hannibal y cols., 2001; Nielsen y cols., 2001), y PACAP es exclusivo de las RGCs que forman parte del RHT (Hannibal y cols., 2002). De modo que todas las pruebas apuntaban a que en estas células de la retina interna se encontraba el nuevo fotorreceptor. En el año 2002 se demostró que estas RGCs eran capaces de responder a la luz mediante una larga despolarización. Esta respuesta a la luz era persistente incluso en la presencia de un cóctel de drogas que bloqueaba cualquier comunicación celular conocida, y mantenían la respuesta a la luz incluso después de ser diseccionadas y aisladas del tejido retiniano (Berson y cols., 2002; Sekaran y cols., 2003). Estos datos indicaban que estas RGCs eran intrínsecamente fotosensibles (*intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*, ipRGCs).

El ratón *rd/rd cl* sirvió para caracterizar el nuevo fotopigmento mediante espectrometría de acción. Los resultados demostraron que este espectro de acción era conducido por una proteína tipo opsina unida al cromóforo y con un pico máximo de sensibilidad a 479nm. El nuevo pigmento se designó de forma preliminar como OP479 (*opsin photopigment 479nm*, fotopigmento opsina 479nm) (Lucas y cols., 2001; Hattar y cols., 2003). El espectro de acción detectado en ratón era muy cercano al observado en las células



ganglionares fotosensibles de la retina (Berson y cols., 2002), lo que sugirió que OP479 podría encontrarse en las ipRGCs. Algunos estudios acerca de la supresión de la melatonina en humanos indicaban la existencia de un fotopigmento con un pico de sensibilidad entre 450 y 480nm (Brainard y cols., 2001; Thapan y cols., 2001; Lockley y cols., 2003). Se demostró igualmente que las propiedades temporales de la vía de los conos en la retina humana eran reguladas por un fotopigmento con un máximo de sensibilidad a 483nm (Hankins y Lucas, 2002). Las similitudes entre los estudios en humanos y los realizados en ratón sugirieron que ambos organismos poseen un ortólogo del mismo fotopigmento.

De todas las nuevas opsinas identificadas en los últimos años, la melanopsina surgió como el principal candidato para la OP479. Provencio y cols. (1998a) identificaron esta proteína en los melanóforos de la piel de *Xenopus laevis*. En *Xenopus*, la melanopsina es expresada en las capas internas de la retina, el iris y el epitelio pigmentario. En el cerebro, se detectó en el núcleo preóptico magnocelular y el SCN (Provencio y cols., 1998a).

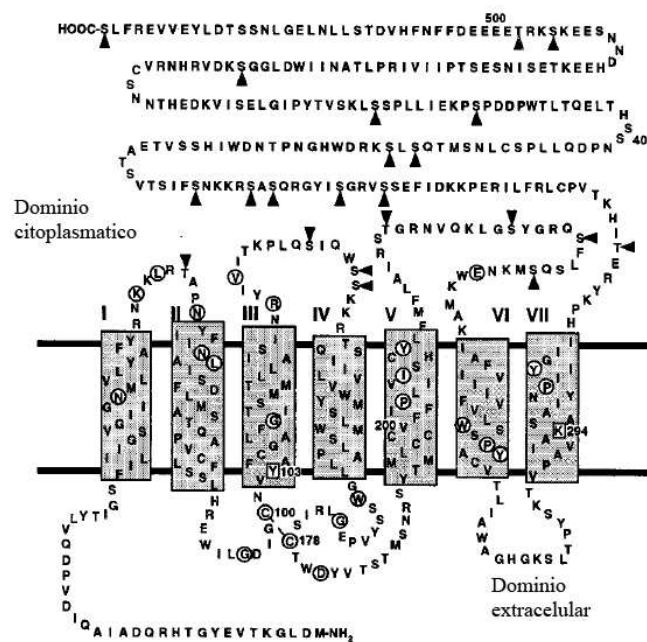
Los ortólogos de la melanopsina en mamíferos fueron aislados dos años después (Provencio y cols., 2000). En los mamíferos, la expresión de la melanopsina está restringida a la retina, a una pequeña subpoblación de células cuyo soma se sitúa en la capa ganglionar y a unas pocas células con el soma localizado en la subcapa inferior de la nuclear interna (Provencio y cols., 2000; Hattar y cols., 2002). Estas células son coincidentes con las RGCs que expresaban PACAP y conforman el RHT enviando información lumínica al SCN (Gooley y cols., 2001; Hannibal y cols., 2004c). En el año 2002 se demostró que las ipRGCs previamente descritas (Berson y cols., 2002; Sekaran y cols., 2003) expresaban la opsina melanopsina (Hattar y cols., 2002). Todas estas evidencias indicaban que la melanopsina era el nuevo fotopigmento que mediaba la fotorrecepción circadiana en mamíferos (Hattar y cols., 2002).

Tras surgir la melanopsina como principal candidato, fueron muchos los estudios en los que se llevó a cabo la creación de modelos *knockout* para este gen (Hattar y cols., 2003; Lucas y cols., 2003; Panda y cols., 2003). Sin embargo, la observación de que la ablación de la melanopsina llevaba a una pérdida de la fotosensibilidad de las ipRGCs solo sirvió para confirmar que esta era un componente necesario para la respuesta a la luz, ya que también podría ser posible que la melanopsina actuase como una fotoisomerasa, es decir, regenerando el cromóforo para una opsina aún no identificada (Bellingham y cols., 2002). En el año 2005, de forma independiente, tres grupos de investigación combinaron la expresión heteróloga de la proteína melanopsina con ensayos fisiológicos de fotosensibilidad, demostrando en células no

fotosensibles que la expresión de la melanopsina era suficiente para desencadenar una respuesta celular dependiente de la luz que llevaba a una despolarización de la membrana celular (Melyan y cols., 2005; Panda y cols., 2005; Qiu y cols., 2005). Además, el espectro de acción de las respuestas inducidas era muy similar al que se detectaba en las ipRGCs (Panda y cols., 2005; Qiu y cols., 2005). Todas estas evidencias indican, por lo tanto, que la melanopsina es el fotorpigmento de las ipRGCs.

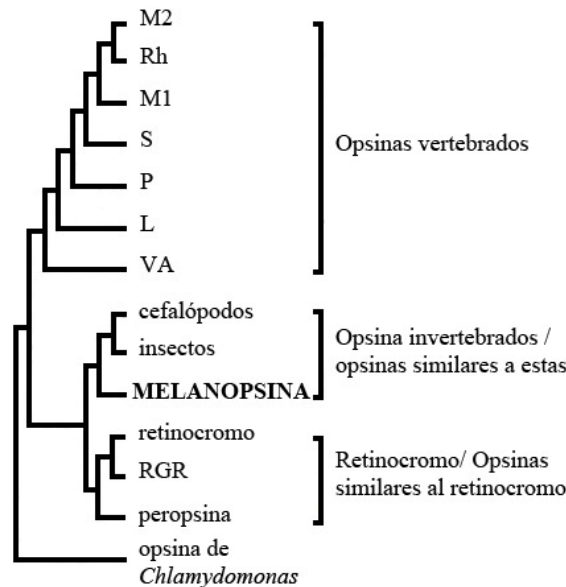
## 5. Estructura de la melanopsina

La melanopsina comparte similitudes estructurales con el resto de opsinas conocidas, esto incluye un extremo amino extracelular y siete pasos transmembrana. Otras características comunes son la presencia de una lisina en el séptimo paso transmembrana, que actúa como punto de unión al cromóforo, y un par de lisinas en el segundo y tercer lazo extracelular, permitiendo la formación de un puente disulfuro que aporta estabilidad a la conformación terciaria de la proteína (Provencio y cols., 1998a) (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura de la melanopsina. Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de la melanopsina. Modificada de Provencio y cols., 1998a.

A pesar de que se trata de opsin funcional en vertebrados mamíferos, la melanopsina tiene una mayor homología con las opsinas de invertebrados. Los análisis filogenéticos sitúan a la melanopsina en un clado más cercano a los fotorreceptores rdoméricos de invertebrados que a los ciliados de vertebrados (Provencio y cols., 2000; Arendt y cols., 2003; Koyanagi y cols., 2005; Terakita y cols., 2005) (Figura 2), tiene una mayor homología con la rodopsina de pulpo (39%) que con las opsinas clásicas de conos y bastones (27%). Esta homología se traduce en varias semejanzas estructurales con las opsinas de invertebrados, incluyendo la presencia de una tirosina en el tercer lazo transmembrana (un complejo implicado en la estabilización de la base de Schiff), además de una inserción en tercer lazo citoplasmático que aumenta su longitud (esta característica determina el grupo de proteínas G que serán activadas por la opsin) y un extremo C terminal citoplasmático muy largo.



**Figura 2.** Árbol filogenético de la melanopsina construido por alineación de la melanopsina frente a otras opsinas. L: *long-wavelength-sensitive opsin*, opsin de onda larga; M1: *blue-like middle wavelength-sensitive opsin*, opsin de onda media azul; M2: *green-like middle-wavelength-sensitive opsin*, opsin de onda media verde; P: *pineal opsin*, opsin pineal; Rh: *rhodopsin*, rodopsina; S: *short-wavelength-sensitive*, opsin de onda corta; VA: *vertebrate ancient opsin*, opsin ancestral de vertebrados; RGR: *retinal G-protein-coupled receptor*, proteína G retiniana unida a un receptor. Modificada de Provencio y cols., 1998a.

En la línea evolutiva de los vertebrados se han identificado dos genes de la melanopsina, *Opn4m* y *Opn4x* (Bellingham y cols., 2006). Los vertebrados no mamíferos poseen ambos genes, pero el gen *Opn4x* parece que se perdió muy pronto en la línea de los vertebrados mamíferos (Pires y cols., 2007). A partir de ambos genes se obtienen fotopigmentos funcionales, aunque la distribución de ambas opsinas en la retina es distinta, la expresión de *Opn4m* se restringe a una subpoblación de RGCs, mientras que *Opn4x* se expresa por toda la retina y también en otros tejidos como cerebro, pineal y piel.

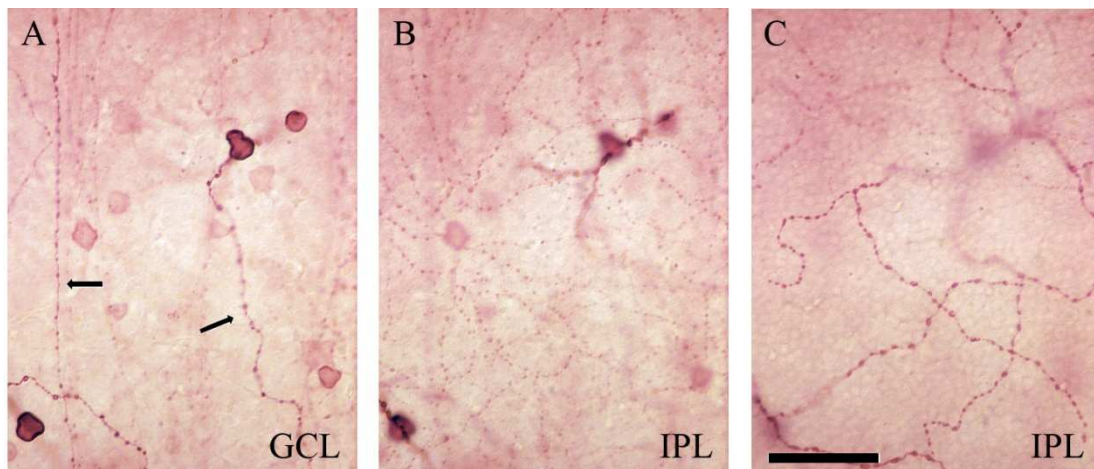
## **6. Anatomía de las células melanopsínicas**

Desde que se estableció la relación entre la expresión de la melanopsina y la fotosensibilidad intrínseca, la inmunohistoquímica ha sido la herramienta más utilizada para explorar la anatomía de estas células fotosensibles de la retina interna.

El marcaje en las células melanopsínicas se localiza en somas, dendritas y axones. La inmunoreactividad somática se detecta sobre todo en la superficie celular, indicando que la proteína está asociada a la membrana citoplasmática. El marcaje tanto en dendritas como en axones tiene un aspecto punteado, en cuentas de rosario. Este punteado no presenta colocalización o yuxtaposición con la proteína presináptica sinaptofisina, con lo que no se trata de puntos sinápticos (Hattar y cols., 2002).

En mamíferos se ha detectado la existencia de melanopsina en el epitelio pigmentario de la retina (Peirson y cols., 2004) y en algunos conos (Dkhissi-Benyahya y cols., 2006), aunque aún no se conoce el papel que pueda desempeñar la melanopsina en esta localización. Sin embargo, la melanopsina se encuentra mayoritariamente en un pequeño número de RGCs cuyos somas se localizan en la capa de las células ganglionares (*ganglion cell layer*, GCL) (Figura 3A). También se ha detectado una población de células inmunopositivas en la capa nuclear interna (*inner nuclear layer*, INL) (en donde se localizan los somas de muchas células amacrinas). Los campos dendríticos de las células melanopsínicas se extienden varios cientos de micras y se solapan entre ellos formando una red fotosensible que cubre la retina por completo. En la retina se observan dos plexos inmunopositivos para la melanopsina en la capa plexiforme interna (*inner plexiform layer*, IPL). Uno de ellos, que ocupa el margen externo de la IPL y es adyacente a la INL, se corresponde con la sublámina OFF de la IPL (Figura 3B). El otro

plexo inmunopositivo está en la sublámina ON de la IPL y es adyacente a la GCL (Figura 3C) (Provecio y cols., 1998b; Hattar y cols., 2002; Sekaran y cols., 2005).



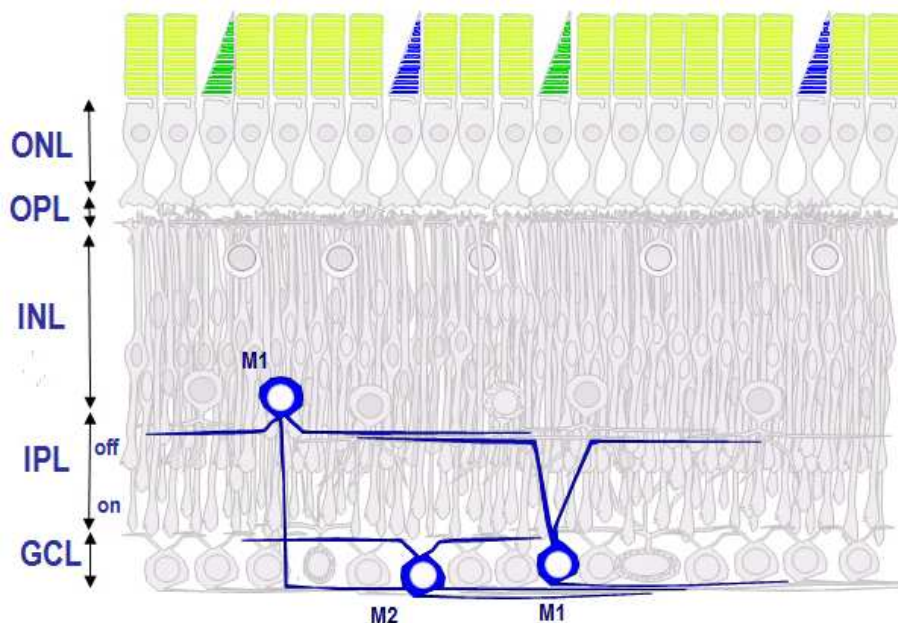
**Figura 3.** Imágenes representativas de retinas (montadas enteras sobre el portaobjetos) inmunoteñidas con el anticuerpo anti-melanopsina UF006. **A.** Somas localizados en la GCL. Se pueden distinguir dos tipos de células inmunopositivas en función de la intensidad de marcaje: oscuras y pálidas. Además, los axones son fácilmente distinguibles (flechas). **B.** Plexo ON de la IPL. Las dendritas aquí localizadas son finas y muy numerosas. **C.** Plexo OFF de la IPL. El número de dendritas inmunopositivas de este plexo es menor, estas se caracterizan por ser muy arrosariadas y de mayor grosor que las observadas en el plexo ON. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna. Escala: 50 $\mu$ m.

A pesar de que se trata de una subpoblación pequeña de RGCs, dentro del grupo de las células melanopsínicas existen distintos subtipos que son clasificados según la localización del soma y la estratificación dendrítica (Figura 4):

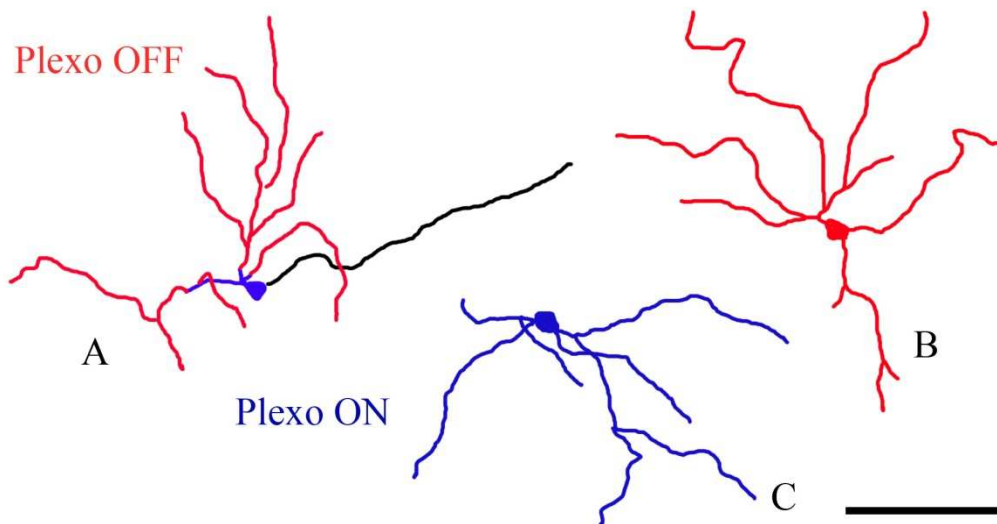
- Células melanopsínicas tipo I (M1). Las dendritas de las células M1 estratifican en la capa más externa (sublámina OFF) de la IPL. En base al lugar de localización del soma podemos distinguir dos grupos: **Células M1A** (Figuras 4 y 5A): su soma se localiza en la GCL y posee un diámetro de  $13,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$  (Berson y cols., 2010); **Células M1B** (Figuras 4 y 5B): el soma se localiza desplazado en la subcapa de las células amacrinas en la INL, con un diámetro de  $12,1 \pm 1,7 \mu\text{m}$  (Berson y cols., 2010). Las células de grupo M1B parecen ser células ganglionares desplazadas a la capa nuclear interna más que células amacrinas ya que se puede seguir el axón hasta el comienzo de la papila del tracto óptico (Dacey y cols., 2005; Hattar y cols., 2006). El diámetro del campo dendrítico de las células M1 es aproximadamente 275  $\mu\text{m}$  (Berson y cols., 2010).

## Introducción

- Células melanopsínicas tipo II (**células M2**) (Figuras 4 y 5C). Las dendritas de estas células se localizan en la capa más interna (sublámina ON) de la IPL, con un campo dendrítico de aproximadamente 310  $\mu\text{m}$ . Su soma, con un diámetro de  $14.8 \pm 1.5 \mu\text{m}$ , está en la capa de las células ganglionares (Berson y cols., 2010). Las células M2 se caracterizan por tener un soma de mayor tamaño que las M1, así como un mayor número de dendritas y con mayor ramificación. Además, la intensidad de marcaje de las células M2 es menor que el de las M1, reflejando así una menor expresión de la melanopsina en estas células (Hattar y cols., 2006; Pires y cols., 2009; Berson y cols., 2010).



**Figura 4.** Esquema representativo de la localización de los principales subtipos de células melanopsínicas en la retina de ratón. Las células M1 poseen su soma en la GCL (M1A) o en la INL (M1B) y sus dendritas ramifican en la sublámina OFF de la IPL. Las células M2 tienen su soma localizado en la GCL y sus dendritas ramifican en la sublámina ON de la IPL. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: *outer plexiform layer*, capa plexiforme externa; ONL: *outer nuclear layer*, capa nuclear externa.



**Figura 5.** Dibujo representativo de células melanopsínicas en la retina de ratón. **A.** Célula M1A. Soma en la GCL y dendritas en el plexo OFF de la IPL. **B.** M1B. Soma en la INL y dendritas en el plexo OFF. **C.** M2. Soma en la GCL y dendritas en el plexo ON. En azul, somas localizados en la GCL y dendritas del plexo ON. En rojo, somas situados en la INL y dendritas correspondientes al plexo OFF. Escala: 100  $\mu$ m.

Existe además un tercer tipo de células melanopsínicas, las biestratificadas. En esta subpoblación, el soma se localiza en la GCL o desplazado en la INL, y poseen un número similar de dendritas en ambas subláminas. Respecto a estas células la bibliografía es bastante controvertida y no existe consenso acerca de su funcionalidad. En algunos estudios se las considera como un tercer tipo, **células M3** (Viney y cols., 2007; Schmidt y cols., 2008), mientras que otros autores las consideran células M1 aberrantes (Berson y cols., 2010). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de células melanopsínicas, con un soma de gran tamaño localizado en la GCL. El inmunomarcaje en estas células es muy débil por lo que se sabe poco sobre sus campos dendríticos, aunque los datos existentes indican que solo ramifican en la sublámina ON. Berson y cols. (2010) las clasifican simplemente como "**otras células**". Parece que este nuevo subtipo celular podría corresponderse con las células que expresaban la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) bajo el control del promotor de la melanopsina, pero donde no se detectaba un marcate inmunopositivo para la melanopsina (Hatori y cols., 2008). Ecker y cols. (2010) han descrito en su último trabajo la presencia de dos nuevos subtipos de células fotosensibles en la retina de ratón, las células M4 y M5. Las **células M4** poseen su soma, con un diámetro de entre 17 y 22  $\mu$ m en la GCL. Sus dendritas ramifican en el plexo ON de la IPL con un diámetro de árbol dendrítico similar al de las células M2 (302-344  $\mu$ m) pero más denso. Las **células M5** poseen su soma en la GCL y sus ramificaciones dendríticas se localizan en el plexo ON de la IPL. La principal característica de este subtipo

## Introducción

celular es su campo dendrítico compacto, con un diámetro significativamente menor al del resto de subtipos celulares (149-217  $\mu\text{m}$ ). Otra característica de las células M4 y M5 es que no se detecta la presencia de melanopsina en las mismas, probablemente por una expresión muy baja de este fotopigmento.

El número de células melanopsínicas en la retina depende de la especie estudiada, pero nunca se sobrepasa el 3% del total de RGCs. A pesar del número limitado de este subtipo celular retiniano, las células melanopsínicas forman una red fotosensible que cubre por completo la retina, percibiendo toda la luz que llega al ojo (Provencio y cols., 2002; Berson y cols., 2010). La distribución de las células melanopsínicas en ratones adultos y humanos es uniforme por toda la retina, aunque se observa una densidad ligeramente superior en la retina dorsal y temporal (Hattar y cols., 2002). Respecto a los subtipos principales de células melanopsínicas, las células M1 y M2, hasta el momento no se han detectado diferencias zonales (Hattar y cols., 2002; Berson y cols., 2010).

En la retina de ratón existen dos isoformas de la melanopsina, la isoforma larga (*long*, L) y la isoforma corta (*short*, S), que se originan por *splicing* alternativo desde el gen *Opn4m* de la melanopsina (Pires y cols., 2009). Ambas codifican una opsina funcional y su localización es distinta en los subtipos celulares antes descritos. Las células M1 y M3 poseen ambas isoformas (L y S), mientras que en las células M2 solo se expresa la isoforma L. Además, mediante técnicas de RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) se ha demostrado que la isoforma L es menos abundante que la isoforma S, lo que podría explicar la menor intensidad de marcaje en las células M2 que habíamos comentado previamente.

## 7. Conectividad intrarretiniana de las células melanopsínicas

Dado que las células melanopsínicas son capaces de responder por sí mismas a la luz, inicialmente se pensaba que estas no recibían señales de las capas externas de la retina. Sin embargo, se ha demostrado que las células melanopsina-positivas reciben información proveniente de conos/bastones (Altimus y cols., 2008; Güler y cols., 2008) a través de las células bipolares y amacrinas (Belenky y cols., 2003; Viney y cols., 2007; Wong y cols., 2007).



En el apartado anterior hemos comentado la existencia de distintos patrones de estratificación de las células melanopsínicas, lo que hace que la señal que reciben de las capas externas de la retina sea distinta. Las dendritas de las células M1 ramifican en la sublámina OFF de la IPL y reciben *inputs* de las células bipolares OFF (Belenky y cols., 2003; Ostergaard y cols., 2007; Viney y cols., 2007; Wong y cols., 2007), aunque se ha demostrado que las células M1 también reciben aferencias directas (Wong y cols., 2007; Hoshi y cols., 2009) o indirectas (Pickard y cols., 2009) de células bipolares ON. Por el contrario, las células M2 que tienen sus dendritas en la sublámina ON de la IPL, establecen contactos sinápticos con las células bipolares ON (Wong y cols., 2007). Estas distintas conexiones intrarretinianas de las células melanopsínicas podrían estar marcando la distinta respuesta de estas células a un mismo estímulo lumínico.

Las células melanopsínicas, además de recibir información proveniente de las capas externas de la retina, también son capaces de exportar señales hacia el resto de la retina. De hecho, tanto en ratón como en humano, existen evidencias de que la actividad de las células melanopsínicas contribuye al control diario/circadiano de las vías visuales de los conos (Hankins y cols., 2002; Barnard y cols., 2006). Las RGCs que expresan la melanopsina mantienen uniones *gap* con células vecinas en la GCL (Sekaran y cols., 2003), por lo que esta podría ser la vía a través de la cual las células melanopsínicas ejercen una función neuromodulatoria en la retina. Además, las células M1 forman un plexo con células amacrinas dopaminérgicas (Vugler y cols., 2007; Zhang y cols., 2008), y reciben *inputs* de ellas. Es posible que la información también fluya en dirección contraria, y que las M1 ejerzan una regulación directa sobre células amacrinas dopaminérgicas, provocando así una liberación de dopamina que actuaría sobre la retina. No obstante, recientemente se ha señalado que la liberación de dopamina es independiente de la activación de las células melanopsínicas (Cameron y cols., 2009).

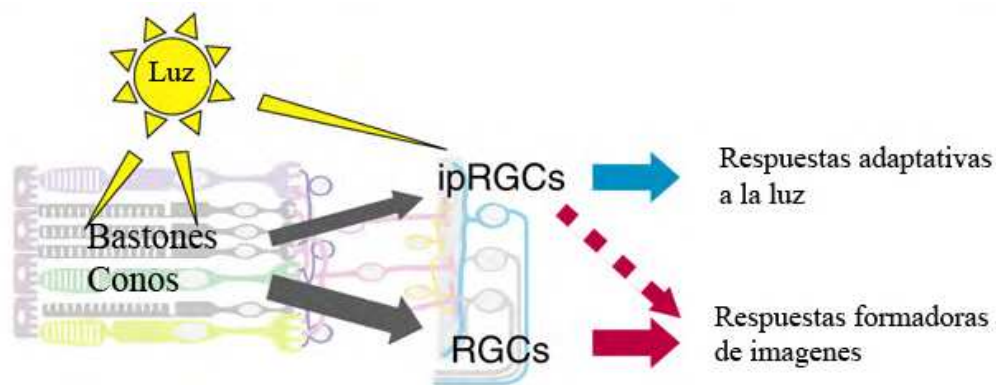
## **8. Interacciones entre conos, bastones y células melanopsínicas**

Los resultados obtenidos en el ratón *rd/rd cl* demostraron que los conos y los bastones no son necesarios para la sincronización (Foster y cols., 1991; Lucas y cols., 1999; Mrosovsky y cols., 2001; Sekaran y cols., 2003). Sin embargo, junto con los datos que señalaban que las células melanopsínicas recibían información de la retina externa (Belenky y cols., 2003; Viney y cols., 2007; Wong y cols., 2007; Altimus y cols., 2008; Güler y cols., 2008), existían otras

## Introducción

muchas evidencias que implicaban a los fotorreceptores externos en la visión no formadora de imágenes.

En animales donde se pierden tanto los conos/bastones como la melanopsina (triple *knockout*, *rd/rd Opn4<sup>-/-</sup>*) no existe ninguna respuesta circadiana. Estos ratones son incapaces de sincronizarse con el medio externo y permanecen en curso libre, suprimiéndose todas las respuestas adaptativas a la luz (Hattar y cols., 2003, Panda y cols., 2003). Los ratones con degeneración retiniana (sin conos ni bastones) mantienen intacta su fotosincronización y en los ratones *knock out* para la melanopsina (*Opn4<sup>-/-</sup>*), los conos y bastones son los responsables de la sincronización, aunque la respuesta observada está atenuada (Panda y cols., 2002; Ruby y cols., 2002; Lucas y cols., 2003; Mrosovsky y Hattar, 2003). Todos estos resultados indican que tanto las células melanopsínicas como los conos/bastones son capaces de enviar información lumínica hacia los centros de control circadianos, de modo que existe una cierta redundancia funcional entre las células melanopsínicas y los fotorreceptores clásicos (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema representativo de las interacciones entre conos/bastones y las células melanopsínicas. Las células melanopsínicas (ipRGCs) envían señales a distintas áreas cerebrales encargadas de la fotorrecepción circadiana. Los conos y bastones, principalmente implicados en la visión formadora de imágenes, también envían señales a través de las células melanopsínicas a estos centros cerebrales encargados de las respuestas adaptativas a la luz. Además, las células melanopsínicas también participan de forma indirecta en la visión formadora de imágenes. Modificada de Hatori y Panda (2010).

Como ya hemos mencionado, los fotorreceptores externos son los responsables de las respuestas circadianas en los animales *knockout* para la melanopsina. No obstante, es importante tener en cuenta que en estos ratones modificados, las RGCs que normalmente expresaban la melanopsina siguen intervando los mismos centros cerebrales (Lucas y cols., 2003). Por otro lado, son muchos los trabajos que han demostrado que existe además innervación en el SCN de RGCs no melanopsínicas (Gooley et al., 2003; Morin y cols., 2003;

Sollars y cols., 2003; Hannibal y Farhenkrug, 2004a; Hattar y cols., 2006). Sin embargo, las lesiones citotóxicas específicas en las células melanopsínicas suprimen cualquier tipo de respuesta circadiana, observándose comportamientos similares a los detectados en animales triple *knockout* (Guler y cols., 2008; Goz y cols., 2008; Hatori y cols., 2008). Estos estudios demostraron que las células melanopsínicas no solo son importantes por su fotosensibilidad, sino que son imprescindibles para el envío de la información lumínica captada por conos/bastones al SCN. Pero, ¿son las células melanopsínicas únicamente una vía de salida de la señal procedente de la retina externa? Dacey y cols. (2005) demostraron en macaco que la señal procedente de los conos de onda corta atenúa la respuesta a la luz de las células melanopsínicas, mientras que los bastones y los conos de onda media aportan un *input* excitatorio a estas células fotosensibles de la retina interna. Por tanto, las células melanopsínicas parecen desempeñar un papel triple en la retina: i) Participan en la fotosincronización, ya que son intrínsecamente fotosensibles; ii) Son la vía a través de la cual conos/bastones envían señales al SCN; iii) En ellas tiene lugar la integración de las contribuciones de conos/ bastones/ células melanopsínicas.

La cuestión que ahora se plantea es ¿cuál es el beneficio que obtiene el sistema circadiano al recibir señales de tres fotorreceptores distintos? Los datos existentes hasta la fecha parecen indicar que cada receptor contribuye en base a sus capacidades sensoriales. Por ejemplo, a intensidades lumínicas bajas o intermedias no se observan diferencias significativas en la constricción pupilar entre ratones *WT* (*wild type*, fenotipo salvaje) (conos/bastones y melanopsina) y los ratones *Opn4*<sup>-/-</sup>. Pero a intensidades lumínicas altas los ratones *Opn4*<sup>-/-</sup> muestran una menor constricción pupilar que los WT (Lucas y cols., 2001; Lucas y cols., 2003; Hattar y cols., 2003; Panda y cols., 2003). De forma parecida, los *Opn4*<sup>-/-</sup> se caracterizan por tener una menor supresión de la actividad debida a la luz cuando están bajo condiciones de iluminación prolongada (Mrosovsky y cols., 2003). Durante los primeros minutos de iluminación tanto los ratones WT como los *Opn4*<sup>-/-</sup> sufren una supresión total de la actividad. Sin embargo, si la iluminación se mantiene, los *Opn4*<sup>-/-</sup> reanudan la actividad, y en dos horas muestran un 50% de la actividad que tendrían en la fase de oscuridad. Estos datos indican que el papel de la melanopsina es más evidente bajo condiciones de irradiancia elevada o de larga duración. Por el contrario, la contribución de los conos y los bastones es más importante bajo condiciones lumínicas de baja intensidad.

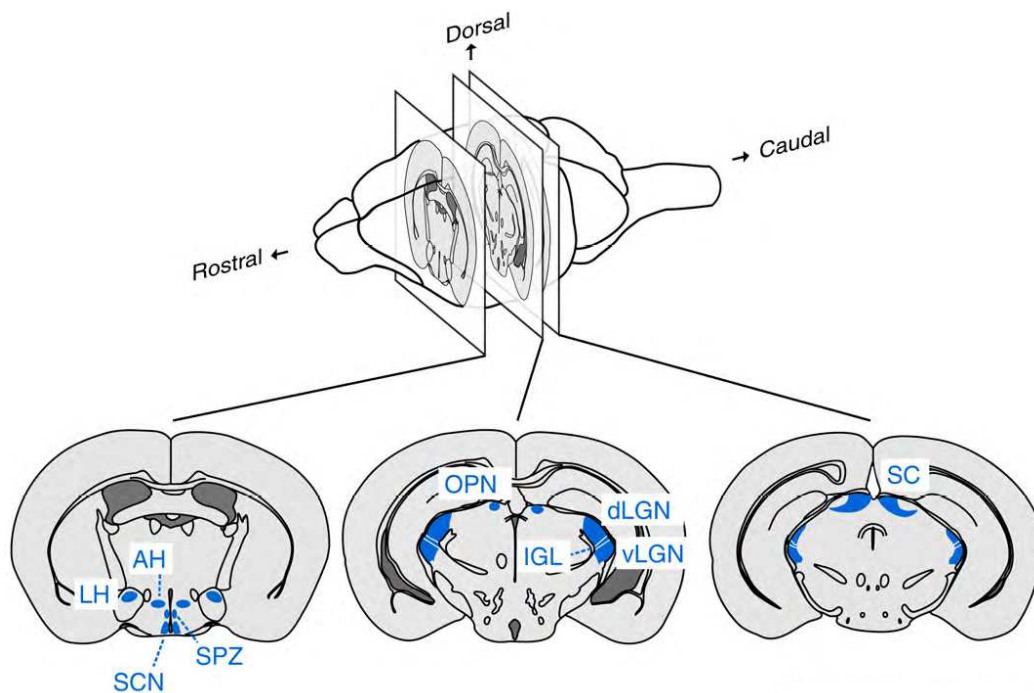
Hasta ahora hemos descrito la interacción entre conos, bastones y células melanopsina-positivas sobre el conjunto de respuestas adaptativas a la luz. Sin embargo, también existe una influencia sobre el sistema visual formador de imágenes (Figura 6). La amplitud y la velocidad de respuesta en la vía de los conos está influenciada por la historia lumínica previa del animal y por un ritmo circadiano. En los ratones *Opn4*<sup>-/-</sup> permanece el efecto de la historia lumínica previa, pero desaparece la influencia del control circadiano, provocando así una atenuación de la vía de los conos (Barnard y cols., 2006). Estos resultados aportan, por primera vez, una demostración directa de la modulación que ejercen las células que expresan el fotorpigmento melanopsina sobre los procesos formadores de imágenes. Por otra parte, la destrucción de las células melanopsínicas provoca una pérdida de reflejo pupilar bajo intensidades lumínicas elevadas, lo que puede llevar a un daño de la retina por exceso de luz, y afectar indirectamente al sistema formador de imágenes (Hatori y cols., 2008).

## 9. Proyecciones de las células melanopsínicas

La diferencia más importante entre células melanopsínicas y conos/bastones es que las primeras proyectan directamente al cerebro. La inervación más importante de las células que expresan la melanopsina es el SCN (Figura 7), con una proyección bilateral que se extiende a través del núcleo (Gooley y cols., 2001; Berson y cols., 2002; Hattar y cols., 2002), siendo esta proyección la encargada de sincronizar el reloj circadiano con el día solar. La mayoría de las aferencias que recibe el SCN son procedentes de las células melanopsínicas de la retina (Hattar y cols., 2006, Baver y cols., 2008; Güler y cols., 2008). Pero, tal y como hemos mencionado previamente, algunos estudios afirman que también existen aferencias de células ganglionares de la retina no melanopsínicas, aunque no se conoce la función que estas pueden desempeñar. Sorprendentemente, las células melanopsínicas de cada ojo proyectan equitativamente al SCN, mientras que el 95% de las RGCs no melanopsínicas poseen proyecciones contralaterales (Drager y Olsen, 1980; Miura y cols., 1997).

Otras áreas que reciben notables aferencias de las células melanopsínicas son el núcleo de la oliva pretectal (*olivary pretectal nucleus*, OPN) (Hattar y cols., 2002; Morin y cols., 2003; Hannibal y Farhenkrug, 2004a), donde tiene lugar el control de la respuesta pupilar (Trejo y Cicerone, 1984; Clarke y Ikeda, 1985; Young y Lund, 1994); y el núcleo geniculado lateral (Hattar y cols., 2002, Morin y cols., 2003; Hannibal y Farhenkrug, 2004a), conocido componente de la vía de sincronización circadiana (Harrington, 1997). Además, también se han

descrito proyecciones de las células melanopsínicas hacia el núcleo preóptico ventrolateral (Gooley y cols., 2003; Hannibal y Fahrenkrug, 2004a; Hattar y cols., 2006), implicado en la regulación del sueño y la actividad motora (Sherin y cols., 1996). La amígdala recibe aferencias desde las células melanopsínicas (Hattar y cols., 2006) y parece que este es el lugar donde tiene lugar la integración de los estímulos visuales y olfativos para regular el comportamiento reproductivo. La región subparaventricular ventral, el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Hattar y cols., 2002; Gooley y cols., 2003; Morin y cols., 2003; Hannibal y Fahrenkrug, 2004a) también reciben señalización de las células melanopsínicas, siendo el inicio de una ruta para los efectos de la luz sobre la fisiología y la función neuroendocrina (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de las distintas regiones cerebrales inervadas por los axones de las células melanopsínicas. SCN: núcleo supraquiasmático; LH: *lateral hypothalamus*, hipotálamo lateral; AH: *anterior hypothalamus*, hipotálamo anterior; SPZ: *subparaventricular zone*, zona subparaventricular; OPN: *olivary pretectal nucleus*, núcleo de la oliva pretecal; IGL: *intergeniculate leaf*, núcleo intergeniculado; dLGN: *dorsal lateral geniculate nucleus*, núcleo geniculado lateral dorsal; vLGN: *ventral lateral geniculate nucleus*, núcleo geniculado lateral ventral; SC: *superior colliculus*, colículo superior. Modificada de Hatori y Panda (2010).

Hasta ahora hemos descrito las aferencias de las células melanopsínicas a los centros cerebrales implicados en las respuestas adaptativas a la luz, pero estas células también envían aferencias a otras áreas cerebrales implicadas en la visión formadora de imágenes, como el núcleo geniculado lateral (Dacey y cols., 2005; Hattar y cols., 2006). Además, el colículo superior (centro implicado en la visión formadora de imágenes) recibe inervación de células

## *Introducción*

melanopsínicas M1 (Hannibal y Farhenkrug, 2004a; Hattar y cols., 2006; Baver y cols., 2008) (Figura 7). Estas proyecciones parecen ejercer un efecto modulador más que tener una función directamente relacionada con la formación de imágenes. Por otro lado, se ha detectado también que la irradiancia provoca cambios en la actividad de áreas sub-corticales y límbicas, lo que indica un posible efecto de este sistema fotorreceptor no visual en la atención, estado de ánimo y quizás sobre la función cognitiva (Vandewalle y cols., 2007).

Baver y cols. (2008) demostraron que los distintos subtipos de células melanopsínicas no proyectan de igual manera al cerebro, es decir, existe un patrón de inervación dependiente del subtipo celular. La proyección al SCN está compuesta de un 80% de aferencias de células M1 y un 20% de células M2; asimismo, la proyección al OPN consta de un 45% de células M1 y un 55% de células M2. Finalmente, la inervación del colículo superior procede exclusivamente de las células M1.

## **10. Fototransducción de las células melanopsínicas**

Contrariamente a lo que sucede en los fotorreceptores clásicos, conos y bastones, los cuales se hiperpolarizan en respuesta a luz, las células melanopsínicas sufren una despolarización, que da lugar a potenciales de acción que se propagan por el cerebro. Pero esta no es la única diferencia entre estos dos tipos de fotorreceptores. La respuesta de las células melanopsínicas puede ser extremadamente lenta, tardando varios segundos en alcanzar el máximo de respuesta bajo condiciones lumínicas tenues. En las células melanopsínicas no existe ninguna especialización de membrana como los discos de los segmentos externos de conos/bastones o los microvilli de los fotorreceptores rabdoméricos. La ausencia de estas especializaciones, las cuales llevan a un aumento del área de membrana y de la densidad del fotopigmento, hace que en las células melanopsínicas exista una baja captura de fotones por la opsina. Este hecho puede explicar la baja sensibilidad a la luz de estas células fotosensibles de la retina interna en comparación con los conos y los bastones (Berson y cols., 2002; Dacey y cols., 2005). Tal y como habíamos mencionado, la melanopsina se localiza tanto en dendritas como en somas, y ambas estructuras tienen capacidad de fototransducción. De hecho, la respuesta de las células melanopsínicas no necesita de una iluminación difusa, sino que el estímulo de tan solo el soma o las dendritas dan lugar a una respuesta, indicándonos que la maquinaria celular de fototransducción se encuentra ampliamente distribuida (Berson y cols., 2002). La melanopsina se localiza también en los

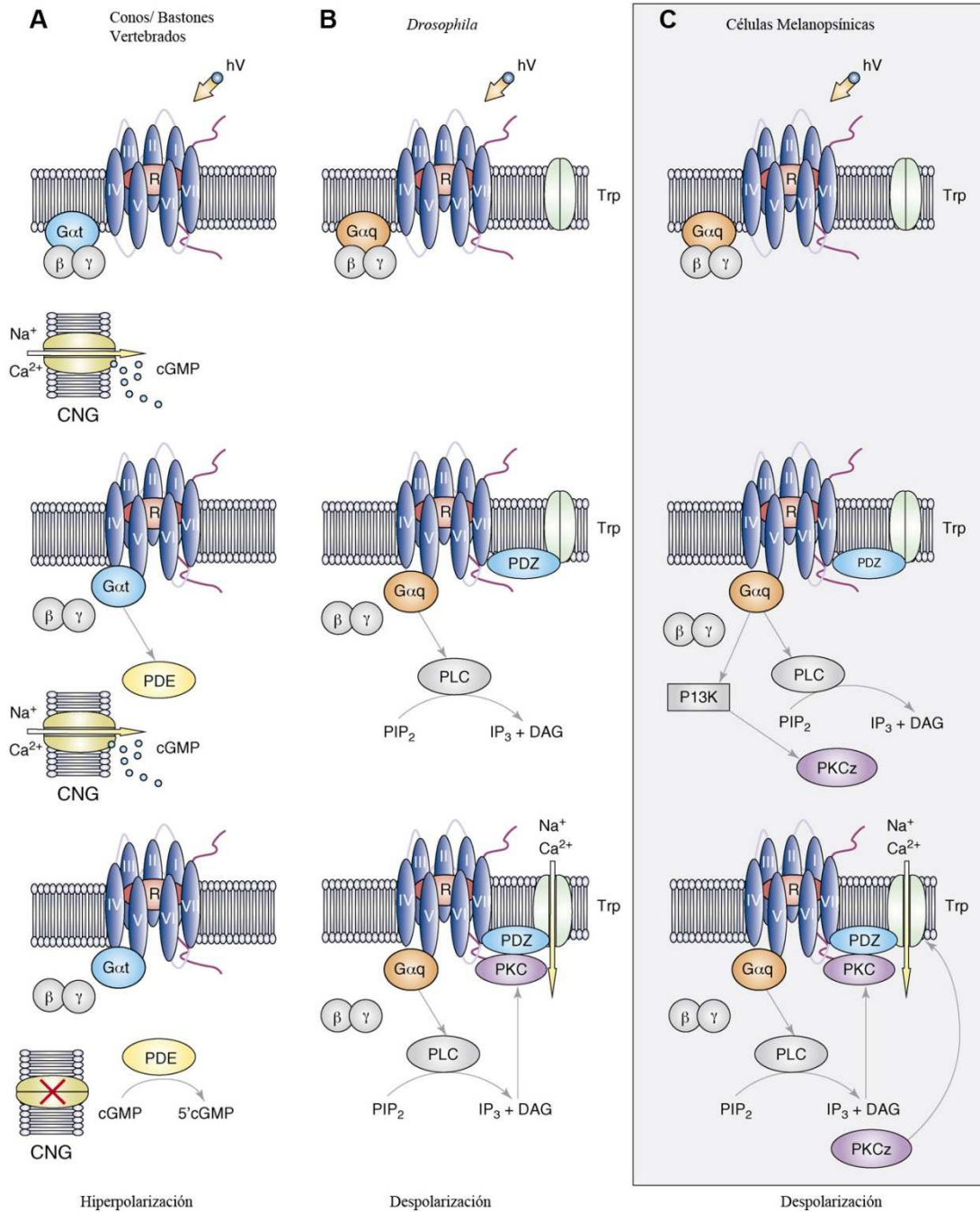
segmentos proximales de los axones, aunque por el momento no ha sido comprobada la capacidad de fototransducción en esta localización.

La melanopsina es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G. En general, las opsinas se unen a 11-cis retinaldehído en la oscuridad, el cual actúa como un antagonista inhibiendo la interacción con la proteína G. La luz es absorbida por el 11-cis retinaldehído, el cual se transforma en “todo-trans” durante el proceso. El retinaldehído todo-trans es un receptor agonista que hace que la opsina fotoactivada se una a la proteína G, iniciándose así la cascada de fototransducción. A lo largo del reino animal hay ejemplos de opsinas acopladas a proteínas G de distintas clases: Gt, Gq, Go y Gs (Terakita y cols., 2005; Koyanagi y cols., 2008). Las opsinas de los conos y bastones de vertebrados están acopladas a Gt (transducina), y esta activa una cascada dependiente de la fosfodiesterasa que resulta en el cierre de los canales (Figura 8A). Por el contrario, los sistemas de señalización lumínicos de los invertebrados (Figura 8B) guardan un gran paralelismo con el esquema de la fototransducción de la melanopsina (Figura 8C). La hipótesis general es que la melanopsina está acoplada a una proteína de la familia Gq/11, activando la vía del inositol trifosfato/diacil glicerol, y finalmente activando los canales TRPC7 (*transient receptor potential channel 7*, canal receptor de potencial transitorio 7) a través de una proteína-quinasa zeta, llevando a un aumento del calcio intracelular y la despolarización de la célula (Figura 8C) (Fu y cols., 2005; Isoldi y cols., 2005; Koyanagi y cols., 2005; Warren y cols., 2006; Peirson y cols., 2007; Sekaran y cols., 2007). Hasta el momento, la implicación de la proteína Gq/11 solo se ha demostrado en sistemas de expresión heteróloga (Panda y cols., 2005), aunque bajo estas condiciones experimentales la melanopsina también puede interactuar con otras proteínas G (Newman y cols., 2003; Melyan y cols., 2005). Pero ha de tenerse en cuenta que las células melanopsina-positivas expresan Gq y G11, así como varias fosfolipasas (Graham y cols., 2008) y canales TRPC (Warren y cols., 2006; Sekaran y cols., 2007). Además, la respuesta intrínseca de las células melanopsínicas puede ser bloqueada mediante el uso de inhibidores de la fosfolipasa C (Graham y cols., 2008), de los canales TRPC (Warren y cols., 2006; Sekaran y cols., 2007) y de la proteína G (Panda y cols., 2003).

Otra similitud de la melanopsina con las opsinas de invertebrados es que se trata de un pigmento biestable, es decir, es capaz de regenerar su propio cromóforo usando el todo-transretinal y luz de longitud de onda larga (Melyan y cols., 2005; Panda y cols., 2005; Qui y cols., 2005). Esta capacidad de regenerar su propio cromóforo parece venir dada por la

## Introducción

expresión de la melanopsina en las RGCs, muy alejadas del epitelio pigmentario, el cual actúa como punto de regeneración del cromóforo para los conos/bastones.



**Figura 8.** Esquema representativo de las cascadas de fototransducción. **A.** Los conos y bastones se despolarizan en oscuridad y el efecto de la luz es el cierre de un canal de la membrana plasmática resultando en una hiperpolarización. **B y C.** En los fotorreceptores de invertebrados y en las células melanopsínicas la luz provoca la apertura de un canal no específico de cationes que lleva a la despolarización de la célula. En todos los casos, los ftopigmentos son proteínas G unidas a receptores de membrana. El fotón lumínico es absorbido por el cromóforo provocando un cambio de



conformación de la opsina, que lleva a la activación de la proteína G, la cual está compuesta por 3 subunidades: *a*, *b* y *g*. La subunidad *a* en conos y bastones es la transducina, en *Drosophila* es *Gaq* y en las células melanopsínicas, se cree que es *Gaq/11*. CNG: *cyclic nucleotide gated channel*, canal iónico dependiente de nucleótidos cíclicos; TRPC: *transient receptor potential channel*, canal receptor de potencial transitorio; cGMP: *cyclic guanosine monophosphate*, guanosina cíclica monofosfato; PDE: *phosphodiesterase*, fosfodiesterasa; PLC: *phospholipase C*, fosfolipasa C; P13K: *P13 Kinase*, Quinasa P13; PtdIns(4,5)P2: *phosphatidylinositol bisphosphate*, fosfatidilinositol bifostato; Ins(1,4,5)P3: *inositol triphosphate*, inositol trifostato; DAG, *diacylglycerol*, diacilglicerol; PKCz: *protein kinase C zeta*, proteína quinasa C zeta; PKC: *protein kinase C*, proteína quinasa C; PDZ: *postsynaptic density protein complex*, proteína de densidad postsináptica. Modificada de Hankins y cols., 2008.

Las células melanopsínicas responden a la luz mediante un flujo de calcio, que termina en una despolarización de la célula y la transmisión de un potencial de acción hacia su diana. Durante el desarrollo postnatal se observan tres tipos de respuestas de las células melanopsina-positivas a la luz: i) tipo postnatal I: latencia larga tras el inicio del estímulo lumínico, elevada fotosensibilidad y terminación rápida de la actividad una vez finalizado el estímulo; ii) tipo postnatal II: elevada latencia tras el comienzo del estímulo, baja fotosensibilidad y finalización de la actividad lenta una vez que se retira el estímulo; iii) tipo postnatal III: latencia corta de respuesta, elevada fotosensibilidad y terminación de la actividad muy lenta tras el final de la estimulación. Sin embargo, en la retina adulta tan sólo se detectan dos tipos de respuestas en las células melanopsínicas, que se corresponden con las respuestas postnatales tipo I y II. Estas respuestas fueron estudiadas en las células M1 (Tu y cols., 2005) y ha sido recientemente cuando se ha demostrado que las células M2 también son intrínsecamente fotosensibles (Schmidt y cols., 2008). Además, ambos tipos celulares muestran distintas respuestas a la luz: las células M1 tienen una mayor sensibilidad y respuesta a la luz que las células M2 (Schmidt y Kofuji, 2009), hecho coincidente con que las células M1 expresan más melanopsina (Hattar y cols., 2006; Pires y cols., 2009). Y por otra parte, las células M1 son más sensibles a las señales que provienen de conos y bastones (Schmidt y Kofuji, 2009).

## 11. Ontogenia de las células melanopsínicas

La expresión de la melanopsina es más temprana que la de conos/bastones, detectándose por primera vez en la retina de ratón en el día embrionario (E) 10,5 (Tartellin y cols., 2003), justo tras la aparición de las RGCs en E9, las primeras células postmitóticas en la retina de vertebrados (Drager, 1985; Young, 1985).

## Introducción

En mamíferos, las RGCs sufren profundos cambios en morfología, fisiología y número de células durante el desarrollo postnatal. La génesis de las RGCs se completa durante el desarrollo prenatal, es decir, en el momento del nacimiento todas las RGCs son postmitóticas. Durante el desarrollo de la retina de vertebrados existe una sobreproducción de RGCs y en el periodo postnatal tiene lugar un proceso de muerte celular programada (apoptosis). La teoría neurotrófica postula que la supervivencia o muerte de las neuronas, en nuestro caso las RGCs, radica en el éxito que estas tengan al competir por los factores neurotróficos secretados por las células diana. En la retina del ratón C3H aproximadamente el 70% de las RGCs mueren en los primeros días postnatales (Strom y Williams, 1998). De la misma forma, las células melanopsínicas de la retina estarían expuestas a esta selección celular hasta alcanzar los valores que se detectan en el adulto. Sekaran y cols. (2005) describió que durante las dos primeras semanas postnatales se produce una disminución de la densidad de células melanopsínicas, la cual fue interpretado como una consecuencia de la muerte postnatal de estas células fotosensibles.

En mamíferos el SCN comienza a funcionar como reloj biológico al final del desarrollo prenatal a través de las señales maternas (Reppert y cols., 1985; Reppert y cols., 1988) y el RHT de roedores se detecta en el día postnatal (P) 0 (Speh y Moore, 1993; Leard y cols., 1994; Weaver y Reppert, 1995). Las células melanopsínicas responden a la luz desde P0 (Sekaran y cols., 2005; Tu y cols., 2005) y son capaces de inducir la expresión de *c-fos* en el SCN en P0 (Lupi y cols., 2006) o P4 (Muñoz-Llamosas y cols., 2000), dependiendo de la intensidad del estímulo lumínico. Todo esto indica que las células melanopsínicas son las primeras en ser funcionales y que este sistema fotorreceptor no formador de imágenes precede al formador de imágenes.

Pero, ¿cuál es el significado de este desarrollo tan temprano del sistema fotorreceptor no formador de imágenes? Todos los datos (funcionalidad desde el nacimiento, desarrollo más temprano que conos/bastones) parecen indicar que el sistema circadiano tiene un papel importante durante el desarrollo. De hecho, tanto en rata (Kandel y cols., 1987) como en ratón (Johnson y cols., 2010) se ha descrito fototaxis negativa en edades donde las células melanopsínicas son las únicas células fotosensibles de la retina. También es posible que la detección temprana de la irradiancia pueda tener un papel en el desarrollo del SCN u otros centros no visuales, al igual que conos y bastones afectan al desarrollo de centros visuales (Berardi y cols., 2000). Además, es necesario tener en cuenta que las células melanopsínicas poseen uniones *gap* con otras RGCs implicadas en el procesamiento de las imágenes (Dacey y

cols., 2005), y pueden así estar participando en el desarrollo del sistema formador de imágenes.

## 12. Regulación de la expresión de la melanopsina

La melanopsina muestra una expresión rítmica de su RNA bajo condiciones de luz/oscuridad (LO), alcanzándose el máximo al principio de la fase oscura (Sakamoto y cols., 2004; Sakamoto y cols., 2005; Hannibal y cols., 2005; Mathes y cols., 2007). Mathes y cols. (2007) demostraron que la expresión diaria de la melanopsina es capaz de adaptarse a los cambios en la longitud de la fase de luz y de oscuridad, mostrando bajo todas las condiciones experimentales un incremento en la cantidad de mRNA (*messenger RNA*, RNA mensajero) durante el día, con un pico en la transición entre la fase de luz y la de oscuridad. En la retina de mamíferos se conoce la existencia de relojes circadianos, por lo que estos ritmos, que se adaptan a los cambios de las condiciones ambientales, podrían deberse a la sincronización de esos relojes en la retina y su efecto sobre las células melanopsínicas. Sin embargo, bajo condiciones de luz continua (LL) o de oscuridad continua (OO) este ritmo diario desaparece (Hannibal y cols., 2005; Mathes y cols., 2007), indicando así que la regulación de la expresión de la melanopsina parece no ser circadiana, sino dependiente de la luz. Es importante mencionar que Sakamoto y cols. (2005) observaron un ritmo en la rata RCS bajo OO, aunque de menor amplitud que el observado bajo condiciones de LO, por lo que en este modelo parece que sí hay un factor circadiano implicado en la regulación de la melanopsina. Además, en rata albina bajo OO se ha observado un incremento muy potente tanto de la cantidad de proteína como de mRNA de la melanopsina, mientras que bajo LL se detecta una disminución (Hannibal y cols., 2005; Mathes y cols., 2007). Estos cambios dependientes de las condiciones ambientales observados en ratas albinas parecen ser adaptaciones funcionales del sistema melanopsínico, es decir, bajo OO se produce un incremento para intentar captar cualquier estímulo lumínico y por el contrario, en condiciones de LL el sistema está saturado. Es por ello que las condiciones continuas ambientales no solo parecen determinar la pérdida del ritmo diario de la melanopsina, sino que además estarían provocando profundos cambios en este sistema circadiano.

Una de las hipótesis que se han barajado es que los fotorreceptores externos sean el principal regulador de la melanopsina. En ratas se ha demostrado que la pérdida de conos y bastones lleva a una disminución del mRNA y proteína de la melanopsina hasta llegar a ser

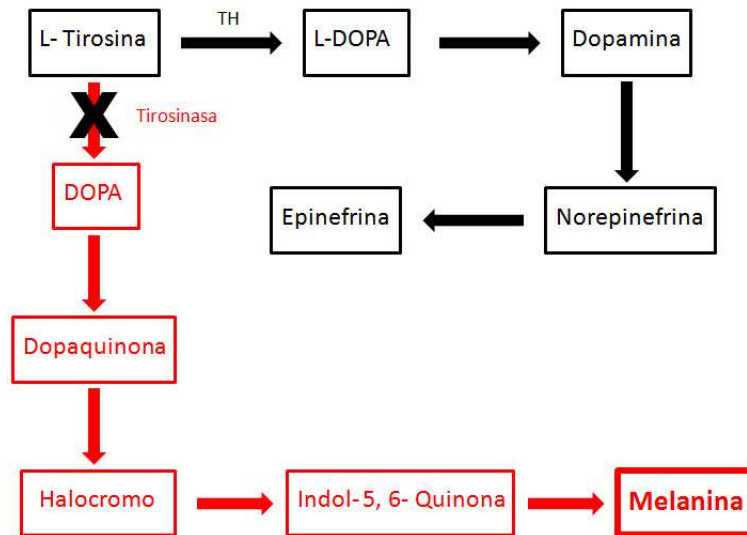
prácticamente indetectables. Sin embargo, los marcadores moleculares Thy 1 y PACAP no se ven afectados, por lo que la disminución del mRNA y proteína no se debe a la muerte celular de las células melanopsina-positivas (Sakamoto y cols., 2004; Wan y cols., 2006). Este mecanismo de regulación por parte de los fotorreceptores externos podría provenir de la señalización de la dopamina. Los conos y bastones regulan la síntesis y liberación de la dopamina en la retina, y esta modula la expresión de la melanopsina a través de los receptores de dopamina D2, los cuales se expresan en las células melanopsínicas (Sakamoto y cols., 2005). Además, la destrucción experimental de las células dopaminérgicas provoca una reducción de la expresión de la melanopsina, que puede ser revertida mediante el uso de un agonista del receptor D2 (Sakamoto y cols., 2005). A pesar de todas estas evidencias de un control por parte de los fotorreceptores externos y las células dopaminérgicas sobre la expresión de la melanopsina, es importante mencionar que el sistema melanopsínico no se ve afectado en ratones que sufren degeneración retiniana (Semo y cols., 2003). Además, Vugler y cols. (2008), demostraron en el mismo modelo usado por Sakamoto y cols., (2004) que, aunque sí existe una disminución del número de células melanopsínicas asociada a la degeneración de retina en la rata, no se observa una pérdida total. El ritmo diario de la melanopsina ha sido también observado en crías de rata albina, a una edad en la que conos y bastones no son aún funcionales (Hannibal y cols., 2007). Esto parece indicarnos que el ritmo diario no es, al menos en parte, dependiente de conos/bastones. Las crías de rata albina también responden a las condiciones lumínicas ambientales, con una disminución de la cantidad de proteína bajo LL y un aumento de la misma en OO (Hannibal y cols., 2007). Sin embargo, esta adaptación a la luz tan solo se detecta a nivel de proteína, no observándose cambios en el mRNA similares a los detectados en animales adultos sometidos a las mismas condiciones ambientales, lo que parece indicar que el sistema no está completamente desarrollado.

Con estos resultados aún no se puede establecer con claridad cuál es el mecanismo de regulación de la expresión de la melanopsina, ni cuáles son sus efectos sobre el comportamiento y la fotosincronización.

### **13. La retina de los animales albinos**

El albinismo es una condición genética hereditaria en la que hay una ausencia congénita de pigmentación (es decir, ausencia de melanina). En los individuos no albinos la melanina se sintetiza tras una serie de reacciones enzimáticas por las cuales se produce la

transformación del aminoácido tirosina en melanina por acción de la enzima tirosinasa (Figura 9). Los individuos albinos tienen esta ruta metabólica interrumpida ya que su enzima tirosinasa (enzima limitante de la ruta de síntesis de melanina) no presenta actividad alguna o muy poca (tan poca que es insuficiente), de modo que no se produce la transformación y no presentarán pigmentación.



**Figura 9.** Vía de síntesis de la melanina. La melanina se sintetiza en los melanocitos y epitelio pigmentario por la actividad de la tirosinasa. En los animales albinos esta enzima está mutada por lo que la síntesis de melanina es baja o inexistente. La otra vía metabólica de L-tirosina es perfectamente funcional en los animales albinos. TH: *tyrosine hydroxylase*, tirosin hidroxilasa; L-DOPA: *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*, L-3,4-dihidroxifenilalanina; DOPA: *dihydroxyphenylalanine*, dihidroxifenilalanina.

La melanina presente en el epitelio pigmentario ejerce una importante influencia en el desarrollo de la retina neural, ya que cuando esta proteína está reducida o ausente, el desarrollo es anómalo (Jeffery y Kinsella, 1992). En la retina de los animales existe un retraso en la neurogénesis (Iliá y cols., 1996), con una retina central hipodesarrollada y viéndose afectadas todas las capas celulares de la retina. El mayor daño se detecta en la ONL, donde el número de bastones se ve drásticamente reducido, aunque no el de conos (Jeffery y cols., 1994a). Además, también se observan alteraciones en el quiasma óptico. En mamíferos, la mayoría de las RGCs proyectan contralateralmente, pero una pequeña proporción de células de la retina temporal proyectan ipsilateralmente. En albinos, estas fibras que deberían proyectar hacia el hemisferio ipsilateral ven modificado su patrón de proyección durante el desarrollo y proyectan contralateralmente, formándose mapas binoculares anómalos en el núcleo geniculado lateral (Drager y Olsen, 1980; Jeffery y cols., 1994a). A pesar de todas estas

## *Introducción*

anomalías presentes en la retina, son muchos los estudios que utilizan modelos albinos para el estudio de la retina asumiendo que se puede realizar una extrapolación de los resultados a otros modelos no albinos.

.....

Las RGCs que expresan el fotorreceptor melanopsina constituyen en suma el principal mediador de la fotosincronización circadiana, un proceso por el cual el SCN (reloj biológico principal de mamíferos) se ajusta diariamente con los ciclos externos de luz-oscuridad. Una serie de estudios publicados en los últimos años, han demostrado que las células melanopsínicas son fotosensibles desde el nacimiento (Sekaran y cols., 2005; Tu y cols., 2005) y que el SCN comienza a responder desde el periodo postnatal temprano (Lupi y cols., 2006; Muñoz-Llamas y cols., 2000). Todos estos datos indican que el sistema fotorreceptor circadiano es funcional desde el día del nacimiento.

Con estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos estudiar el desarrollo de las células fotosensibles de la retina que expresan la melanopsina, así como la influencia de las condiciones ambientales sobre las mismas.

# ***Objetivos***





**1. Desarrollo de las células melanopsínicas en ratones pigmentados C3H +/+ y albinos CD1.**

- a) Averiguar si las células que expresan el fotopigmento melanopsina en la retina pigmentada están sujetas a la muerte neurotrófica que tiene lugar durante el desarrollo postnatal.
- b) Estudiar el desarrollo prenatal de las células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado.
- c) Determinar la influencia del albinismo sobre el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas.

**2. Efecto de las condiciones ambientales constantes sobre el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina pigmentada C3H +/+ y albina CD1.**

- a) Estudiar el efecto de la iluminación constante durante el desarrollo postnatal sobre el número de células melanopsínicas.
- b) Estudiar el efecto de la oscuridad constante sobre el número de células melanopsínicas.
- c) Averiguar si los cambios inducidos por la iluminación constante en la cepa CD1 se podían revertir con la administración de ciclos de luz y oscuridad.

**3. Oscilación diaria de las células fotosensibles de la retina interna de ratón.**

- a) Estudiar la variación diaria del número de células melanopsínicas en la retina pigmentada C3H +/+ y albina CD1.
- b) Analizar el desarrollo postnatal de la variación diaria de las células melanopsínicas en la retina pigmentada C3H +/+
- c) Determinar el efecto de las condiciones ambientales constantes sobre la oscilación diaria de las células fotosensibles de la retina pigmentada.
- d) Determinar el origen, transcripcional o postranscripcional, de la oscilación diaria de las células melanopsínicas en los ratones albinos y pigmentados.
- e) Determinar si las diferencias observadas entre animales albinos y pigmentados son observadas en otros genes de la retina.



# ***Material y Métodos***



## 1. Animales de experimentación

En el presente estudio se han utilizado dos cepas de ratón (*Mus musculus*):

- Ratón C3H/He (+/+ para el alelo *rd*): estos animales poseen una retina normal, ya que a pesar de que los C3H/He que se adquieren comercialmente son *rd/rd* (con degeneración retiniana), los del presente estudio se tomaron de una colonia (cedida por el Prof. Russell Foster, Universidad de Oxford) que se había originado por retrocruzamiento con otra cepa de retina normal hasta eliminar el gen mutante de la PDE de bastones (gen *rd*) manteniendo el fondo genético de la cepa C3H/He.
- Ratón CD1 (Charles River Labs): esta cepa posee una mutación genética de la enzima tirosinasa bloqueando el paso de la L-tirosinasa a DOPA y la subsiguiente formación de melanina. Esta alteración en la enzima tirosinasa es la causante del albinismo presente en los ratones CD1. Las retinas albinas se caracterizan por ciertas anomalías, tales como un menor número de bastones, hipodesarrollo en la retina central y alteraciones en el quiasma óptico. Estas peculiares características hacen de los animales albinos un modelo muy interesante para el estudio de la retina.

Excepto en las edades muy tempranas de los animales, en las que aún no podía distinguirse el sexo, las muestras analizadas siempre correspondieron a ratones macho.

Todos los animales utilizados en la presente tesis fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad. Los animales fueron alimentados con pienso estándar (2014S Harlan) y agua *ad libitum*. Durante el periodo previo a la experimentación, los animales fueron mantenidos bajo un fotoperiodo estándar constante (12 horas luz/ 12 horas oscuridad, LO) con luz emitida desde los fluorescentes de la habitación (intensidad lumínica:  $300 \pm 50$  lux) en la fase de día y completa oscuridad en la fase de noche. Estas mismas condiciones fueron mantenidas cuando los animales eran expuestos a condiciones constantes de LL u OO.

Con el fin de minimizar el sufrimiento de los animales, el sacrificio de los mismos fue llevado a cabo mediante anestesia previa en una atmósfera saturada de dióxido de carbono y posterior decapitación. Los experimentos fueron llevados a cabo según lo aprobado por la Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de Noviembre de 1986 relativa a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

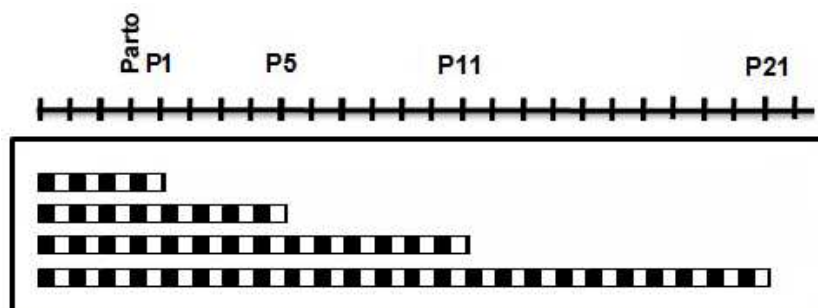
## 2. Diseño experimental

### 2.1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en el ratón pigmentado

Con el fin de analizar el desarrollo postnatal se realizaron dos experimentos que se complementan entre sí:

#### 2.1.1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en secciones de retina

Al igual que en el experimento anterior, las hembras gestantes C3H+/+ y las crías tras el parto se mantuvieron bajo LO. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación en cuatro edades postnatales: P1, P5, P11 y P21 (Figura 10), siempre en la misma fase del ciclo (ZT3, siendo ZT0 el comienzo de la fase lumínica). El análisis del desarrollo postnatal fue realizado mediante inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n= 4 en todos los grupos. Como se explica más adelante, en todos los análisis efectuados sobre secciones de retina, siempre se realizó un muestreo homogéneo correspondiente a la sexta parte de cada retina.

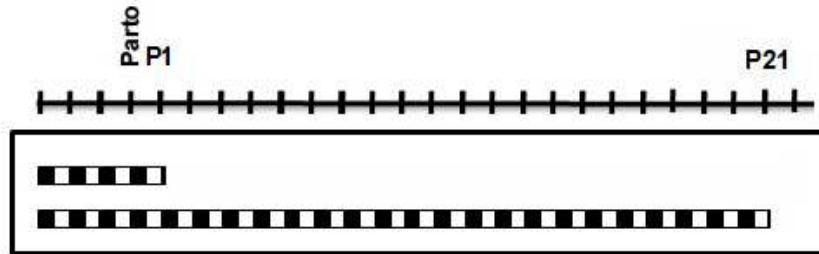


**Figura 10.** Diseño experimental para el estudio del desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en secciones de retina. Los animales estuvieron sometidos a LO desde el nacimiento hasta el momento del sacrificio en P1, P5, P11 y P21. En esta figura y en las sucesivas de esta sección los segmentos blancos y negros indican periodos de luz y oscuridad, respectivamente.

#### 2.1.2. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en retinas enteras

Para la realización de este estudio, hembras C3H+/+ fueron mantenidas bajo condiciones estándar de LO durante todo el periodo gestante. Tras el parto, las crías estuvieron bajo estas mismas condiciones lumínicas. Las muestras fueron tomadas a ZT3 en P1

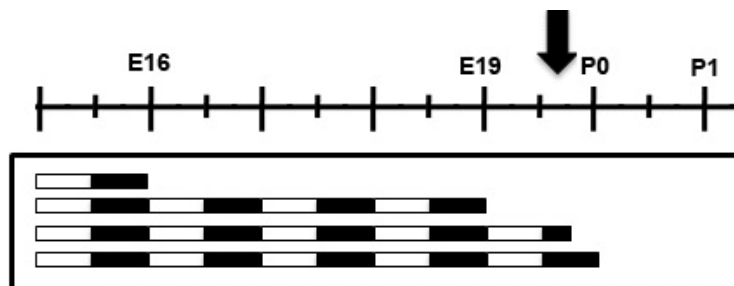
y P21 (Figura 11). El análisis de las células melanopsínicas fue llevado a cabo mediante inmunofluorescencia en retinas enteras. Se analizaron un total de 4 individuos por grupo experimental (n=4).



**Figura 11.** Diseño del estudio del desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en retinas enteras de ratones C3H+/+ mantenidos bajo LO desde el nacimiento. P1 y P21 corresponden a los días de sacrificio.

## 2.2. Desarrollo prenatal y perinatal de las células melanopsínicas en el ratón pigmentado

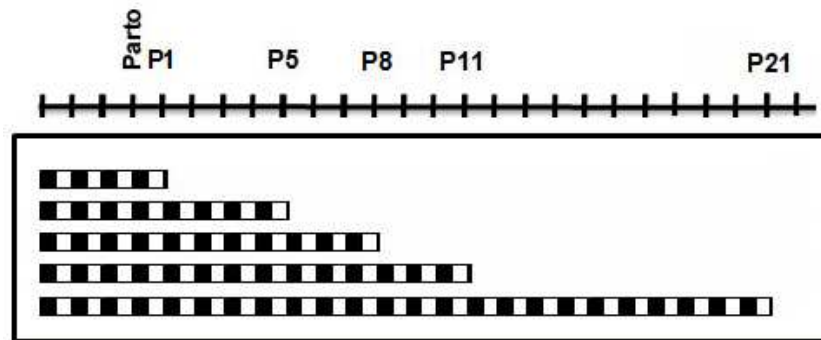
Las hembras gestantes C3H+/+ fueron mantenidas bajo condiciones LO. Para la realización de las cesáreas (a ZT3) fueron anestesiadas y posteriormente, se procedió al sacrificio por decapitación tanto de las hembras gestantes como de sus fetos. Las edades analizadas mediante inmunofluorescencia fueron E16, E19 y P0, siendo n=3 en todos los grupos (Figura 12). Además, en este experimento se estudiaron también retinas de animales recién nacidos (0-4 horas tras el parto) (n=3), por lo que el sacrificio tuvo lugar en ZT19 (mitad de la fase oscura del ciclo LO) (flecha).



**Figura 12.** Diseño experimental del estudio prenatal y perinatal. Se estudiaron las células que expresan la proteína melanopsina en E16, E19 y P0. Asimismo, se analizó esta población en retinas de animales nacidos entre 0 y 4 horas antes del sacrificio (flecha).

### 2.3. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en el ratón albino

El desarrollo postnatal del sistema melanopsínico en la retina albina fue estudiado en animales CD1 sometidos a condiciones de LO desde el nacimiento. Se analizaron cinco edades postnatales P1, P5, P8, P11 y P21 (Figura 13) mediante inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n=4 en todos los grupos. Al igual que en los experimentos anteriores, el sacrificio de los animales tuvo lugar 3 horas después del comienzo de la fase lumínica (ZT3).

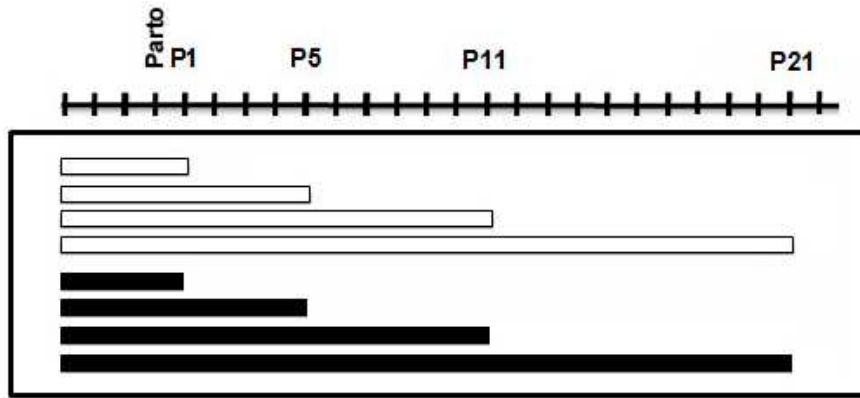


**Figura 13.** Diseño experimental para estudiar el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina albina. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de LO desde el nacimiento. Se estudiaron cinco edades postnatales: P1, P5, P8, P11 y P21.

### 2.4. Efecto de las condiciones lumínicas constantes sobre las células que expresan la melanopsina en el ratón pigmentado

Con el fin de determinar el efecto de las condiciones constantes, las hembras gestantes C3H+/+ fueron sometidas a condiciones de LL u OO desde tres días antes de la fecha prevista para el parto (Figura 14). Tras el nacimiento, las crías continuaron en esas condiciones constantes hasta el momento del sacrificio. Las muestras de este estudio fueron tomadas en cuatro edades postnatales: P1, P5, P11 y P21, siendo n=4 en cada grupo. El efecto de la LL o de OO sobre las células que expresan la proteína melanopsina fue analizado mediante inmunohistoquímica en secciones de retina.

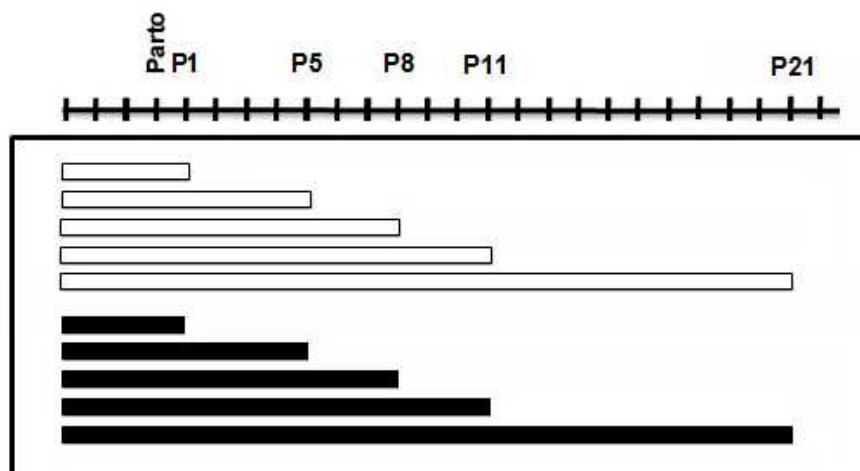




**Figura 14.** Diseño experimental para el análisis del efecto de las condiciones continuas de LL u OO sobre las células melanopsínicas de la retina. Los animales fueron mantenidos bajo estas condiciones constantes desde el nacimiento. Bajo ambas condiciones lumínicas, se analizaron retinas de animales a P1, P5, P11 y P21.

## 2.5. Efecto de las condiciones ambientales constantes sobre las células melanopsínicas en la retina albina

Al igual que en el experimento diseñado para el estudio en animales pigmentados, las hembras gestantes CD1 fueron sometidas a condiciones lumínicas constantes desde tres días antes de la fecha prevista para el parto. Tras el nacimiento, las crías se mantuvieron en las mismas condiciones constantes hasta su sacrificio en P1, P5, P8, P11 y P21 (Figura 15). Las muestras fueron analizadas mediante inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n=4 en todos los grupos.



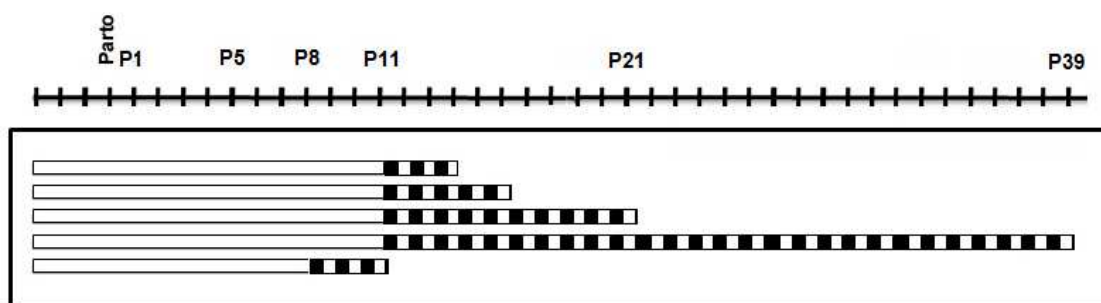
**Figura 15.** Diseño experimental para analizar el efecto de las condiciones constantes sobre las células que expresan melanopsina en la retina albina. Los animales fueron mantenidos bajo LL u OO desde el nacimiento hasta el

## Material y Métodos

momento de su sacrificio. En ambos experimentos se analizaron secciones de retina en P1, P5, P8, P11 y P21.

### 2.6. Recuperación del número de células que expresan melanopsina tras la reducción inducida por LL en la retina albina

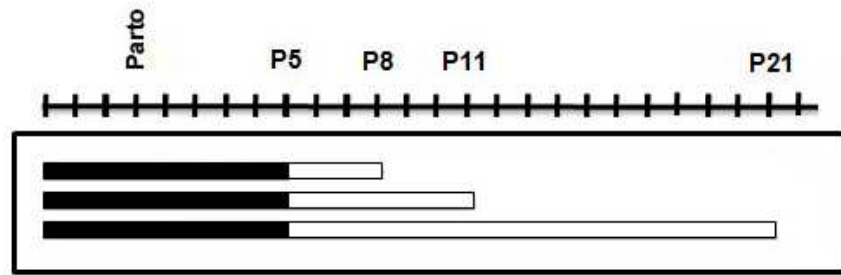
Con el fin de analizar la posible recuperación del número de células que expresan melanopsina tras la inhibición inducida por LL, los ratones albinos fueron mantenidos en LL desde el nacimiento hasta P11 y a continuación sometidos a 3, 5, 10 y 28 ciclos de LO (Figura 16). Además, otro grupo de animales estuvo bajo LL desde el nacimiento hasta P8, tras lo cual, fue sometido a 3 ciclos de LO. Al igual que en los experimentos anteriores, las muestras fueron tomadas en ZT3. Todos los estudios fueron realizados utilizando técnicas de inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n=4 en todos los casos.



**Figura 16.** Diseño experimental para estudiar la recuperación de las células melanopsínicas en la retina albina. Los ratones se mantuvieron en LL tras el nacimiento hasta P11 y a continuación fueron sometidos a 3, 5, 10 y 28 ciclos de LO. También se analizaron retinas de animales mantenidos bajo LL hasta P8 y posteriormente, sometidos a 3 ciclos de LO.

### 2.7. Exposición de los ratones albinos a OO seguido de LL

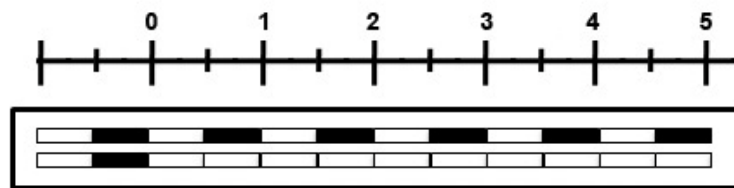
Con el fin de determinar el efecto de la LL sobre las células que expresan la melanopsina en una retina parcialmente desarrollada, los ratones CD1 fueron mantenidos desde el nacimiento hasta P5 en OO y a continuación, transferidos a 3, 6 y 16 ciclos de LL (Figura 17). Las muestras fueron analizadas mediante inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n=4 en todos los grupos.



**Figura 17.** Diseño experimental para el análisis del efecto de la LL sobre la retina albina parcialmente desarrollada. Los animales fueron sometidos a OO hasta P5 y a continuación, mantenidos bajo LL durante 3, 6 y 16 ciclos.

### 2.8. Efecto de la LL sobre la retina adulta albina

Con el fin de comprobar si la LL causa algún efecto en una retina completamente desarrollada, ratones albinos de 3 meses de edad fueron sometidos a cinco ciclos de LL (Figura 18). Tras este tratamiento lumínico, el análisis de las células melanopsínicas fue realizado mediante inmunohistoquímica en secciones de retina, siendo n=4 en todos los grupos.



**Figura 18.** Diseño experimental para el estudio del efecto de la LL sobre retinas albinas adultas. Se compararon animales de 3 meses de edad sometidos a LO desde el nacimiento con animales mantenidos en LO y a continuación, sometidos a 5 ciclos de LL.

### 2.9. Ritmo diario de las células que expresan la melanopsina en la retina de ratón

La variación en el número de las células melanopsínicas fue estudiada en ratones adultos C3H+/+ y CD1 mantenidos bajo LO. Para ello, se analizaron distintos puntos horarios: ZT3, ZT8, ZT13, ZT18 y ZT23, siendo ZT0 el comienzo de la fase lumínica y ZT12 el comienzo de la fase de oscuridad (Figura 19). Asimismo, los puntos ZT3 y ZT23 fueron también estudiados durante el desarrollo postnatal en los animales pigmentados para determinar el momento en que se establece esta oscilación diaria. Todos estos experimentos fueron realizados en secciones de retina mediante inmunohistoquímica, siendo n=4 en cada caso.

Este diseño experimental fue también utilizado para el análisis de la oscilación diaria del mRNA de la melanopsina en la retina de ratones adultos de ambas cepas. En este caso, el mRNA fue analizado mediante RT-PCR. Asimismo, la oscilación diaria del mRNA de c-fos, Period 2 (Per2) y opsina de bastones también fue analizada siguiendo el mismo diseño experimental.



**Figura 19.** Representación de los tiempos elegidos para el análisis de la oscilación diaria de las células melanopsínicas y el mRNA de la melanopsina, c-fos, Per2 y opsina de bastones en los ratones C3H +/+ y CD1. En ambos experimentos se analizaron muestras tomadas en ZT3, ZT8, ZT13, ZT18 y ZT23.

## 2.10. Efecto de la OO sobre la oscilación diaria del número de células que expresan la melanopsina

Con el fin de estudiar el efecto de la oscuridad constante sobre la oscilación diaria de las células fotosensibles de la retina, ratones C3H+/+ adultos fueron sometidos a 6 ciclos de OO. Tras esto, se tomaron muestras de retina en distintos puntos horarios: CT3 (*circadian time*, hora circadiana), CT8, CT13, CT18 y CT23, siendo CT0 el comienzo del día subjetivo y CT12 el comienzo de la noche subjetiva (Figura 20). Para calcular el CT de estos animales se consideró que la longitud del periodo endógeno era de 23,5 horas, tal y como ha sido descrito en trabajos previos (Rollag y cols., 2003; Hatori y cols., 2008). El análisis de las células melanopsínicas fue realizado en secciones de retina mediante técnicas de inmunohistoquímica.



**Figura 20.** Representación de los tiempos elegidos para el análisis del efecto de OO sobre la variación diaria de células que expresan la proteína melanopsina en la retina del ratón pigmentado C3H+/+. Se analizaron cinco puntos horarios distribuidos a lo largo del periodo subjetivo (n=4 por grupo).

### **3. Análisis inmunohistoquímico en secciones de retina**

#### **3.1. Fijación del tejido**

Tras la enucleación posterior al sacrificio de los animales, se procedió a la fijación de los ojos, que se llevó a cabo por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% (PF 4%) en tampón fosfato (*phosphate buffer*, PB) 0.1M, pH 7,4, durante 24 horas a 4º C. Una vez finalizada la fijación, las muestras fueron lavadas en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) durante 1 día, eliminándose así el exceso de fijador.

#### **3.2. Preparación del tejido para su seccionado con el micrótopo**

Tras la fijación, se procedió a la inclusión en parafina (punto de fusión 56ºC) de las muestras. Antes de comenzar, se extrajo en todos los ojos el cristalino para facilitar el corte. En los ratones CD1, dado que carecen de pigmento, el ojo al completo fue teñido durante unos segundos en azul de toluidina al 1% para facilitar su localización en el bloque de parafina.

Previamente a la inclusión, se realizó la deshidratación de los ojos mediante una batería de etanoles de concentración creciente, utilizándose xileno como medio intermediario entre etanol y parafina. El proceso de inclusión de las muestras se realizó de forma gradual en una estufa a 60ºC. En primer lugar, se introdujeron en un molde durante 15 minutos en la estufa en una mezcla de xileno y parafina. A continuación, el tejido se pasó a parafina pura, manteniéndose en ella durante una hora, para asegurar la total evaporación del xileno. Una vez que las muestras estuvieron bien embebidas, se retiraron de la estufa dentro de sus moldes e inmersas en parafina, y se procedió a la realización de los bloques a temperatura ambiente por solidificación de la parafina.

Los bloques de tejido se seccionaron con un microtomo (MICROM HM350S), obteniéndose cortes de 10 micras de grosor. Estas secciones fueron montadas sobre gotas de agua destilada en portaobjetos previamente gelatinizados, que a continuación fueron secados en una estufa a 40ºC. Los cortes se montaron realizando 6 series paralelas, de las cuales se usaría una para la inmunohistoquímica.

### 3.3. Marcaje inmunocitoquímico de secciones con el método ABC

Las secciones de retina fueron desparafinadas en dos baños de xileno de 10 minutos de duración cada uno, y a continuación se procedió a la rehidratación del tejido siguiendo una batería de etanoles de concentración decreciente, con baños de 5 minutos de duración en cada etanol.

Las secciones ya desparafinadas se lavaron en agua destilada durante 5 minutos y posteriormente en tampón fosfato salino con tritón al 0.4% (*phosphate buffered saline with Triton*, PBS-T 0.4%) de pH 7.4 durante 15 minutos. En todas las secciones la actividad peroxidasa interna fue bloqueada mediante la inmersión de las mismas en PBS con peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 1 hora. A continuación, los cortes fueron incubados con suero normal diluido al 30% en PBS durante 1 hora para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. Inmediatamente después, se eliminó el exceso de suero, y sin lavar, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario diluido en PBS durante 72 horas a 4°C en cámara húmeda.

Para poner de manifiesto la unión antígeno-anticuerpo se empleó el método ABC usando el Kit Vectastain Elite (Vector Labs) y la 3,3'diaminobencidina tetrahidroclorido (DAB) (Sigma) como cromógeno, tal y como se detalla a continuación:

Una vez incubadas con el anticuerpo primario, las secciones recibieron dos lavados en PBS-T 0,4%, de 10 minutos de duración cada uno. Posteriormente, fueron incubadas durante 1 hora y media con un anticuerpo secundario biotinado en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras lo cual, se dieron dos nuevos lavados de 10 minutos en PBS-T 0.4%, y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa diluida en PBS durante 1 hora y media en cámara húmeda y a temperatura ambiente. A continuación se lavaron en PBS y se revelaron con DAB durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con un lavado de 5 minutos en agua destilada. Después de este lavado, se pasa a la deshidratación de los cortes, pasando los portaobjetos por una batería de etanoles de concentración creciente. Una vez deshidratadas las secciones se procedió a transparentarlas con eucaliptol y montarlas en un medio hidrofóbico (Eukitt).

En todos los experimentos de marcaje inmunocitoquímico llevados a cabo se realizaron controles negativos con el fin de determinar el correcto marcaje por parte de los anticuerpos utilizados. Para ello, se sustituyó el anticuerpo primario por una solución de inmunoglobulinas G inespecíficas procedentes de la misma especie donde se generó el anticuerpo primario, utilizado a la misma concentración que este.

### **3.4. Inmunofluorescencia en secciones de retina**

El protocolo seguido para realizar la inmunofluorescencia es el descrito en la sección anterior 3.3. omitiendo el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena.

Tras la incubación con el anticuerpo primario durante 72 horas a 4°C, se puso de manifiesto la unión antígeno-anticuerpo mediante el uso de un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo tal y como se detalla a continuación:

Una vez incubadas con el anticuerpo primario, las secciones recibieron dos lavados en PBS-T 0,4%, de 10 minutos de duración cada uno. Posteriormente, fueron incubadas 2 horas con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras lo cual, se dieron cuatro nuevos lavados de 10 minutos en PBS-T 0.4%. A continuación, se procedió a la realización de un contraste. Para ello se utilizaron marcadores intercaladores de DNA con el fin de delimitar los estratos de la retina. El marcador utilizado fue DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 4', 6-diamidino-2-fenilindol). Las muestras fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con DAPI en una dilución 1:1000 en PBS. Finalmente, tras una serie de lavados con PBS en agitación, se realizó el montaje de las retinas en un medio hidrofílico (Vectashield, Vector Labs.), que preserva la fluorescencia de las muestras.

Para los dobles marcajes, se realizó una mezcla de los anticuerpos primarios y los secundarios respectivamente, manteniendo en todo momento la dilución óptima de trabajo de cada anticuerpo, y siguiendo los mismos protocolos de inmunotinción y montaje ya mencionados.

### **3.5. Análisis de las muestras**

Las secciones analizadas constituyeron una muestra representativa de la retina del animal. De las 6 series paralelas obtenidas de cada retina, todos los análisis inmunocitoquímicos y recuentos posteriores se llevaron a cabo en una de las series, por tanto, en una sexta parte de la retina.

En cada uno de los cortes se llevó a cabo un recuento de las células melanopsina-positivas. Además, también se realizó una clasificación morfológica de todas las células melanopsínicas en los subtipos M1 y M2 descritos previamente. Por otro lado, se estudiaron las ramificaciones dendríticas de este subtipo celular de la retina con el objeto de analizar la formación de los plexos dendríticos característicos durante el desarrollo, así como la influencia de las condiciones ambientales externas sobre estos.

Las imágenes de secciones de retina mostradas en el presente estudio se obtuvieron con una cámara digital Nikon (modelo DS-Fi1) acoplada a un microscopio Nikon (Modelo Eclipse E400), con el software suministrado por el fabricante de la misma. Las imágenes se transformaron en un formato de mapa de bits mediante el programa Adobe Photoshop CS2.

## **4. Inmunofluorescencia en retinas enteras**

### **4.1. Preparación del tejido**

Tras la fijación de las muestras durante 24 horas en PF 4% en PB 0.01M a 4°C, se procedió a su lavado en PBS durante 24 horas a 4°C. El siguiente paso consistió en la crioprotección del tejido antes de su inclusión mediante una batería de concentración creciente de sacarosa. Tras este procedimiento, los ojos fueron embebidos en un medio adecuado para la congelación (Tissue-Tek® O.C.T.™, Sakura). Se mantuvieron en este medio durante 12 horas a 4°C y posteriormente, se procedió a la ultracongelación de las muestras en una mezcla de isopentano y hielo seco. Los ojos crioprotectados fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **4.2. Inmunotinción en retinas enteras**

Para el estudio de las retinas enteras, la unión antígeno-anticuerpo fue puesta de manifiesto mediante inmunofluorescencia, tal y como se detalla a continuación:

Previamente al marcaje inmunocitoquímico, las retinas se lavaron en PBS-T al 1% durante 30 minutos para eliminar los restos de Tissue-Tek. A continuación, se procedió a la extracción de la retina de la copa óptica y a la eliminación del cuerpo vítreo. Siguiendo el método del Dr. Cuenca (Universidad de Alicante), con el fin de facilitar el inmunomarcaje en



retinas enteras, las muestras fueron tratadas con iodato sódico (Panreac) al 2,28% en PBS (3 minutos a temperatura ambiente) y con sodio borohidruro (Panreac) al 0.02% en PBS (3 minutos a temperatura ambiente). Tras esto, se dieron cuatro nuevos lavados de 10 minutos en PBS-T 1% y a continuación, las retinas fueron incubadas con suero normal diluido al 30% en PBS durante 1 hora. Inmediatamente después, se eliminó el exceso de suero y se incubaron las retinas con el anticuerpo primario diluido en PBS-T 1% durante 72 horas a 4°C.

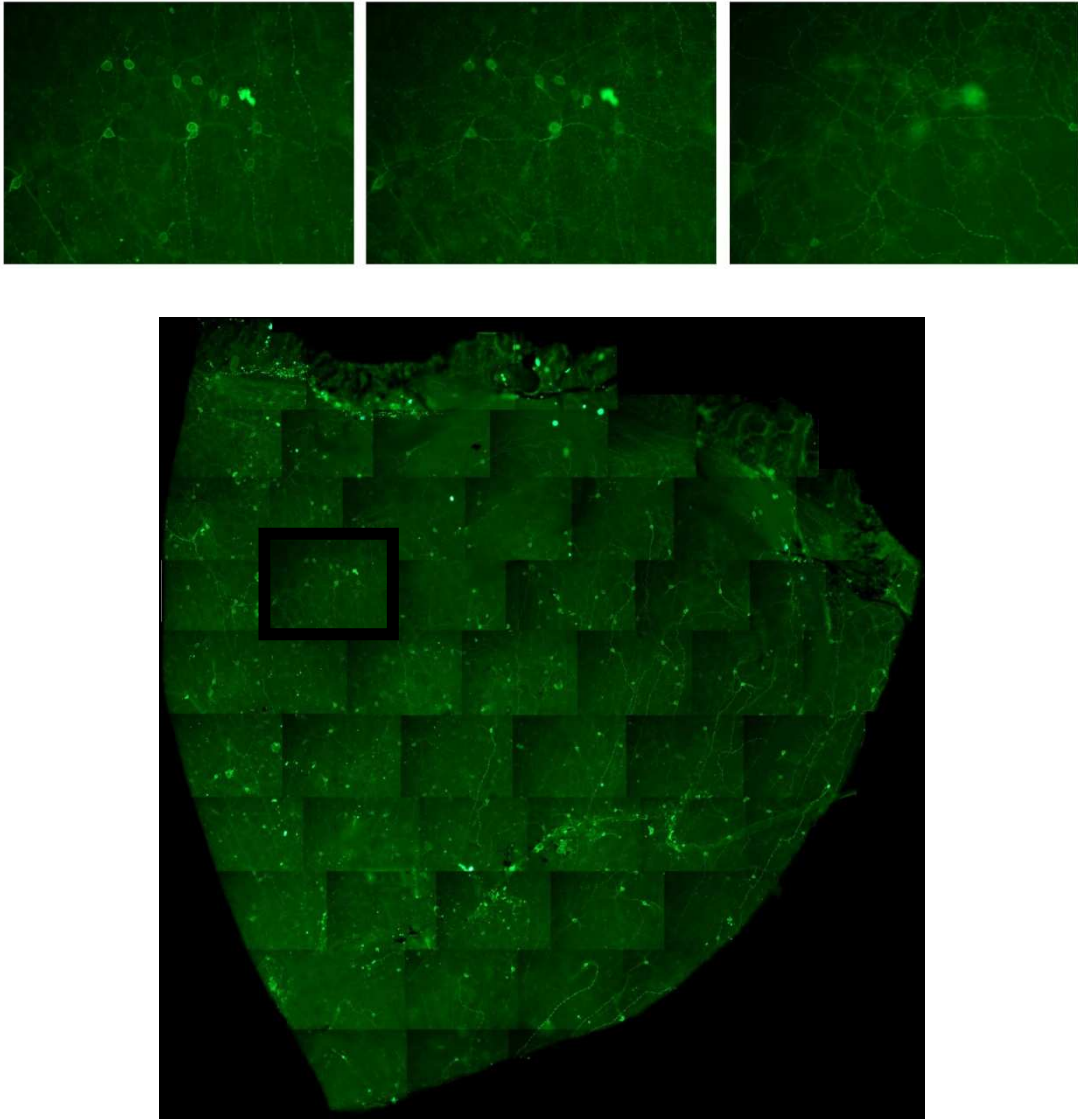
Tras la incubación con el anticuerpo primario, las retinas fueron lavadas cuatro veces en PBS-T 1% en agitación y posteriormente, incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario unido a un fluorocromo. Finalmente, se procedió a una serie de lavados con PBS en agitación, y posterior montaje de las retinas en un medio hidrofílico (Vectashield, Vector Labs.).

Los dobles marcajes se realizaron siguiendo el mismo protocolo, mediante una mezcla de los anticuerpos primarios y secundarios respectivamente, manteniendo las diluciones óptimas de trabajo para cada anticuerpo.

#### **4 . 3 . Análisis de las muestras**

Las imágenes de las retinas enteras fueron obtenidas en un Microscopio Confocal Leica TCS-SP2-AOBS. Para el estudio de las retinas enteras se procedió al fotografiado de la superficie completa de la retina con objetivos de aceite 40X. Para abarcar la totalidad de las células estudiadas se realizaron proyecciones Z en cada área fotografiada.

Tras el fotografiado de las retinas se procedió al montaje de las imágenes mediante el uso del programa Adobe Photoshop CS2: primero en la proyección el plano Z, con el fin de observar todas las células de un área retiniana determinada en una sola imagen y a continuación, se realizó el ensamblaje de las fotografías en las proyecciones X e Y (Figura 21).



**Figura 21.** Imágenes representativas del montaje de retinas enteras tras el fotografiado de la retina completa en proyecciones X e Y. Además, cada área fue fotografiada en la proyección Z para abarcar la totalidad de las células inmunopositivas. Esta imagen se corresponde a una retina C3H +/- inmunomarcada con el anticuerpo primario policlonal UF006 y el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488.

## 5. Anticuerpos utilizados

### 5.1. *Anticuerpos primarios*

- Antisero policlonal de conejo UF-006 generado contra el péptido N-terminal (MDSPSGPRVLSSLTQ) de la melanopsina del ratón (Provencio y cols., 1998), cedido por el Doctor Ignacio Provencio, Departamento de Biología, Universidad de Virginia, (EEUU), a una dilución 1:5000 en PBS-T 1%.

- Antisuero monoclonal de ratón anti-Brn3a (MAB1585, Chemicon) generado contra el marcador de células ganglionares tardías Brn3a a una dilución 1:50 en PBS-T 1%.
- Antisuero monoclonal de ratón anti-Sinaptofisina (MAB5258, Chemicon) generado contra la sinaptofisina presente en la vesículas presinápticas, dilución 1:500 en PBS-T 1%.

## **5.2. Anticuerpos secundarios**

- Kit ABC anti-conejo siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor.
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-conejo (Invitrogen) a una dilución 1:100 en PBS-T 1%.
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 anti-ratón (Invitrogen) a una dilución 1:100 en PBS-T 1%.
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 anti-conejo (Invitrogen) a una dilución 1:100 en PBS-T 1%.
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-ratón (Invitrogen) a una dilución 1:100 en PBS-T 1%.

## **6. PCR en tiempo real**

### **6.1. Obtención y conservación de las muestras para RT-PCR**

Tras la enucleación posterior al sacrificio de los animales, se procedió a la congelación de las muestras en un medio de lisis (RA1, Macherey-Nagel) y conservación a -80°C hasta su uso. Todos los materiales utilizados para este procedimiento fueron tratados con RNAsa away (Molecular BioProducts) para eliminar todas las RNAsas.

### **6.2. Homogenización del tejido y purificación del RNA total**

El RNA total de las muestras se purificó utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen) según el protocolo detallado a continuación.

A cada muestra se le añadieron 500 µl de Trizol (Invitrogen) y se agitó en vortex durante 20 segundos seguidos de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. A

## *Material y Métodos*

continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo (Sigma) a cada muestra y se procedió a la agitación de las mismas durante 15 segundos e incubación a temperatura ambiente 5 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación de las muestras a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Tras este paso, en cada tubo se aprecian tres fases diferentes:

- Fase inferior: DNA
- Fase intermedia: proteínas
- Fase superior: RNA

De la fase acuosa donde se localiza el RNA de la muestra se tomaron 260  $\mu\text{l}$  para su purificación. Este volumen de RNA total fue transferido a un nuevo tubo y se añadió un volumen de etanol al 70%. A continuación, esta mezcla fue pipeteada y transferida a una columna de purificación. Tras esto, la columna se centrifugó durante 30 segundos a 10000 revoluciones por minuto (rpm). En este momento, el RNA se localiza en la columna, por lo que se desechó el sobrenadante tras la centrifugación. En el siguiente paso, fueron añadidos 350  $\mu\text{l}$  del buffer RW1 (RNAeasy Mini Kit, Quiagen) en la columna, y se procedió de nuevo a centrifugar las muestras durante 30 segundos a 10000 rpm. Posteriormente, se realizó una digestión de las muestras con DNAsa (Quiagen) durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier traza de DNA. Tras esto, se añadieron 350  $\mu\text{l}$  del buffer RW1 y las columnas fueron centrifugadas de nuevo a 10000 rpm a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados de las muestras con el buffer RPE (RNAeasy Mini Kit, Quiagen) con sus respectivas centrifugaciones. Finalmente, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de agua DEPC y se realizó una centrifugación de las columnas durante 2 minutos a temperatura ambiente. El agua rompe las uniones electrostáticas del RNA con la columna, de modo que se obtuvo el RNA en el sobrenadante.

### **6.3. Transcripción reversa**

El cDNA (complementary DNA, DNA complementario) fue sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  del RNA total aislado (previamente cuantificado mediante el uso del Nanodrop) en el procedimiento anterior, al cual se le añadieron qScript cDNA SuperMix (Quanta Bioscience) con un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Esta mezcla de reacción fue incubada a 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos. Tras esto, se obtuvieron 20  $\mu\text{l}$  de cDNA total, al cual se le añadieron 80  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsa y DNAsa. Este cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

#### 6.4. RT-PCR

La RT-PCR fue llevada a cabo en un StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems) y las condiciones de termociclado recomendadas por el proveedor. Las RT-PCR se realizaron por duplicado en un volumen total de 20 µl que contenían 1 µl de cDNA, 10 µl de Sybr Green, 8,5 µl de agua libre de RNAsa y DNAsa y 0,25 µl de cada cebador (dilución 4mM). Las condiciones de ciclado consistieron en un paso de activación inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa. Cada ciclo consta de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 60°C durante un minuto y un paso final de 20 segundos entre 78 y 84°C para prevenir la formación de dímeros. Las curvas de Melting se realizaron usando Dissociation Curves 1.0 (Applied Biosystems). De este modo, se aseguraba que la fluorescencia medida durante la RT-PCR no se debe a los cebadores o los dímeros que estos pueden formar. Las secuencias de los cebadores utilizados para este experimento fueron los siguientes:

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO	TM
Opn4	TCACAGGGATGCTGGGCAATC	TTCTTGTAGAGGCTGCTGGCAAAG	82
Opn4 short	GCTACCGCTCTACCCACC	CTACATCCCGAGATCCAGACT	82
Opn4 long	GCTACCGCTCTACCCACC	CTACAGATGTCTGAGAGTCAC	83
c-fos	ATCGGCAGAAGGGGAAAGTAG	GCAACGCAGACTTCTCATCTTCAAG	78
Per2	GGGGTGAGATTCGTCATTGAACTTG	AGGACATTGGCACACTGGAAAGAG	78
Opsina de bastones	TGTTCTGCTCATCGTGCTGG	GGAAGTTGCTCATCGGCTTGC	83

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para el estudio mediante RT-PCR.

Cada muestra fue también analizada para el cDNA de tres parejas de cebadores control, con el fin de normalizar las cantidades iniciales de RNA y efectuar las cuantificaciones relativas de nuestro gen experimental. Los cebadores control utilizados para la realización de los experimentos fueron los siguientes:

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO	TM
ARP	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	ATCTGCTGCATCTGCTTG	76
β <sub>2</sub> -M	GCTATCCAGAAAACCCCTCAA	CATGTCTCGATCCCAGTAGACGGT	78
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GATGCAGGGATGATGTTT	82

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para normalización de los resultados obtenidos por RT-PCR.

### 6.5. Análisis de los datos obtenidos por RT-PCR

Los datos obtenidos por RT-PCR se procesaron utilizando el método comparativo  $C_T$  (*threshold cycle*),  $\Delta\Delta C_T$ , para la cuantificación relativa de la expresión génica. A partir de la media geométrica de los tres genes control se calculó el factor de normalización. Dicho factor nos permitirá normalizar las cantidades iniciales de RNA y efectuar las cuantificaciones relativas de nuestro gen experimental. Además de la normalización de cada muestra, fue necesaria también una transformación logarítmica de los datos para proceder al análisis estadístico de los mismos.

## 7. Análisis estadístico

El programa utilizado para el análisis estadístico de los datos fue el SPSS 15. El primer paso de análisis fue comprobar si los datos cumplían los supuestos paramétricos: la normalidad se comprobó utilizando el test Kolmogorov-Smirnov, la homogeneidad de varianzas con el test de Levene y la presencia de datos marginales (*out-liers*) fue comprobada con el test de cajas. Una vez comprobada la parametricidad de los datos se procedió al análisis estadístico.

- Test ANOVA Factorial: Este test estadístico fue realizado con el fin de determinar si existe interacción entre las variables estudiadas.
- Test ANOVA de una vía: la utilización de este test nos permite observar si existen diferencias significativas entre grupos experimentales para una única variable. En caso de detectar diferencias estadísticas, se realizaron los test post-hoc correspondientes para concretar entre que grupos existían diferencias.
- Test t de Student: este análisis fue realizado cuando los grupos a comparar eran solamente dos.

El número de células que expresan melanopsina y la expresión relativa del mRNA fue presentado como media  $\pm$  error estándar medio.  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# ***Resultados***

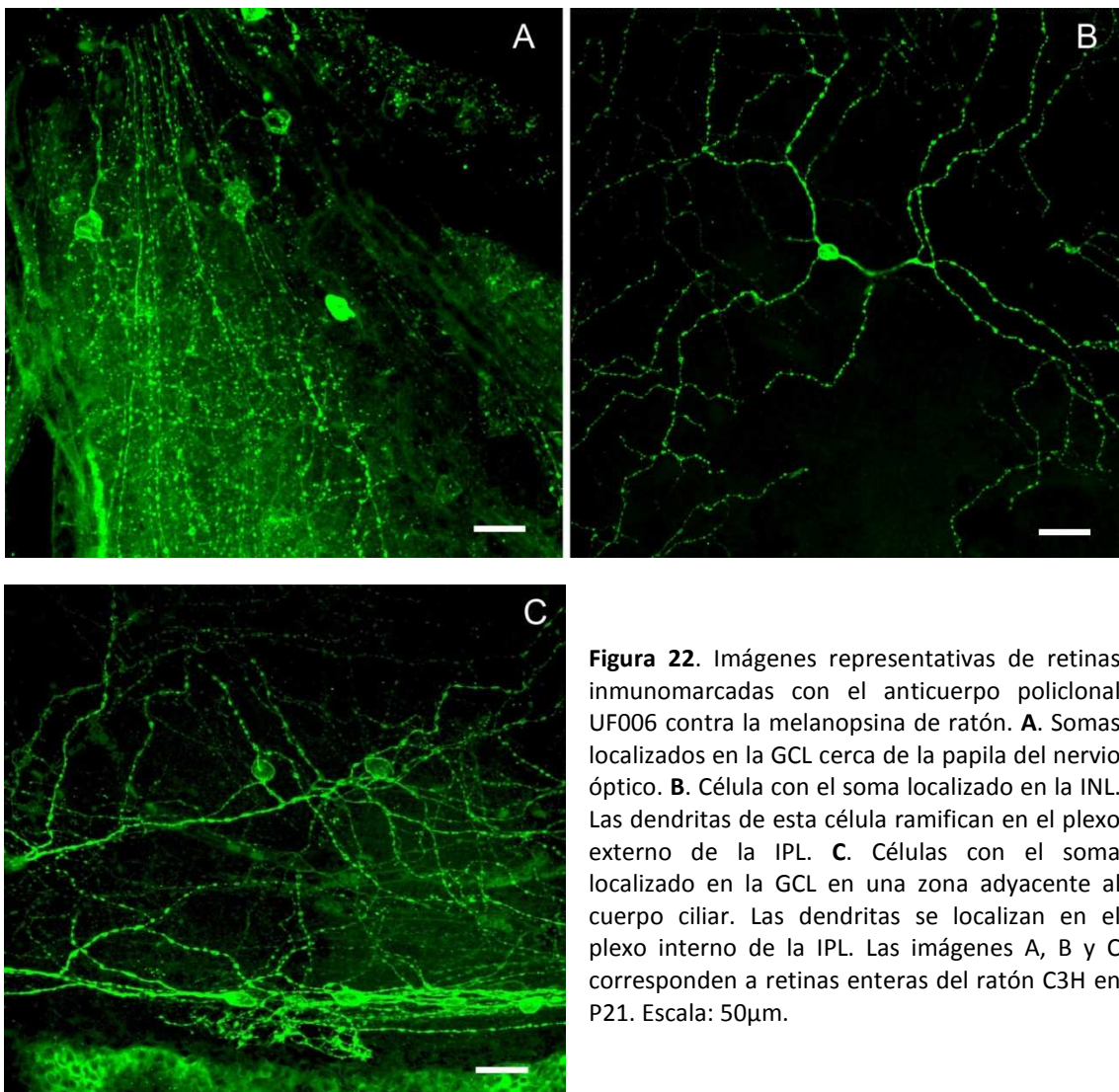




## 1. Desarrollo postnatal de las células ganglionares fotosensibles (melanopsínicas) de la retina de ratón

### 1.1. Localización y clasificación de las células melanopsínicas en la retina de ratón

Mediante el uso del anticuerpo policlonal anti-melanopsina UF006 en nuestras muestras se observa inmunoreactividad en somas, dendritas y segmentos axonales proximales de las células melanopsínicas. Se detectan células inmunopositivas por toda la retina, tanto en el área central (Figura 22A) como en periferia (Figuras 22B, C). El soma de estas células fotosensibles se localiza en la GCL (Figuras 22A, C) o en el borde interno INL (Figura 22B).

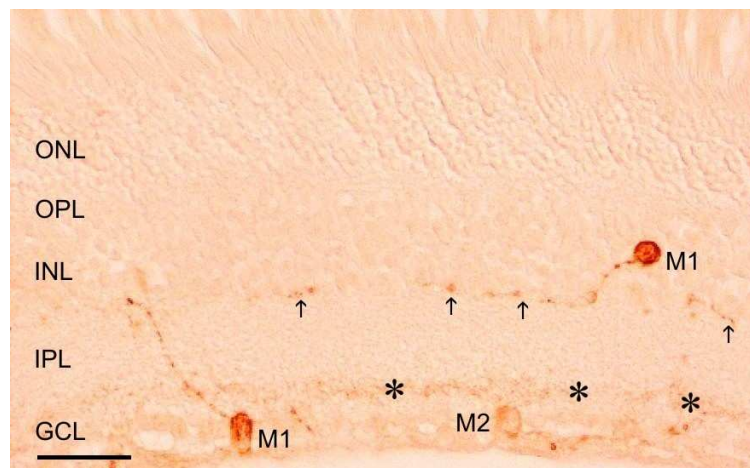


**Figura 22.** Imágenes representativas de retinas inmunomarcadas con el anticuerpo policlonal UF006 contra la melanopsina de ratón. **A.** Somas localizados en la GCL cerca de la papila del nervio óptico. **B.** Célula con el soma localizado en la INL. Las dendritas de esta célula ramifican en el plexo externo de la IPL. **C.** Células con el soma localizado en la GCL en una zona adyacente al cuerpo ciliar. Las dendritas se localizan en el plexo interno de la IPL. Las imágenes A, B y C corresponden a retinas enteras del ratón C3H en P21. Escala: 50 $\mu$ m.

## Resultados

Las dendritas de las células melanopsínicas forman dos plexos en la IPL:

- **Plexo interno:** localizado en la zona más interna de la IPL (sublámina ON), constituido por ramificaciones dendríticas más numerosas y finas que las del plexo externo (Figura 23A).
- **Plexo externo:** localizado en la parte más externa de la IPL (sublámina OFF), con procesos dendríticos gruesos y muy arrosariados (Figura 23B).



**Figura 23.** Imagen representativa de una retina inmunomarcada con el anticuerpo UF006 (anti-melanopsina). Se pueden observar dos plexos en la IPL, uno en la capa más interna (sublámina ON) (asteriscos) y otro en la capa más externa (sublámina OFF) (flechas). Se pueden ver tres células inmunopositivas: dos células M1 (con su arborización dendrítica en la sublámina OFF) y una célula M2 (con las dendritas en la sublámina ON). GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu$ m.

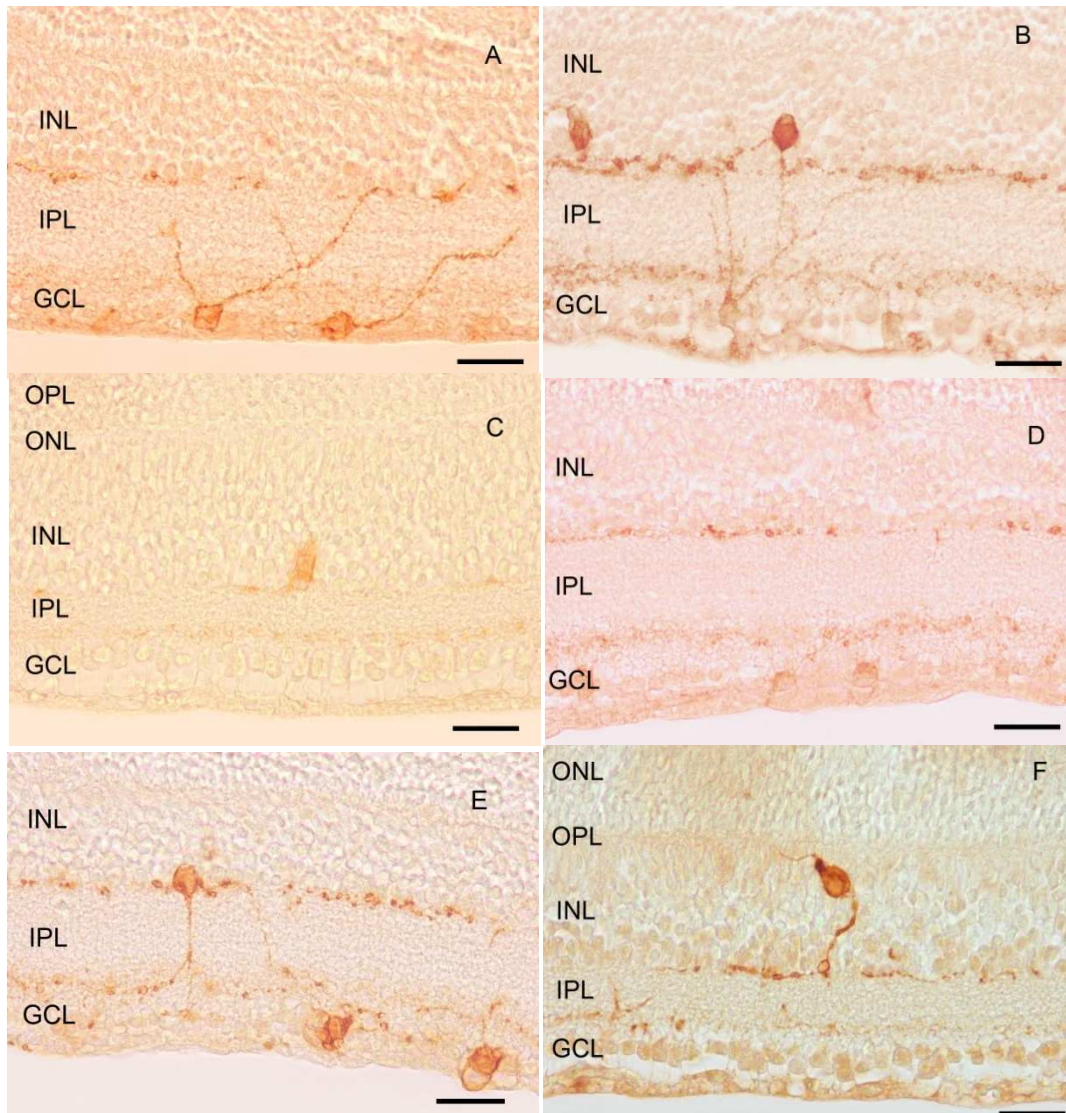
En función de la localización del soma y el plexo en el que terminaban sus dendritas, hemos clasificado las células melanopsínicas en los siguientes subtipos:

- **Células M1:** Este subtipo celular posee las ramificaciones dendríticas en el plexo externo de la IPL (sublámina OFF). Según la localización del soma se pueden diferenciar dos subtipos: **Células M1A:** soma localizado en la GCL (Figura 24A); **Células M1B:** soma localizado en el borde interno de la INL (Figura 24B, C). Las células M1A tienen ramificaciones gruesas y de gran longitud. Suelen ser células intensamente marcadas (oscuras), pero en menor proporción también se observan células claras con las mismas características morfológicas. Por el contrario, las ramificaciones de las células M1B son

más finas y en este subtipo celular la proporción de células intensa y débilmente teñidas es similar.

- **Células M2:** Soma localizado en la GCL (Figura 24D). Las dendritas, finas y cortas, se localizan en la subcapa más interna (adyacente a la ganglionar) de la IPL. Este subtipo celular se caracteriza por la baja intensidad de marcaje de las células inmunopositivas.

Durante el desarrollo de este estudio hemos detectado también algunas células melanopsínicas que tienen su soma en la subcapa de las células amacrinas (borde interno de la INL), al igual que las células M1B, pero sus dendritas ramifican en el plexo interno de la IPL (Figura 24E). Además, durante el desarrollo postnatal temprano es frecuente observar células inmunopositivas que presentan soma y dendritas ramificando en la INL (Figura 24F). A lo largo del desarrollo se produce una disminución de este tipo celular, siendo prácticamente indetectable al final del periodo postnatal. Estos tipos celulares no fueron tenidos en cuenta dada su escasa presencia.

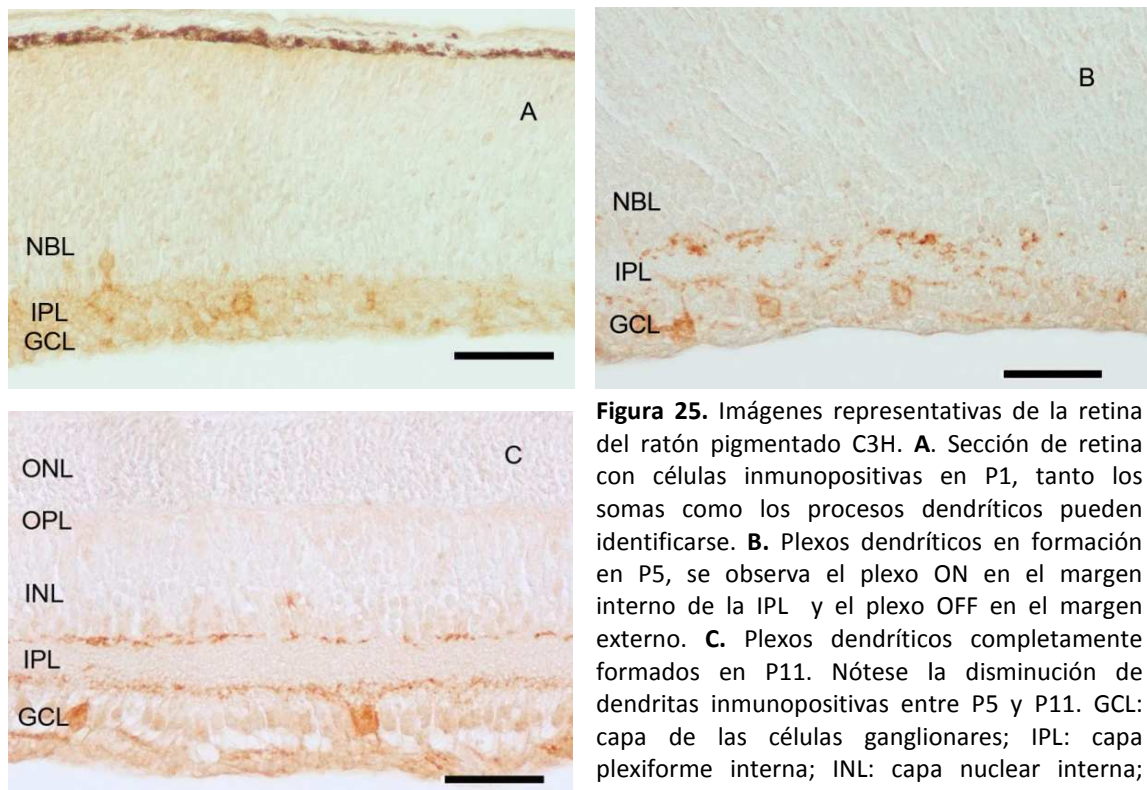


**Figura 24.** Imágenes representativas de células melanopsínicas en retinas adultas. **A.** Las células M1A poseen sus somas en la GCL y las dendritas en la sublámina OFF de la IPL. Los somas de las células M1B están en el borde interno de la INL y sus dendritas ramifican en la sublámina OFF. Se pueden observar células M1B intensamente (**B**) o débilmente teñidas (**C**). **D.** Los somas de las células M2 se localizan en la GCL y sus procesos dendríticos ramifican en la sublámina ON. **E.** Imagen representativa de una célula melanopsínica con soma en la INL y dendritas que ramifican en la sublámina ON. **F.** Célula melanopsínica con soma y dendritas en la INL. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### 1.2. Estudio de las células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado

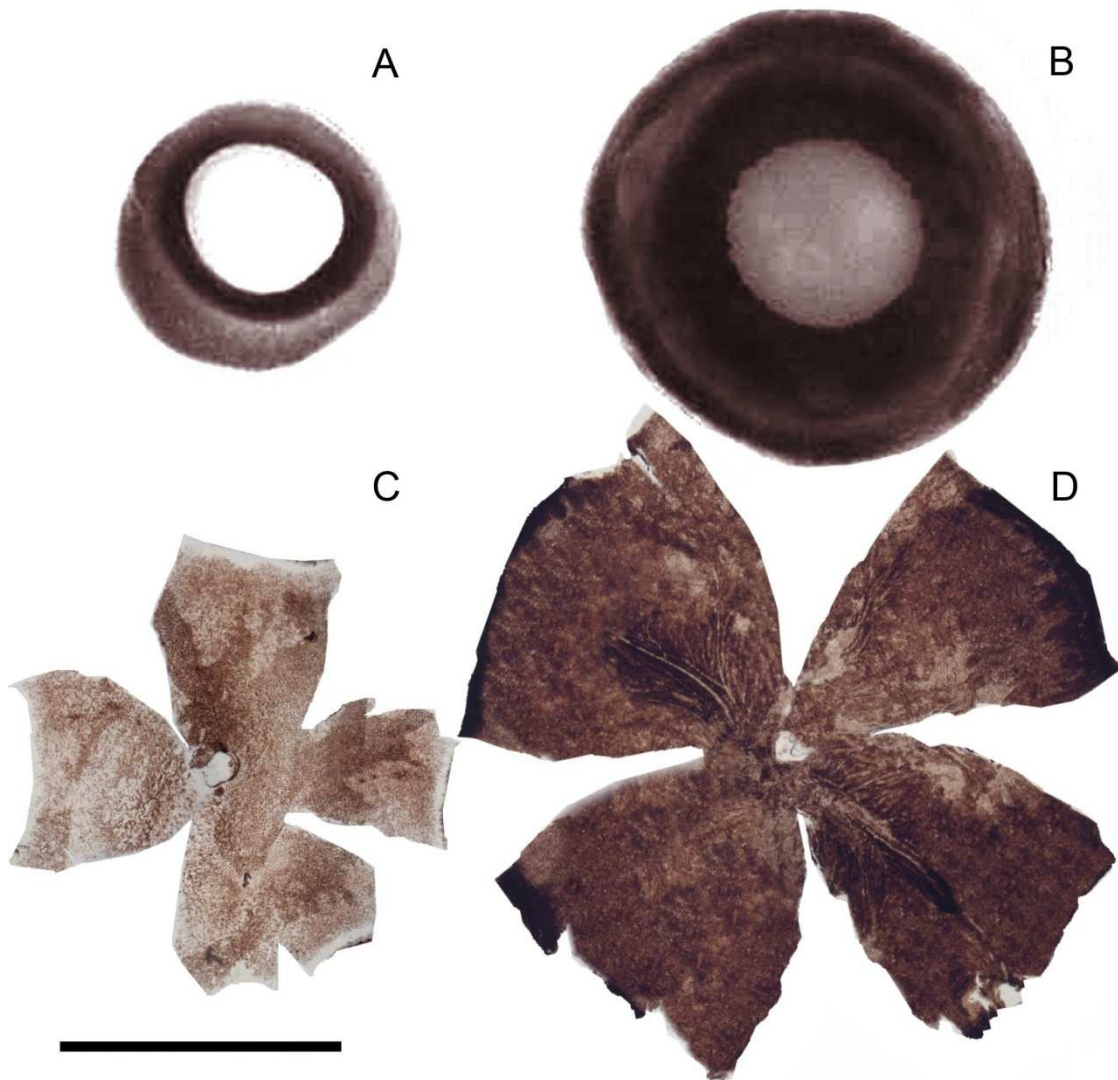
Desde el nacimiento se detectan procesos dendríticos de las células melanopsínicas (Figura 25A). Durante los primeros días postnatales se produce un aumento de dendritas inmunopositivas en la retina y en P5 comienza la estratificación de estas en dos plexos en la IPL (Figura 25B). A continuación, parece producirse un refinamiento de las dendritas observándose

un menor número de estas en P11, donde ya se disciernen claramente dos plexos dendríticos bien formados (Figura 25C).



**Figura 25.** Imágenes representativas de la retina del ratón pigmentado C3H. **A.** Sección de retina con células inmunopositivas en P1, tanto los somas como los procesos dendríticos pueden identificarse. **B.** Plexos dendríticos en formación en P5, se observa el plexo ON en el margen interno de la IPL y el plexo OFF en el margen externo. **C.** Plexos dendríticos completamente formados en P11. Nótese la disminución de dendritas inmunopositivas entre P5 y P11. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50  $\mu$ m.

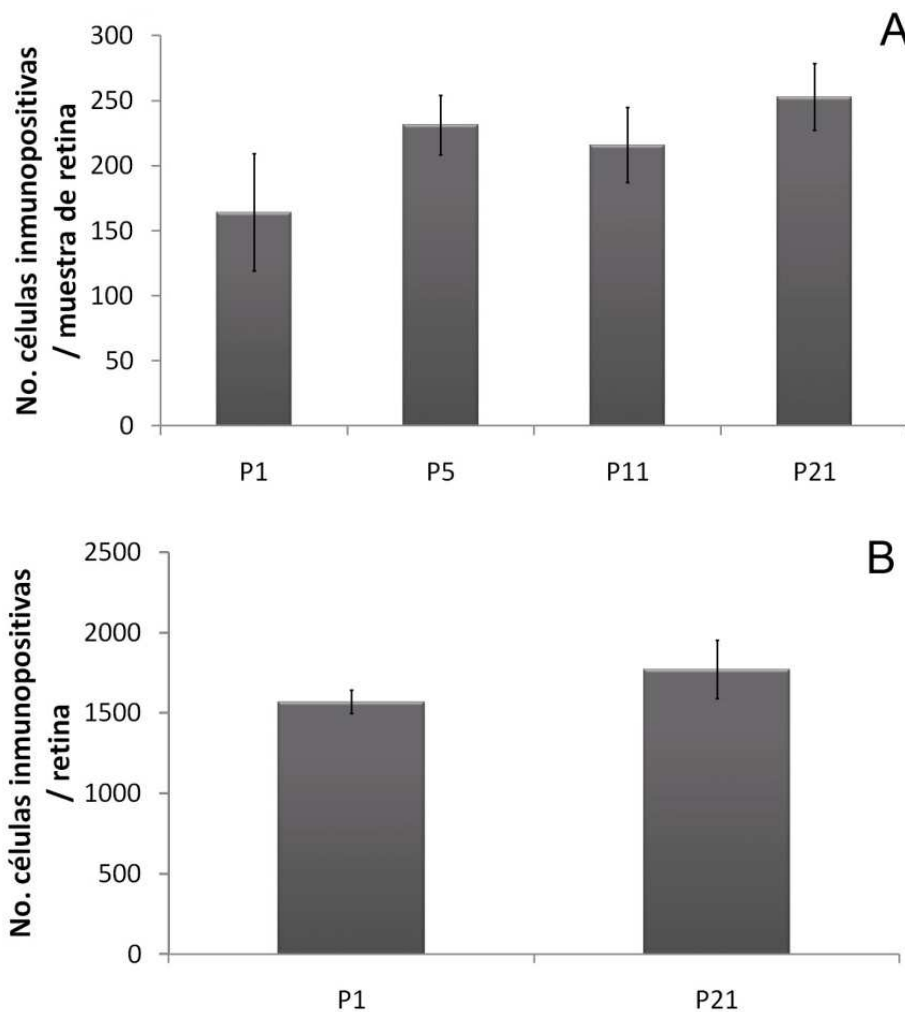
El diámetro del globo ocular del ratón C3H +/+ muestra un crecimiento significativo desde P1 ( $2 \pm 0,04$  mm) hasta P21 ( $3,025 \pm 0,05$  mm) (test t de Student,  $p < 0,001$ ) (Figura 26A, B). Como cabe esperar, el área de la retina también muestra un crecimiento significativo entre P1 ( $5,25 \pm 0,30$  mm<sup>2</sup>) y P21 ( $14,03 \pm 0,39$  mm<sup>2</sup>) (test t de Student,  $p < 0,001$ ) (Figura 26C, D), lo que indica un crecimiento de 2,7 veces durante el desarrollo postnatal.



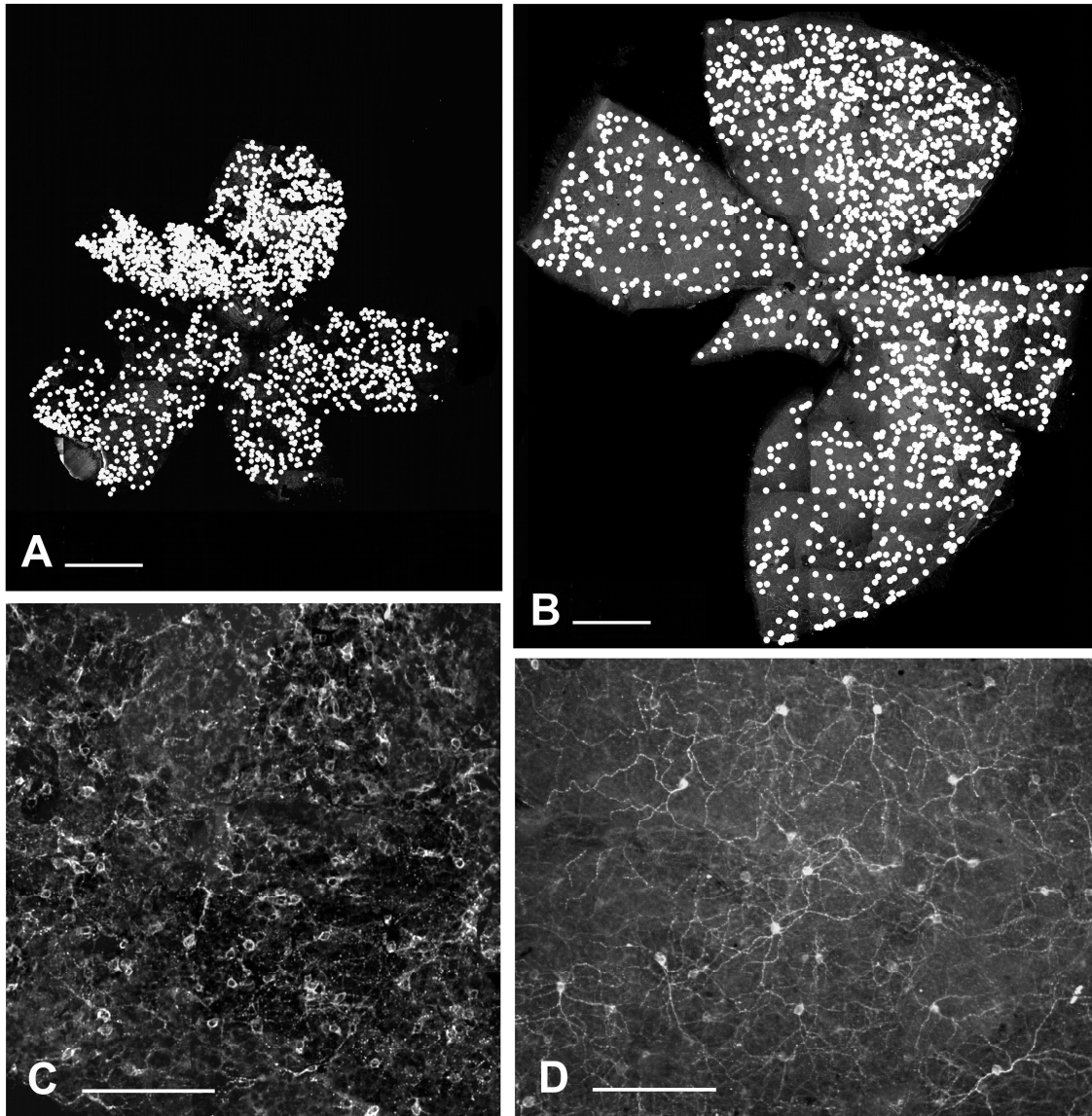
**Figura 26.** Imágenes representativas del globo ocular y de retinas enteras de ratones C3H<sup>+/+</sup> (aplanadas sobre los portaobjetos) correspondientes a P1 (A, C) y a P21 (B, D). Nótese el incremento tanto en el diámetro del ojo como en el área de la retina. Escala: 2 mm.

El número total de células inmunopositivas en la retina no varía significativamente durante el desarrollo postnatal en el ratón C3H<sup>+/+</sup>. En secciones de retina el número de células inmunopositivas varía entre 160 y 250 células por muestra de retina analizada (P1, P5, P11 y P21) (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 27A). En retinas enteras el número de células melanopsínicas oscila entre 1600 y 1800 células por retina (P1 y P21) (t de Student,  $p > 0,05$ ) (Figura 27B). Mediante ambos experimentos hemos observado que no existe una disminución del número de células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal. Sin embargo, dado que el área de la retina aumenta tres veces durante este periodo (Figura 28A, B), se produce una disminución de aproximadamente tres veces en la densidad de las células melanopsínicas

durante el mismo periodo en el ratón pigmentado (Figura 28C, D) (P1: 299,05 células/mm<sup>2</sup>; P21: 126,3 células/mm<sup>2</sup>) (t de Student,  $p < 0,001$ ).



**Figura 27.** Desarrollo postnatal del sistema melanopsínico en la retina pigmentada. **A.** Número de células inmunopositivas por muestra de retina (1 de cada 6 series paralelas) en cuatro edades durante el desarrollo postnatal. No se detectaron diferencias significativas (ANOVA,  $p > 0,05$ ). **B.** Número total de células melanopsínicas por retina en P1 y P21. No se observaron diferencias significativas entre ambas edades (t de Student,  $p > 0,05$ ).

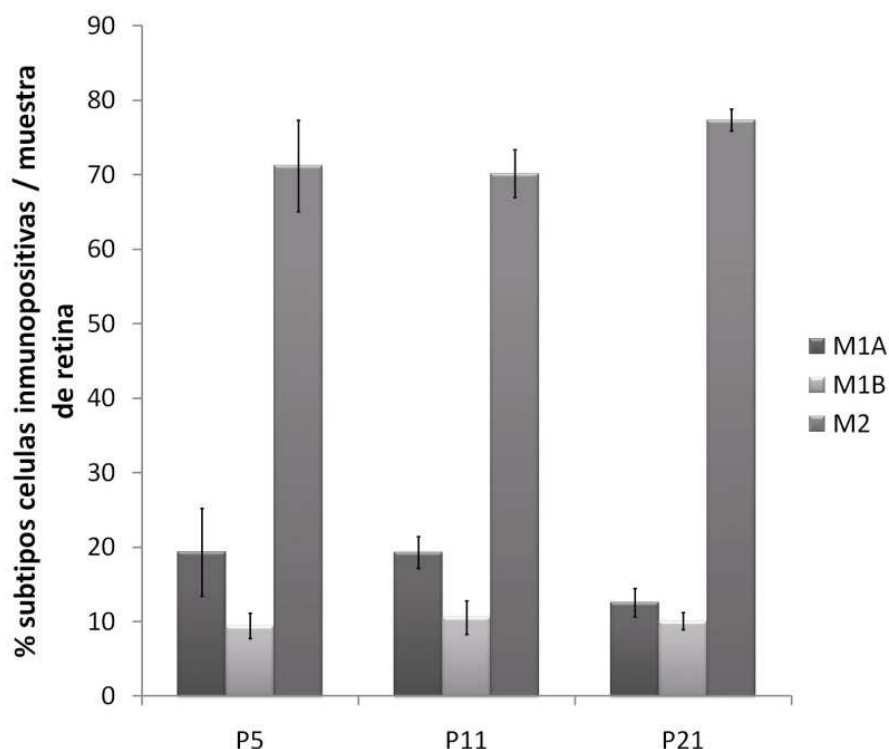


**Figura 28.** Imágenes representativas de retinas enteras del ratón C3H+/+ en P1 (A) y P21 (B). Cada punto representa una célula melanopsínica. Nótese la diferencia de área entre ambas retinas. Densidad celular en imágenes representativas de retinas enteras en P1 (C) y P21 (D). La densidad en P21 es significativamente menor que la observada en P1 (t de Student,  $p < 0,001$ ). Escala: A y B, 750  $\mu\text{m}$ ; C y D, 150  $\mu\text{m}$ .

En las mismas secciones de retina en las que se analizó el número total de células melanopsínicas también se estudió el desarrollo postnatal de los distintos subtipos celulares inmunopositivos. Las células M1 son aproximadamente el 22% del total de las células melanopsínicas y no se observaron cambios en su cantidad durante el desarrollo (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 29). La proporción de células M1A y M1B es similar en todos los puntos analizados (t de Student,  $p > 0,05$ ). Las células M2, las cuales poseen sus procesos dendríticos en el margen interno de la IPL, son aproximadamente un 75% del total de células



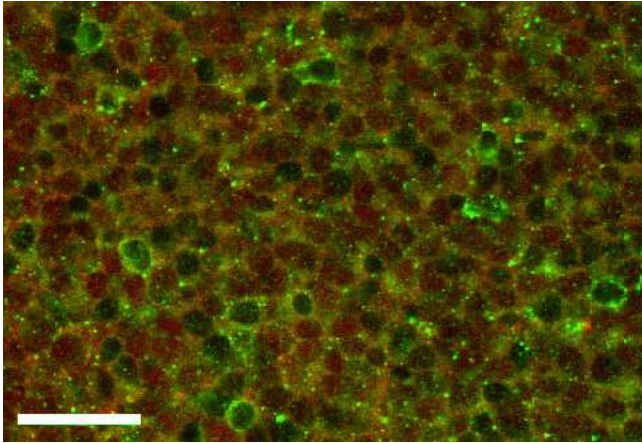
inmunopositivas. El porcentaje de este tipo celular tampoco muestra variaciones significativas durante el desarrollo postnatal (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Desarrollo postnatal de las células M1 y M2 en la retina pigmentada. Porcentaje de células M1A, M1B y M2 por sección de retina en P5, P11 y P21. Ninguno de los subtipos celulares muestra cambios significativos en su porcentaje durante el periodo postnatal (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

### 1.3. Desarrollo prenatal del sistema melanopsínico

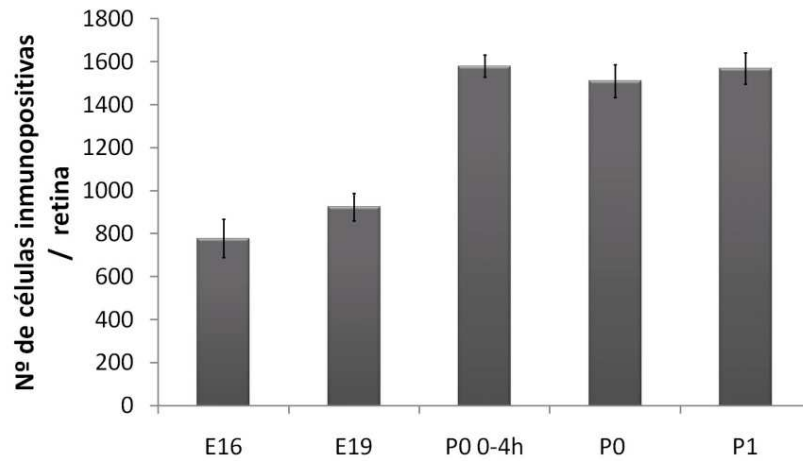
Dados los resultados obtenidos en el apartado anterior, donde hemos demostrado que no existe una disminución del número de células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado durante el desarrollo postnatal, se procedió al análisis del desarrollo prenatal de este sistema no formador de imágenes. En las retinas fetales se observa inmunomarcaje desde E15 (Figura 30). A esta edad, los somas de las células melanopsínicas están débilmente teñidos y se observan por toda la retina, tanto en periferia como en el área central. Mediante doble inmunofluorescencia, no se detecta colocalización del marcador nuclear de células ganglionares tardías, Brn3a, con los somas inmunopositivos para la melanopsina (Figura 30).



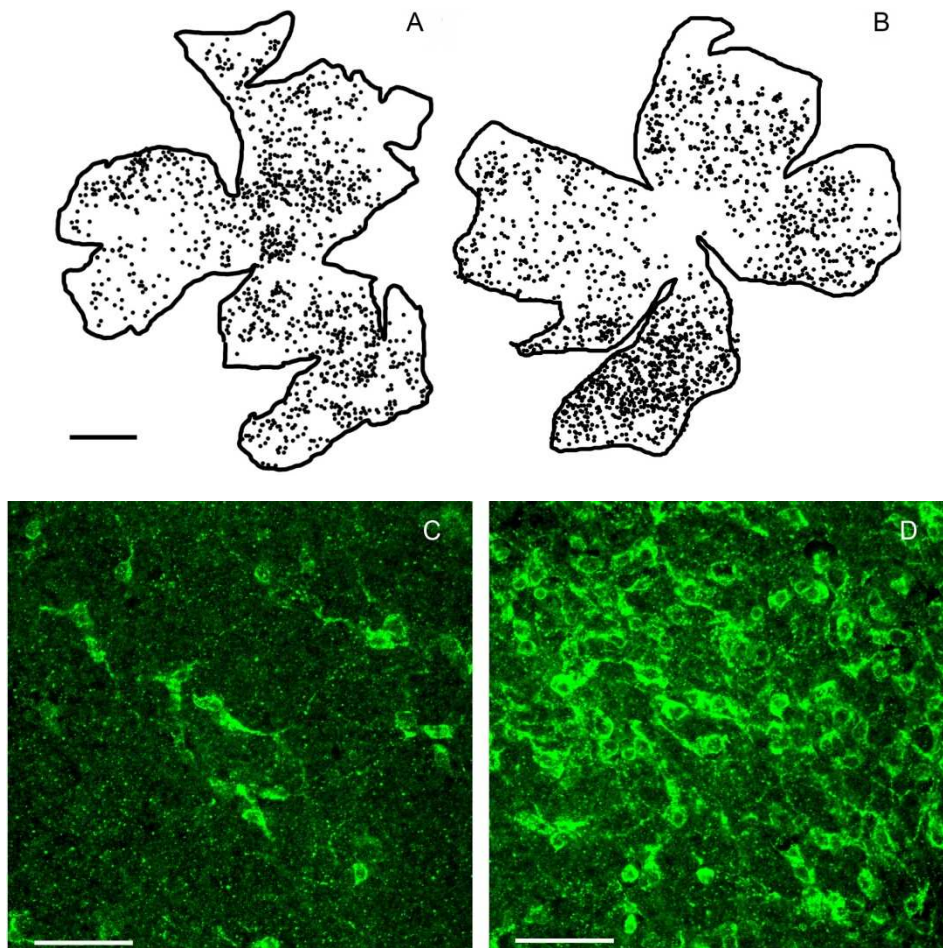
**Figura 30.** Imagen representativa de E15 en la retina periférica del ratón C3H. La fluorescencia emitida en rojo (Alexa 546) representa la presencia de Brn3a. La melanopsina se observa en color verde (Alexa 488). Los somas de las células melanopsínicas (verde) son claramente visibles en la GCL; sin embargo, tan solo se pueden distinguir las dendritas primarias más cercanas al soma. Nótese que ninguna célula melanopsínica muestra colocalización con el marcador nuclear Brn3a de células ganglionares tardías. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Entre E16 y E19 se produce un crecimiento significativo del área de la retina (E16:  $3,36 \pm 0,33 \text{ mm}^2$ ; E19:  $5,13 \pm 0,25 \text{ mm}^2$ , ANOVA,  $p < 0,01$ ); sin embargo, entre E19 y P0 no se aprecian diferencias significativas respecto al área de la retina (P0:  $5,38 \pm 0,58 \text{ mm}^2$ ). El número total de células melanopsínicas en retinas enteras no cambia significativamente entre E16 y E19 (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 31). Sin embargo, desde E19 hasta P0 se produce un incremento significativo del número de células que expresan la melanopsina (E19:  $924 \pm 63$  células/retina; P0:  $1580 \pm 51$  células/retina) (ANOVA,  $p < 0,01$ ) (Figura 31), así como un aumento de las dendritas inmunomarcadas. Como consecuencia de este incremento en el número de células, se detecta también una mayor densidad celular en P0 (E19:  $180,68$  células/ $\text{mm}^2$ ; P0:  $294,51$  células/ $\text{mm}^2$ ) (ANOVA,  $p < 0,01$ ) (Figura 32).

Dado que no conocemos el momento exacto del nacimiento de los animales en P0, el incremento detectado podría deberse al efecto de las condiciones ambientales externas. Para estudiar esta posibilidad, se sacrificaron ratones recién nacidos (entre 0 y 4 horas después del parto). En este grupo el nacimiento tuvo lugar en el ciclo de oscuridad y en las retinas ya se observa el mismo número de células melanopsínicas que en P0 (Figura 31), por lo que queda claro que el incremento detectado es independiente de las condiciones ambientales externas. Estos resultados nos indican que existe un incremento del número de células que expresan la proteína melanopsina durante las últimas horas del desarrollo prenatal.



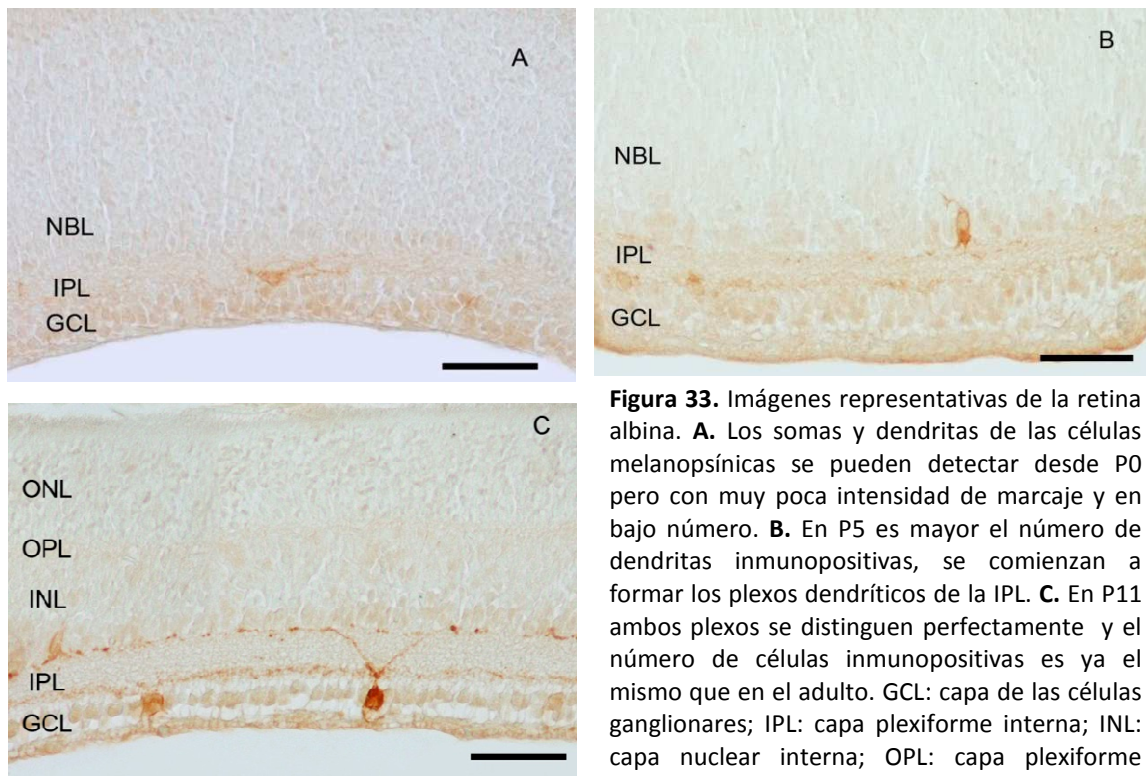
**Figura 31.** Desarrollo prenatal y perinatal del sistema melanopsínico en la retina pigmentada. Se detecta un incremento significativo en el número de células inmunopositivas por retina entre E19 y P0 (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Entre 0 y 4 horas después del parto ya existe el mismo número de células inmunopositivas que en P21.



**Figura 32.** Desarrollo perinatal del sistema melanopsínico del ratón C3H. **A. B.** Imágenes representativas de retinas enteras en E19 (A) y P0 (B). Cada punto representa una célula melanopsínica inmunopositiva. **C. D.** Imágenes representativas de la densidad celular en E19 (C) y P0 (D). En P0 existe una mayor densidad de células melanopsínicas (ANOVA,  $p < 0,01$ ), además de procesos dendríticos más visibles. Escala: A y B, 500  $\mu\text{m}$ ; C y D, 100  $\mu\text{m}$ .

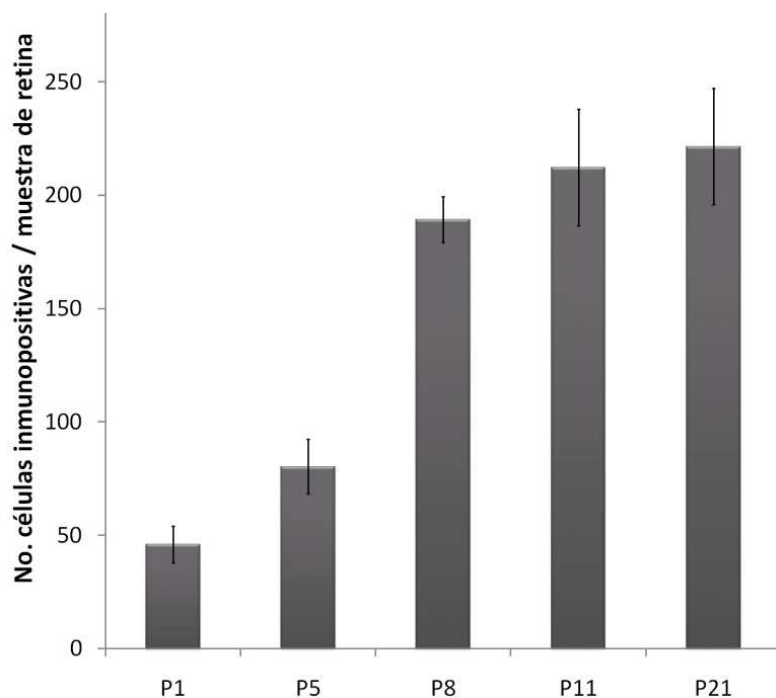
#### 1.4. Desarrollo de las células melanopsínicas en la retina albina

El sistema melanopsínico fue analizado bajo condiciones de LO en la retina albina. A pesar de que la tinción es muy débil, en el día postnatal 1 ya se detectan células melanopsínicas, aunque en un número muy bajo (Figura 33). En esta edad, se observan algunos procesos dendríticos en la IPL. Sin embargo, es a partir de P8 cuando los dos plexos dendríticos son claramente diferenciables.



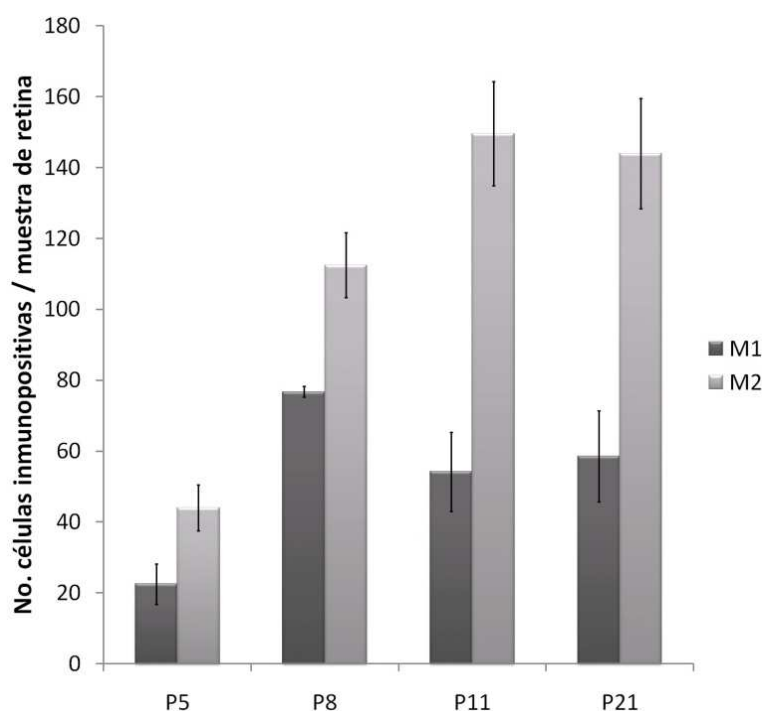
**Figura 33.** Imágenes representativas de la retina albina. **A.** Los somas y dendritas de las células melanopsínicas se pueden detectar desde P0 pero con muy poca intensidad de marcaje y en bajo número. **B.** En P5 es mayor el número de dendritas inmunopositivas, se comienzan a formar los plexos dendríticos de la IPL. **C.** En P11 ambos plexos se distinguen perfectamente y el número de células inmunopositivas es ya el mismo que en el adulto. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50µm.

En los animales albinos CD1 existe una variación significativa en el número de células inmunopositivas durante el desarrollo postnatal. Desde P5 hasta P8 se detecta un aumento del número total de células ganglionares fotosensibles (ANOVA,  $p < 0,001$ ). A partir de P8 se alcanzan los valores detectados en el adulto (200-250 células/ muestra de retina) (Figura 34).



**Figura 34.** Número de células inmunopositivas durante el desarrollo postnatal en la retina albina. Se detecta un incremento significativo en el número de células melanopsínicas durante el periodo postnatal temprano (ANOVA,  $p < 0,001$ ).

Quando las células M1 y M2 son analizadas por separado se observa un incremento significativo para ambos tipos celulares entre P5 y P8 (ANOVA, M1:  $p < 0,05$ ; M2:  $p < 0,001$ ) (Figura 35). Al igual que en los ratones pigmentados, las células M2 son más abundantes (aproximadamente un 70% del total) que las M1 (30%) en todas las edades analizadas (P5:  $p < 0,05$ ; P8:  $p < 0,01$ ; P11:  $0,001$ ; P21:  $p < 0,001$ ).

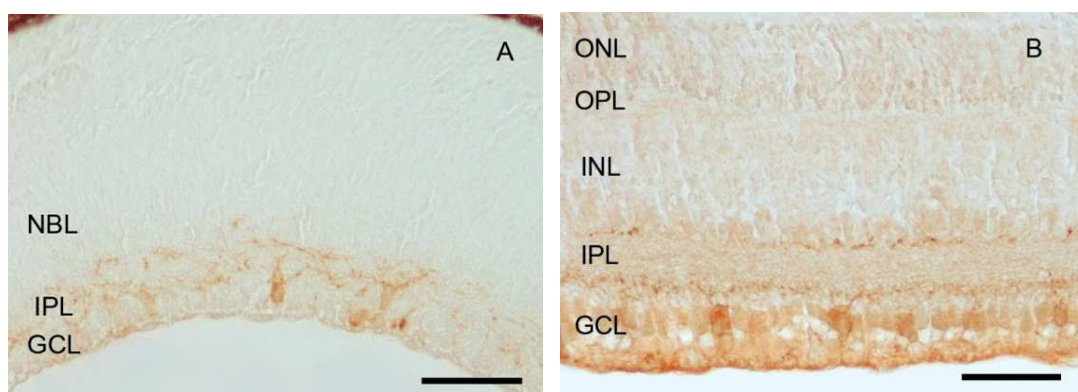


**Figura 35.** Desarrollo postnatal de las células M1 y M2 en la retina albina. Bajo LO ambos tipos celulares se comportan de igual manera (ANOVA factorial,  $p > 0,05$ ), tanto las células M1 como las M2 muestran un incremento significativo entre P5 y P8 (ANOVA, M1:  $p < 0,05$ ; M2:  $p < 0,001$ ).

## 2. Efecto de las condiciones lumínicas sobre las células melanopsínicas

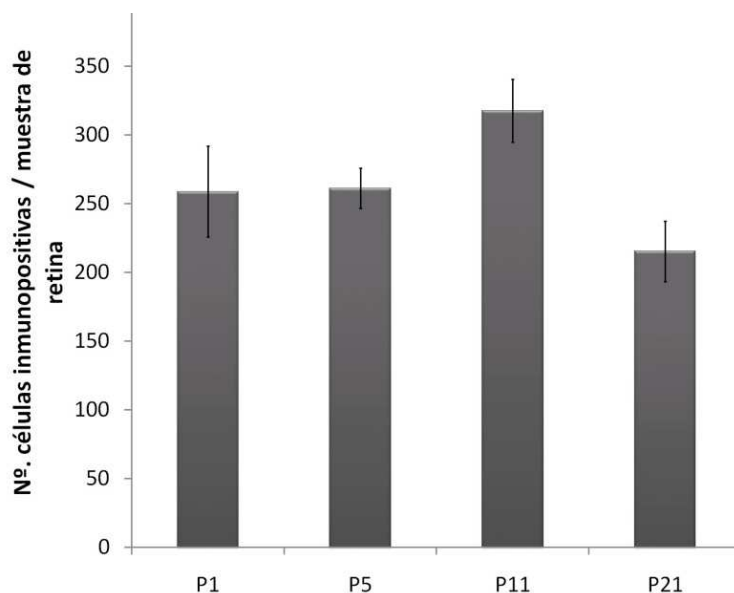
### 2.1. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre el desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina del ratón pigmentado C3H

**2.1.1. Luz continua:** La LL parece provocar un retraso en la organización de los plexos dendríticos de las células melanopsínicas. Los plexos de la capa plexiforme interna no son detectados claramente hasta P11 (Figura 36). Sin embargo, a partir de esta edad no se aprecian diferencias cualitativas respecto al grupo control (sometido a LO desde el nacimiento).



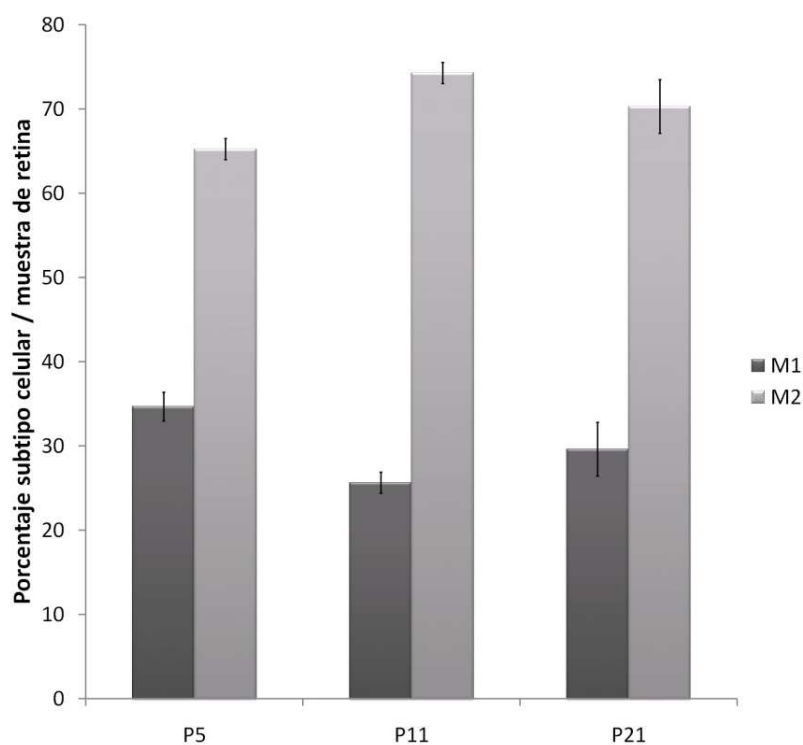
**Figura 36.** Imágenes representativas de secciones de retina del ratón C3H +/+ mantenido bajo LL. **A.** En P5 se observan tanto somas como dendritas inmunopositivas, pero aún no se aprecian los dos plexos característicos de la IPL, estos no se detectan hasta P11 (**B**). GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50 $\mu$ m.

El número de células melanopsina-positivas oscila entre 215 y 250 por muestra de retina. Al igual que en el grupo control (LO), no se observa variación significativa en el número de células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal de la retina (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 37). Ambos grupos (LL y LO) evolucionan de manera paralela (ANOVA factorial,  $p > 0,05$ ), no mostrando diferencias significativas entre ellos en ninguna de las edades (t de Student, P1, P5, P11 y P21:  $p > 0,05$ ).



**Figura 37.** Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas bajo LL en la retina pigmentada. No se observa una variación en el número total de células inmunopositivas bajo estas condiciones lumínicas (ANOVA,  $p>0.05$ ).

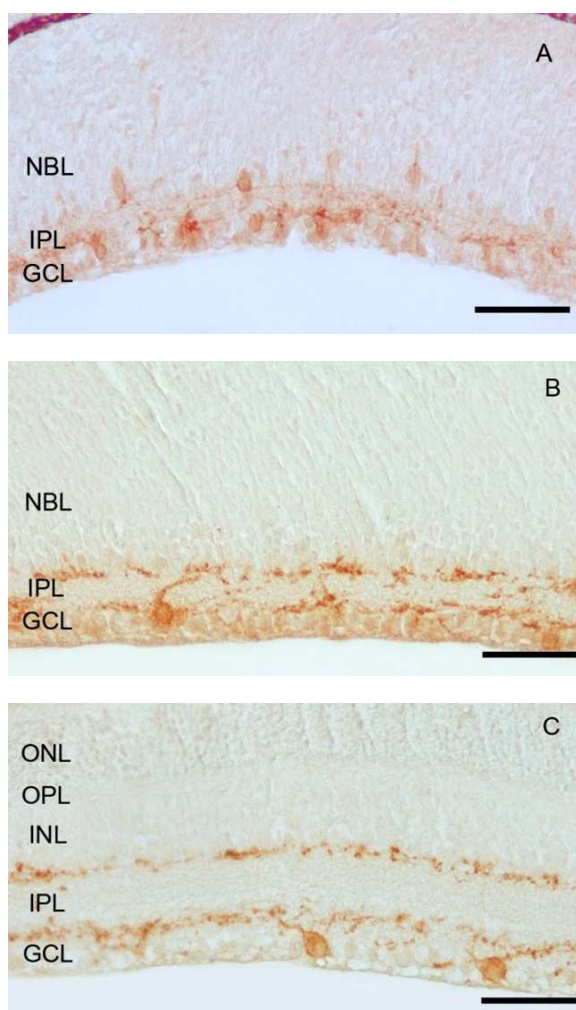
Las células M1 y M2 fueron también analizadas en las retinas de animales mantenidos bajo LL desde el nacimiento (Figura 38). Las células M1 son aproximadamente un 30% del total de células melanopsínicas y no existe variación durante el desarrollo postnatal a partir de P5. En este grupo, las células M2 son aproximadamente un 70% en todas las edades analizadas. Por tanto, la iluminación continua desde el nacimiento no parece afectar al número de células que expresan la proteína melanopsina, aunque sí parece provocar un leve retraso en el establecimiento de los plexos dendríticos de las células ganglionares fotosensibles.



**Figura 38.** Células M1 y M2 bajo LL en la retina pigmentada. Cuando se estudian por separado ambos subtipos celulares tampoco se detectan cambios significativos durante el desarrollo (ANOVA,  $p>0.05$ ).

## Resultados

**2.1.2. Oscuridad continua:** La formación de los plexos en OO ocurre aproximadamente en el mismo momento que en los animales sometidos a LO, en el día postnatal 5 ambos plexos son detectados. Sin embargo, desde P1, en OO se observa mayor cantidad de dendritas inmunoteñidas que en el grupo control (Figura 39). Además, en este grupo la tinción es de mayor intensidad tanto en somas como en dendritas y segmentos proximales de los axones, reflejando así la presencia de una mayor cantidad de melanopsina en estas retinas.

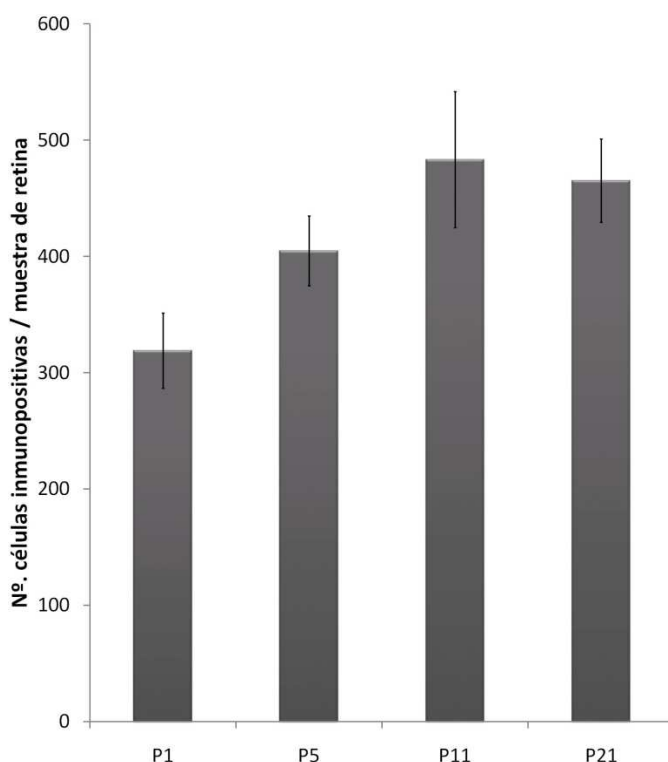


**Figura 39.** Imágenes representativas de secciones de retina del ratón C3H mantenido bajo OO. **A.** En P1 ya se observa una mayor cantidad de inmunomarcaje en comparación con animales de la misma edad expuestos a LO o LL, pero aún no se han formado los dos plexos característicos de la IPL. **B.** En P5 los plexos dendríticos están prácticamente formados. **C.** En P11 se observan claramente los dos plexos dendríticos de la IPL. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa nuclear externa; ONL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50 $\mu$ m.

El número total de células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal bajo OO oscila entre 300 y 450 células por muestra de retina (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 40). Los animales sometidos a estas condiciones muestran un mayor número de células inmunopositivas que el control. Ambos grupos (OO y LO) difieren significativamente en P5, P11 y P21 (ANOVA, P5:  $p < 0,01$ ; P11:  $p < 0,05$ ; P21:  $p < 0,001$ ), encontrándose en todos los casos un mayor número de células positivas en el grupo de OO. Tan sólo existe una edad donde no encontramos

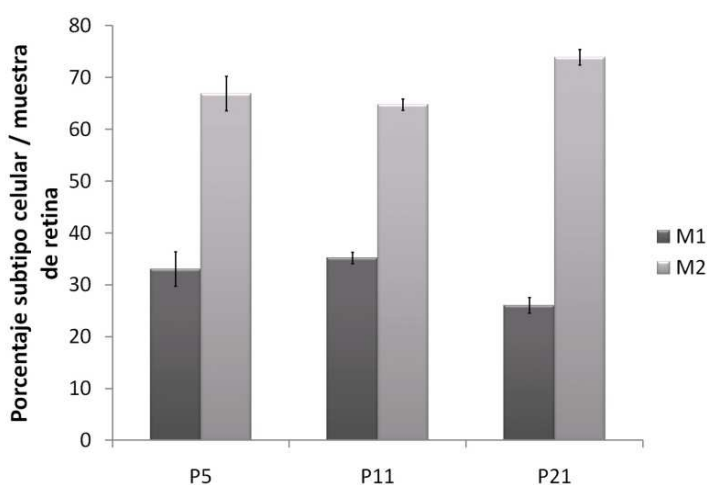


diferencias significativas (P1) en la que los animales C3H/+ muestran valores similares en OO y LO.



**Figura 40.** Efecto de la OO sobre el número de células melanopsínicas en el ratón pigmentado. No se observa una variación significativa del número total de células melanopsina-positivas durante el periodo postnatal (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, es destacable la presencia de un mayor número de células inmunopositivas que en LO.

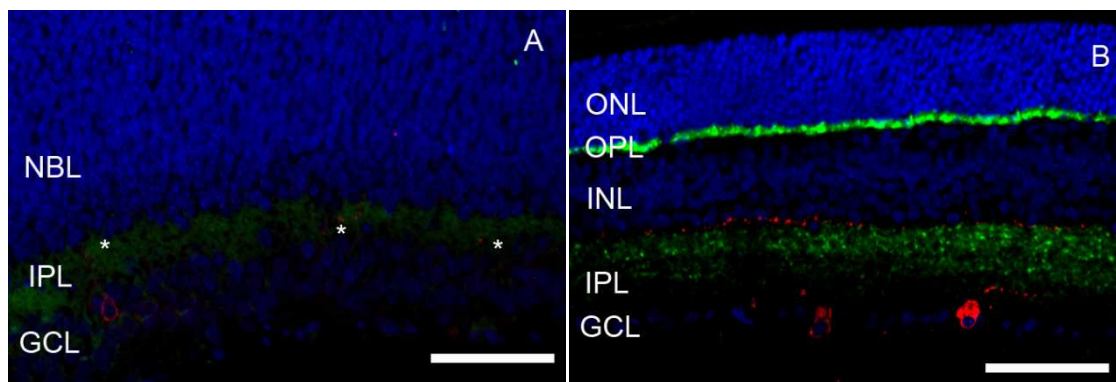
Como hemos mencionado previamente, en los animales pigmentados mantenidos bajo OO se aprecia un mayor número de células melanopsínicas por muestra de retina. Sin embargo, el porcentaje de células M1 y M2 es el mismo que el observado previamente en LO y LL (M1: 30%; M2: 70%) (Figura 41). En este grupo tampoco se observó una variación de los subtipos celulares durante el desarrollo. Por tanto, la OO parece provocar un aumento similar de células M1 y M2 que expresan la proteína melanopsina.



**Figura 41.** Efecto de la OO sobre las células M1 y M2 en el ratón C3H. Bajo estas condiciones se detecta el mismo porcentaje de células M1 (30%) y M2 (70%) que los observados en LO y LL. En este grupo tampoco se detectó una variación de los subtipos celulares durante el desarrollo.

## Resultados

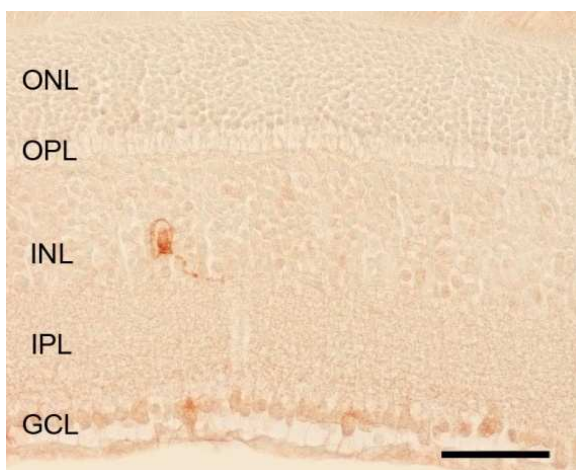
Las respuestas a las condiciones ambientales observadas en estos experimentos en los ratones pigmentados tan solo pueden proceder de la respuesta intrínseca de las células melanopsínicas, ya que los conos y bastones de la retina externa aún no son funcionales en algunas de las edades estudiadas. Y de hecho, las conexiones con la retina externa aún no están establecidas tal y como hemos observado en secciones con doble inmunohistoquímica con el suero anti-sinaptofisina (marca conexiones sinápticas) y el suero anti-melanopsina (Figura 42).



**Figura 42.** Establecimiento de las conexiones sinápticas de la retina externa del ratón C3H+/+. La melanopsina se detecta en rojo (Alexa 546) mientras que la sinaptofisina se observa en color verde (Alexa 488). Los núcleos de todas las células están marcados con DAPI (azul). **A.** P1. Se observa un soma de una célula M1 y algunas ramificaciones dendríticas (asteriscos). Sin embargo, no se detecta marcaje de sinaptofisina. **B.** P11. Se observan claramente los somas y plexos dendríticos de las células melanopsínicas (rojo). En verde se detecta el inmunomarcaje de la sinaptofisina en la IPL y OPL, indicando así que las conexiones sinápticas entre la retina externa e interna están ya establecidas. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; ONL: capa plexiforme externa; OPL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50µm.

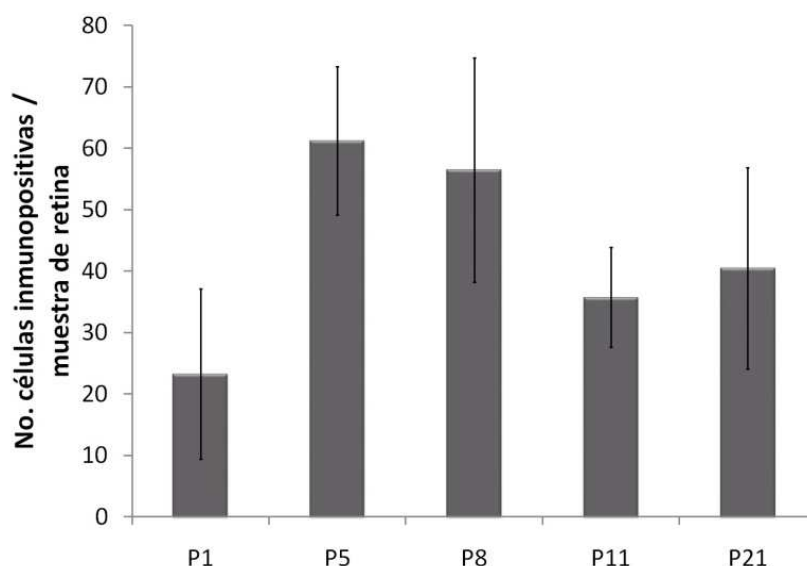
## 2.2. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre la retina albina

**2.2.1. Luz continua:** En la retina albina, bajo estas condiciones ambientales, es característica la baja inmunotinción tanto de somas como de dendritas y segmentos axonales. Se observan ambos plexos en la IPL, pero la red dendrítica está mucho menos desarrollada que la observada bajo LO (Figura 43).

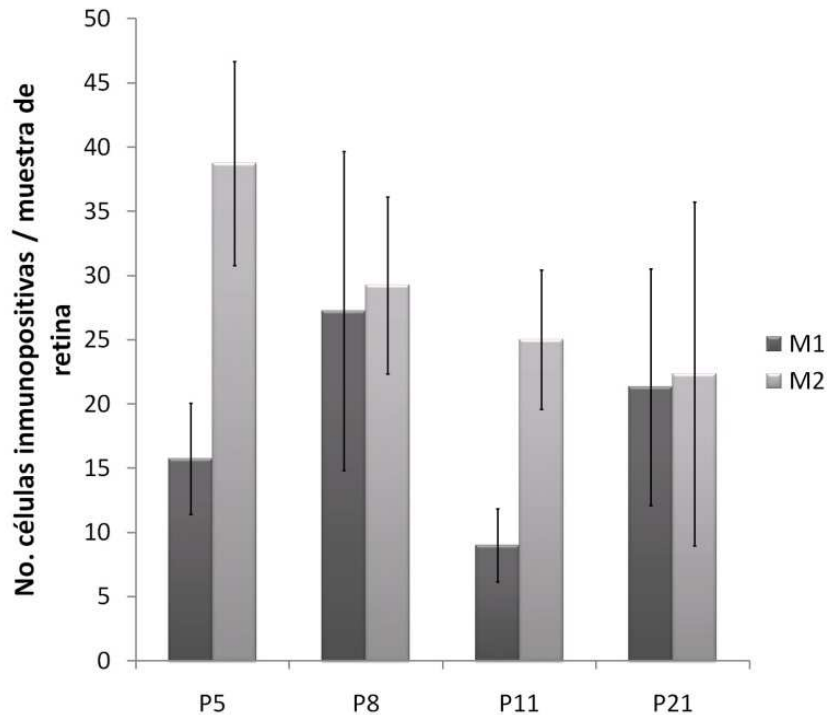


**Figura 43.** Efecto de LL sobre la retina del ratón CD1. Tras mantener a los animales en estas condiciones desde el nacimiento se detecta un número muy bajo de células melanopsínicas. En esta imagen tan solo se puede observar una célula M1B. Se pueden observar algunos procesos dendríticos, la mayoría en el plexo OFF, mientras que el plexo ON es prácticamente indetectable. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; ONL: capa plexiforme externa; OPL: capa nuclear externa. Escala: 50 $\mu$ m.

Bajo LL no se detectó el incremento observado previamente en LO, el número de células melanopsina positivas permanece entre 30 y 60 células por muestra de retina durante todo el desarrollo postnatal (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 44). Asimismo, tampoco se detectaron cambios en el número de células M1 y M2 durante el periodo postnatal (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 45). Además, el porcentaje de las células M1 y M2 (30% M1, 70% M2) no se observa en estos animales expuestos a LL. El bajo número de células melanopsínicas y dendritas observables parece indicar que la LL provoca una inhibición de estas células fotosensibles de la retina interna.

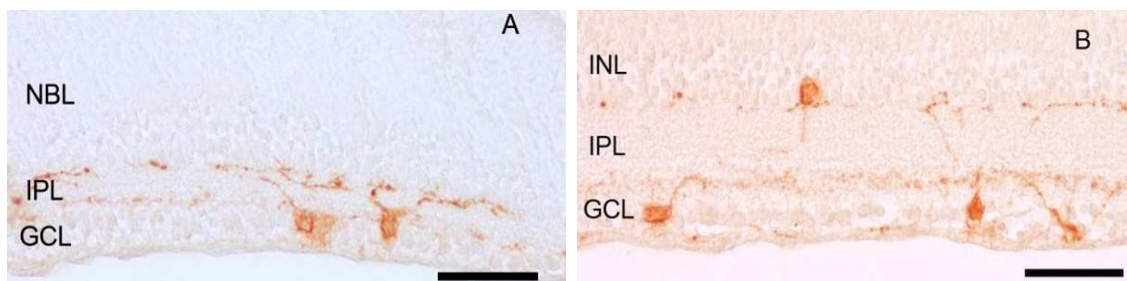


**Figura 44.** Número total de células melanopsina-positivas bajo LL en la retina albina. Cuando los animales son expuestos a estas condiciones lumínicas desde el nacimiento se aprecia un número muy bajo de células inmunopositivas que no varía durante el desarrollo.



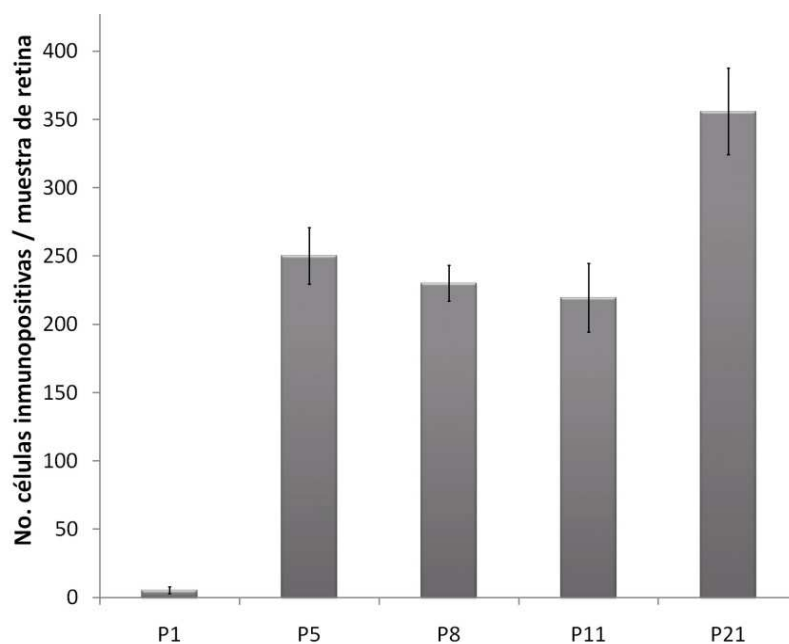
**Figura 45.** Efecto de la LL sobre las células M1 y M2 en la retina albina. Cuando los animales son expuestos a estas condiciones ambientales, no se detectan cambios en ambos subtipos celulares durante el desarrollo postnatal (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

**2.2.2. Oscuridad continua:** En la retina albina, bajo OO, las dendritas de las células melanopsínicas muestran una intensidad de marcaje cualitativamente mayor que la observada en animales expuestos a LO desde el nacimiento (Figura 46). Dada esta mayor intensidad de marcaje de las dendritas, los plexos de la IPL se vuelven más visibles desde el desarrollo postnatal temprano. Ambos plexos son diferenciables desde P5 (Figura 46A), al igual que ocurría en los animales pigmentados mantenidos bajo estas mismas condiciones.



**Figura 46.** Imágenes representativas de retinas albinas expuestas a OO. **A.** Cuando los animales albinos son mantenidos bajo estas condiciones constantes, desde P5 se observa un aumento de la intensidad de marcaje de los somas y dendritas, siendo a su vez los plexos de la IPL más visibles. Asimismo, se detecta también un incremento en el número de células inmunopositivas. **B.** En P11, se observan claramente los dos plexos dendríticos de la IPL. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; ONL: capa plexiforme externa; OPL: capa nuclear externa. Escala: 50µm.

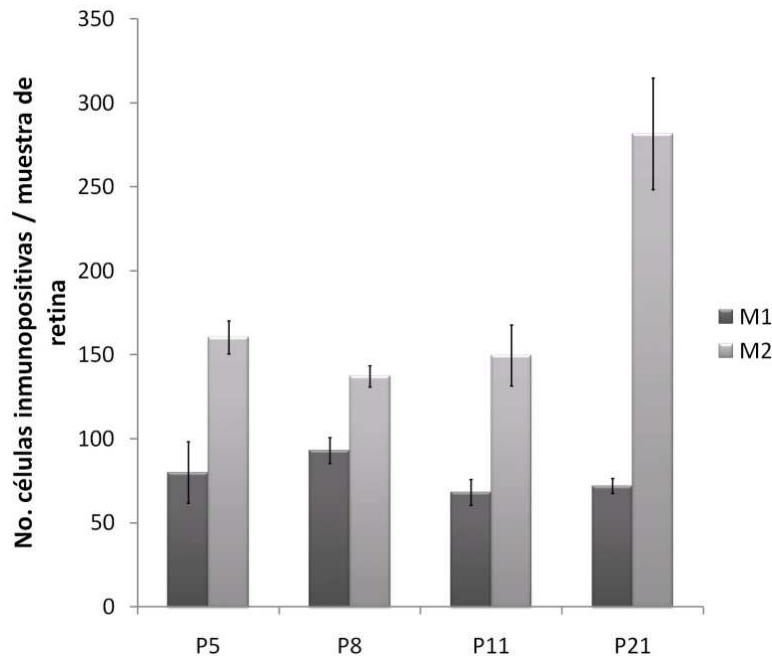
Cuando los animales albinos son expuestos a OO desde el nacimiento, se observa un incremento significativo del número de células melanopsínicas en dos intervalos: entre P1 y P5 (ANOVA,  $p < 0,001$ ) y entre P11 y P21 (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 47). Como consecuencia, al final del periodo postnatal (P21), los animales sometidos a OO muestran un número significativamente mayor que los mantenidos en LO (t de Student,  $p < 0,05$ ), excepto en P1 donde se observan valores similares entre ambos grupos.



**Figura 47.** Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas bajo OO en la retina albina. En P1 se detecta un número muy bajo de células inmunopositivas. Sin embargo, a continuación, se producen dos incrementos significativos de células melanopsínicas (P1-P5 y P11-P21), resultando en unos valores finales mayores que los observados en los animales LO.

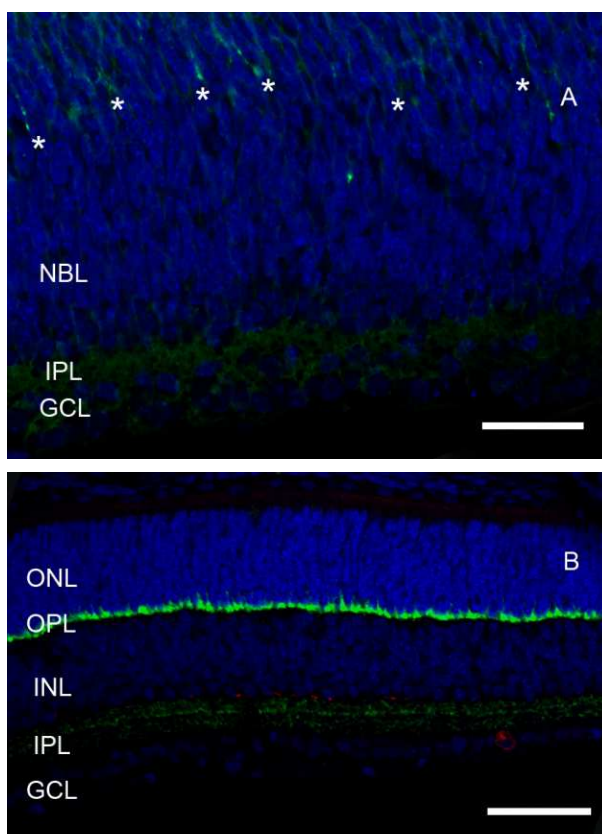
Bajo OO se aprecia también un incremento en el número de células M1 y M2 al final del desarrollo postnatal (P11-P21). En este momento, ambos subtipos celulares se comportan de distinta manera (ANOVA factorial,  $p < 0,01$ ). En las células M2 se aprecia un incremento significativo (ANOVA,  $p < 0,01$ ), mientras que el número de células M1 permanece constante (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 48). Al contrario que en LL, bajo OO se detecta un mayor número de células inmunopositivas, así como dendritas más visibles. Estos resultados sugieren que la OO durante el desarrollo postnatal provoca una estimulación de las células melanopsínicas.

## Resultados



**Figura 48.** Efecto de OO sobre las células M1 y M2 en la retina albina. Durante el desarrollo postnatal de la retina albina bajo estas condiciones ambientales se observa un incremento significativo del número de células M2 mientras que el de M1 permanece constante desde P5. Entre P1 y P5 existe otro incremento aunque, en este no se pueden analizar las dos subpoblaciones melanopsínicas, dada la dificultad de identificación de las mismas en P1.

Tal y como mencionamos previamente, en algunas de las edades analizadas los conos y bastones no son aún funcionales y las conexiones con la retina externa no están establecidas. En P1 no se observa apenas inmunomarcaje mediante el uso del suero anti-sinaptofisina, tan solo una leve tinción de fibras en la zona superior de la capa neuroblástica (Figura 49A). Por el contrario, en P11 se observa un marcate muy claro de las capas plexiformes de la retina (IPL, OPL), indicando que la vía de transmisión de las señales de la retina externa a la interna son funcionales (Figura 49B). En base a esto, todas estas respuestas en los animales albinos a las distintas condiciones ambientales parecen proceder de la fotosensibilidad intrínseca de las células melanopsínicas.



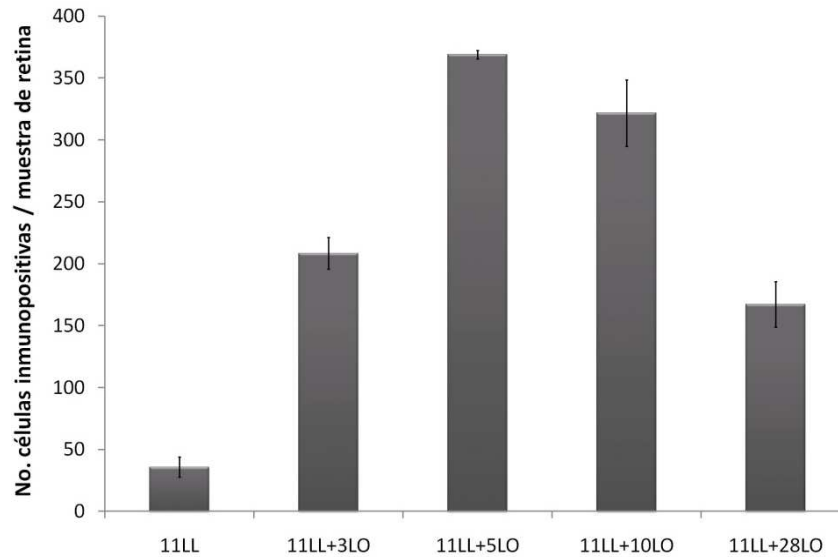
**Figura 49.** Imágenes representativas de retinas albinas inmunoteñidas con anti-melanopsina y anti-sinaptofisina. **A.** En P1 no se observa un marcaje claro de sinaptofisina (verde, Alexa 488), excepto algunas fibras aisladas en la zona superior de la NBL (asteriscos). **B.** Por el contrario, en P11 observamos un marcaje claro de sinaptofisina (verde) en la OPL e INL. Además, se observa una célula inmunopositiva para la melanopsina (rojo, Alexa 546). En ambas secciones, los núcleos fueron marcados en azul con DAPI. GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; ONL: capa plexiforme externa; OPL: capa nuclear externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50 $\mu$ m.

### 2.3. Exposición a LL seguido de LO

Para examinar cómo el sistema melanopsínico podría ser restaurado después de haber sido inhibido por la LL, los animales fueron mantenidos bajo LL desde el día del nacimiento hasta P11 (cuando conos y bastones comienzan a ser funcionales) seguido de 3, 5, 10 y 28 ciclos de LO.

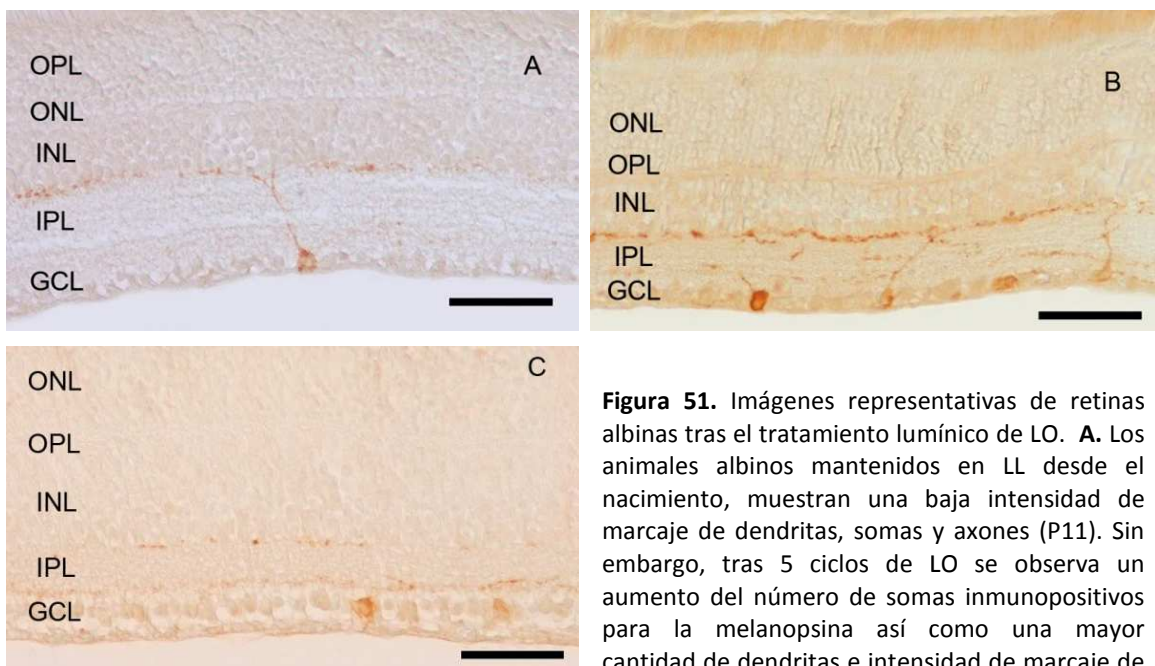
Tras mantener a los animales 11 días en LL seguido de 3 ciclos en LO, se aprecia un incremento significativo del número de células inmunopositivas (ANOVA,  $p < 0,001$ ) (Figura 50). Tras 5 ciclos de LO se observa un aumento aún mayor del número de células inmunopositivas en la retina (ANOVA,  $p < 0,001$ ), lo cual sugiere que este aumento es dependiente del tiempo. Tras 10 ciclos de LO se detuvo el incremento del número de células melanopsínicas (ANOVA,  $p > 0,05$ ) y, finalmente, tras 28 ciclos de LO el número de células inmunopositivas disminuyó (ANOVA,  $p < 0,001$ ), mostrando unos valores comparables con los observados en los animales sometidos a condiciones control LO (t de Student,  $p > 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 50.** Recuperación de las células melanopsínicas tras ser inhibidas por la LL en la retina albina. Un incremento significativo en el número de células inmunopositivas es detectado tras 3 y 5 ciclos de LO (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, tras 28 ciclos se produce una disminución de células melanopsina-positivas (ANOVA,  $p < 0,001$ ).

Tras la aplicación de los ciclos de LO las dendritas también muestran un mayor inmunomarcaje, siendo más visibles en la IPL. Tras 5 días en LO, los procesos dendríticos que se observan son comparables a los detectados previamente en el grupo OO. Sin embargo, tras 28 ciclos de luz-oscuridad, el inmunomarcaje de las dendritas es similar al observado en los animales mantenidos en condiciones control desde el nacimiento (Figura 51).

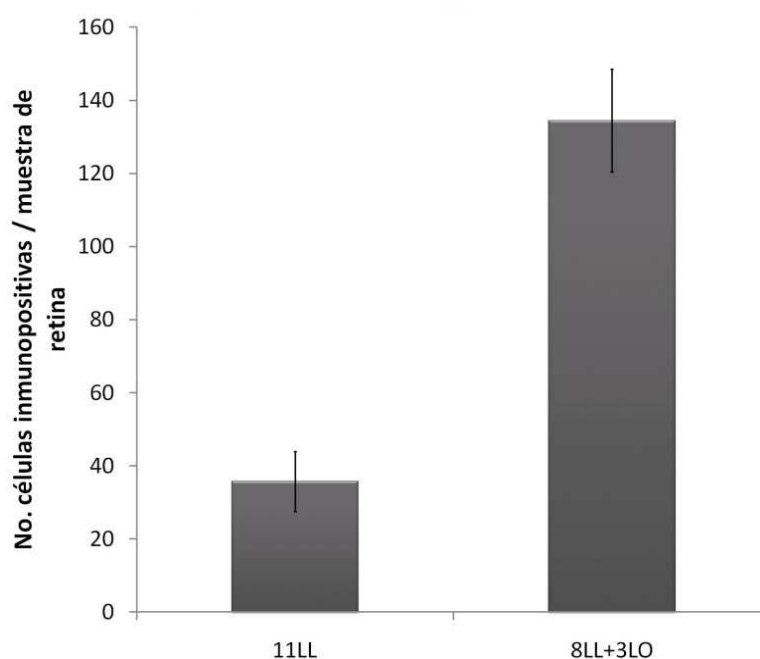


**Figura 51.** Imágenes representativas de retinas albinas tras el tratamiento lumínico de LO. **A.** Los animales albinos mantenidos en LL desde el nacimiento, muestran una baja intensidad de marcaje de dendritas, somas y axones (P11). Sin embargo, tras 5 ciclos de LO se observa un aumento del número de somas inmunopositivas para la melanopsina así como una mayor cantidad de dendritas e intensidad de marcaje de dendritas e intensidad de marcaje de las mismas (**B**). Tras 28 ciclos de LO, el número de células melanopsínicas así como la intensidad de



marcaje de las dendritas es similar al observado en los animales control mantenidos en LO desde el nacimiento (**C**). GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa nuclear externa; ONL: capa plexiforme externa. Escala: 50 $\mu$ m.

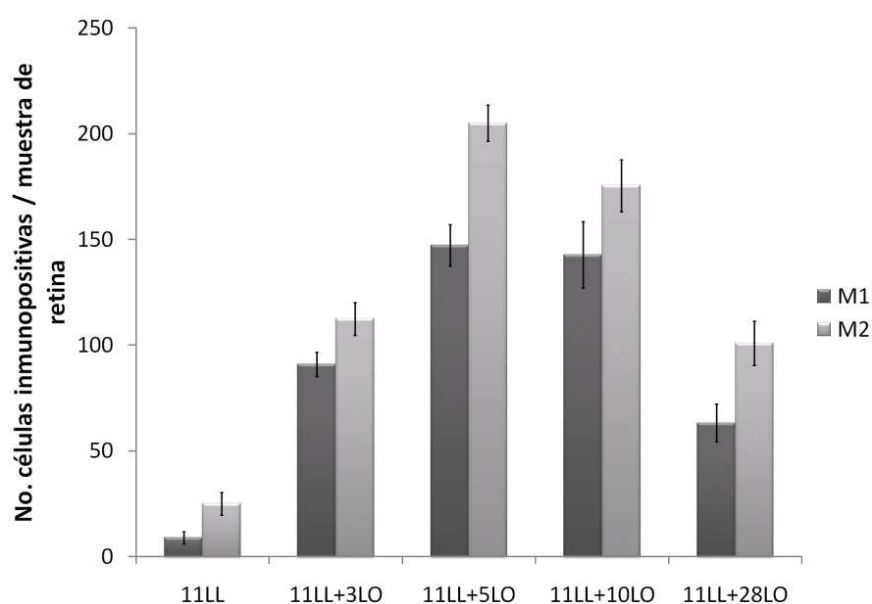
En base a los resultados anteriores podemos sugerir que los cambios inducidos por la LL en el sistema melanopsínico durante el periodo postnatal son reversibles. Asumiendo que los conos y bastones no son completamente funcionales en el día postnatal 11, nuestro próximo experimento pretende examinar la recuperación del sistema melanopsínico independientemente de las señales de conos y bastones. Con este fin, los animales fueron expuestos desde el día del nacimiento hasta P8 a condiciones de LL y a continuación, estuvieron sometidos a 3 ciclos de LO. Tras este tratamiento, se observó un incremento del número de células inmunopositivas en la retina (t de Student,  $p < 0,001$ ) (Figura 52). Durante este periodo las células melanopsínicas son los únicos fotorreceptores funcionales de la retina, lo que parece indicar que estas células fotosensibles son capaces de responder a las condiciones ambientales en ausencia de conos y bastones. Sin embargo, el incremento detectado tras 8d LL + 3 ciclos LO es menor que el observado tras 11d LL + 3 ciclos LO (t de Student,  $p < 0,01$ ), lo que parece indicar que la recuperación del sistema es más rápida cuando los conos y bastones son funcionales.



**Figura 52.** Restauración del sistema melanopsínico tras la inhibición por LL en ausencia de la señal de conos y bastones en el ratón CD1. Tras 3 ciclos de LO se observa un incremento significativo en el número de células melanopsínicas (t de Student,  $p < 0,001$ ).

## Resultados

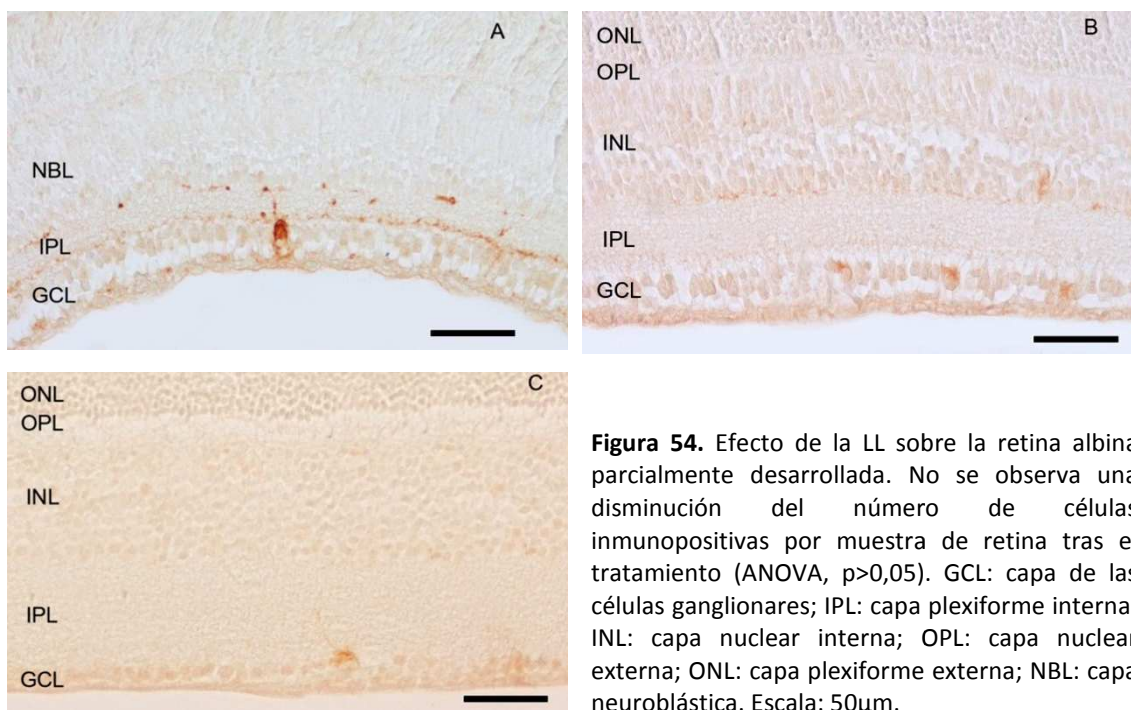
Las células M1 y M2 fueron también analizadas durante la recuperación del sistema melanopsínico. Tras 11 días en LL y 3, 5, 10 y 28 ciclos de LO se observa que ambos subtipos celulares se comportan de igual manera (ANOVA factorial,  $p > 0,05$ ). Tanto las células M1 como las M2 muestran un incremento gradual hasta 11dLL + 5 ciclos LO (ANOVA,  $p < 0,001$ ) (Figura 53). Después de este incremento se produce un descenso significativo en ambos tipos celulares (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Tras 11d LL + 28d LO no se observan diferencias entre los animales de este grupo y los animales control (t de Student,  $p > 0,05$ ). Las células M1 y M2 fueron también analizadas tras 8dLL + 3dLO mostrando un incremento similar de ambos tipos celulares (t de Student,  $p > 0,05$ ).



**Figura 53.** Recuperación de las células M1 y M2 tras ser inhibidas por LL en el ratón CD1. Ambos tipos celulares muestran un incremento significativo tras 3 y 5 ciclos de LO (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Tras 28 ciclos de LO se observa una disminución de ambos subtipos (ANOVA,  $p < 0,001$ ), igualando los valores previamente observados en los animales control (t de Student,  $p > 0,05$ ).

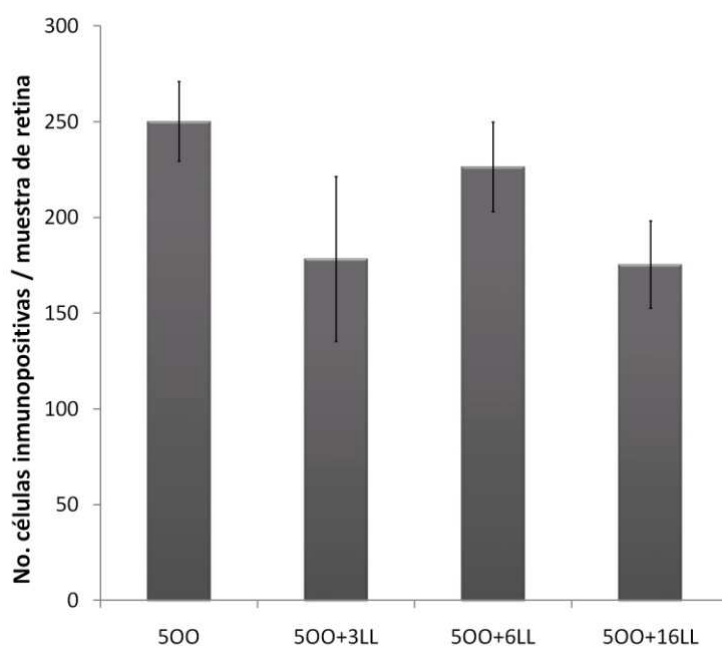
### 2.4. Exposición de los ratones albinos a OO seguido de LL

Los ratones albinos sometidos a condiciones de OO muestran en P5 un alto número de células inmunopositivas. Para conocer el efecto de la LL sobre un sistema melanopsínico parcialmente desarrollado los animales fueron mantenidos en OO hasta P5 y luego expuestos a 3, 6 y 16 ciclos de LL. Sorprendentemente, tras 16 ciclos de LL no se observa disminución del número de células melanopsina-positivas por muestra de retina (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 54).



**Figura 54.** Efecto de la LL sobre la retina albina parcialmente desarrollada. No se observa una disminución del número de células inmunopositivas por muestra de retina tras el tratamiento (ANOVA,  $p > 0,05$ ). GCL: capa de las células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa nuclear externa; ONL: capa plexiforme externa; NBL: capa neuroblástica. Escala: 50µm.

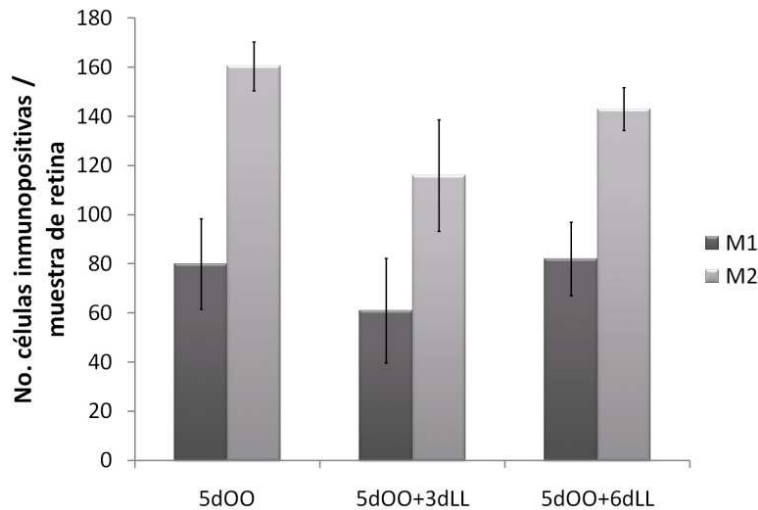
Sin embargo, a pesar de que no se aprecia una disminución de las células melanopsínicas, se produce una pérdida progresiva de la intensidad de la tinción, de modo que tras 16 ciclos de LL los somas poseen una baja inmunotinción y las dendritas no son apenas visibles (Figura 55).



**Figura 55.** Efecto de la LL sobre las células melanopsínicas en una retina albina parcialmente desarrollada. **A.** Cuando los animales albinos son mantenidos bajo OO desde el nacimiento se observa un claro inmunomarcage de las células melanopsínicas. **B.** Tras la aplicación de LL durante 3/6 ciclos se observa una pérdida progresiva de la inmunotinción tanto en somas como dendritas. **C.** Tras 16 ciclos de LL tan solo los somas son distinguibles. Los plexos dendríticos no se observan, y por tanto, las células M1 y M2 no se pueden identificar.

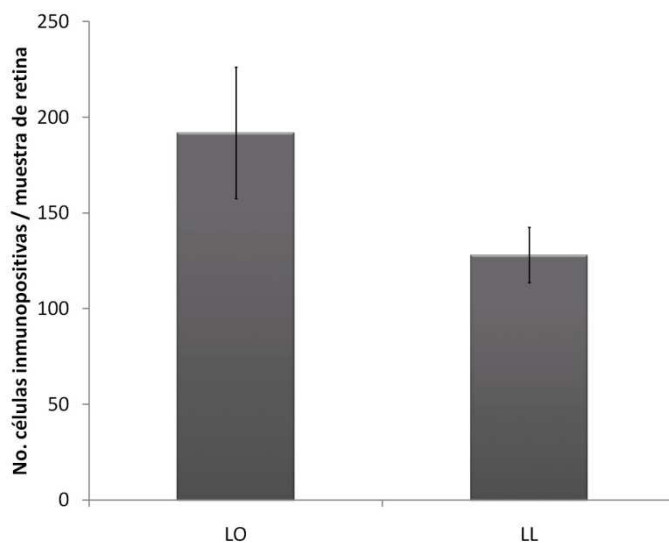
## Resultados

Las células M1 y M2 fueron también analizadas tras 5d OO y 3/6 días bajo LL. Ambos subtipos se comportan de igual manera tras el tratamiento lumínico (ANOVA factorial,  $p>0,05$ ) y no se detectaron cambios en la proporción de ambos subtipos (ANOVA,  $p>0,05$ ) (Figura 56). Las células M1 y M2 no fueron analizadas tras 5d OO y 16d LL debido a la ausencia de dendritas inmunoteñidas, lo que impide la clasificación morfológica de las células melanopsínicas.



**Figura 56.** Efecto de la LL sobre el número de células melanopsínicas en la retina parcialmente desarrollada del ratón CD1. No se detectan cambios en la proporción de las células M1 y M2 tras el tratamiento lumínico (ANOVA,  $p>0,05$ ).

Dados estos resultados podemos sugerir que la LL no provoca cambios en el número de células en un sistema melanopsínico parcialmente desarrollado. Para confirmar estos datos, se analizaron retinas de ratón CD1 adulto que fueron sometidos a LL durante 5 días. Tras este tratamiento lumínico, no se detectó disminución significativa del número de células inmunopositivas en la retina (t de Student,  $p>0,05$ ) (Figura 57).

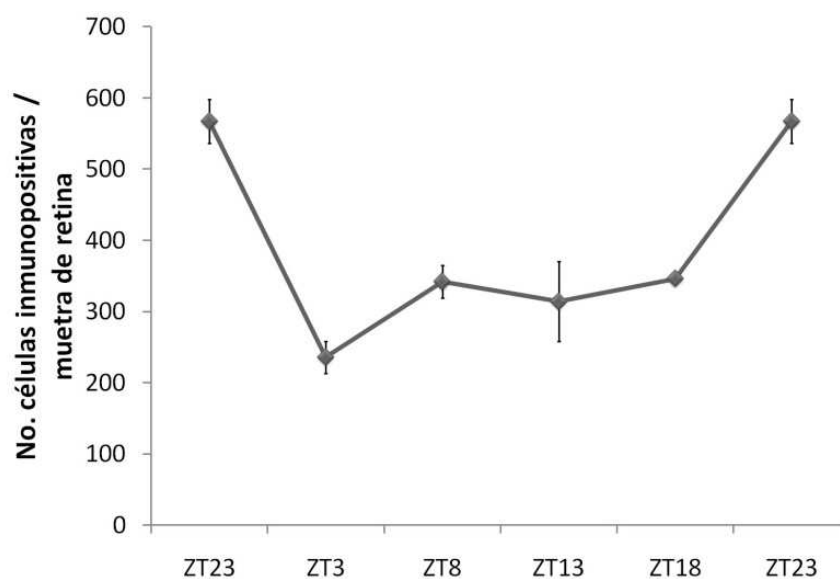


**Figura 57.** Efecto de la LL sobre el número de células inmunopositivas en la retina albina adulta. No se observa una disminución del número de células melanopsínicas por muestra de retina (t de Student,  $p>0,05$ ).

### 3. Oscilación diaria de las células melanopsínicas en la retina de ratón

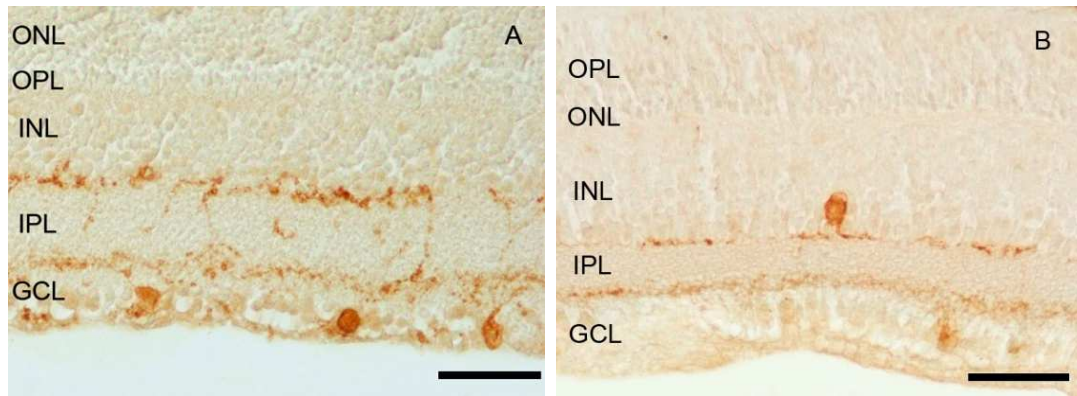
#### 3.1. Oscilación diaria del número de células melanopsínicas en la retina de ratón pigmentado

En las retinas del ratón pigmentado C3H bajo condiciones de LO se observa una variación del número total de células que expresan la melanopsina (ANOVA,  $p < 0,001$ ) (Figura 58). El número más elevado de células se detecta una hora antes de que la luz se encienda (ZT23), mientras que los valores más bajos son observados 3 horas después de que se encienda la luz (ZT3). Tras esta disminución, existe un pequeño incremento, aunque no significativo, del número de células inmunopositivas que se mantiene durante el resto de la fase lumínica y el comienzo de la fase de oscuridad. El incremento del número de células melanopsínicas tiene lugar al final de la fase de oscuridad (ANOVA,  $p < 0,05$ ). En ZT23 también se aprecia una mayor cantidad de dendritas inmunoteñidas, así como una mayor intensidad de tinción de las mismas y de los somas (Figura 59).



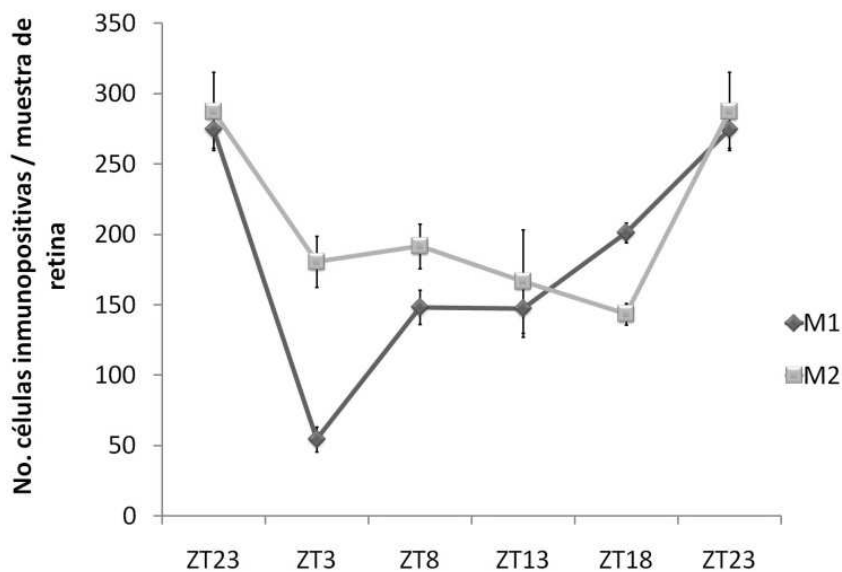
**Figura 58.** Número de células inmunopositivas durante el ciclo LO en el ratón C3H +/+. Existe una oscilación diaria significativa (ANOVA,  $p < 0,001$ ), con una disminución en el número de células melanopsina-positivas al comienzo de la fase lumínica ( $p < 0,001$ ) y un incremento de las mismas al final de la fase de oscuridad ( $p < 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 59.** Imágenes representativas de retinas durante el ciclo de LO en la retina del ratón pigmentado C3H +/+. **A.** ZT23. Nótese que además de existir un mayor número de células melanopsínicas, se aprecian gran cantidad de dendritas inmunopositivas. **B.** ZT3. Tres horas después del comienzo de la fase lumínica del ciclo LO, se produce una disminución de las células melanopsina-positivas. Además, se observa una menor cantidad de dendritas inmunopositivas. En este punto horario, tanto somas como dendritas muestran una intensidad de marcaje más leve que la observada en ZT23.

La variación diaria de las células M1 y M2 fue también analizada. El ANOVA factorial revela una interacción entre el subtipo celular y punto horario ( $p < 0,001$ ), lo que indica que las oscilaciones diarias de ambos tipos celulares son significativamente diferentes (Figura 60). La disminución de las células M1 es más pronunciada (ANOVA,  $p < 0,001$ ) que la de las células M2 (ANOVA,  $p < 0,01$ ) tras el comienzo de la fase lumínica. Además, la proporción entre ambos subtipos cambia durante el ciclo diario: en ZT3 las células M2 son mucho más abundantes que las M1, mientras que en ZT18 es al contrario.

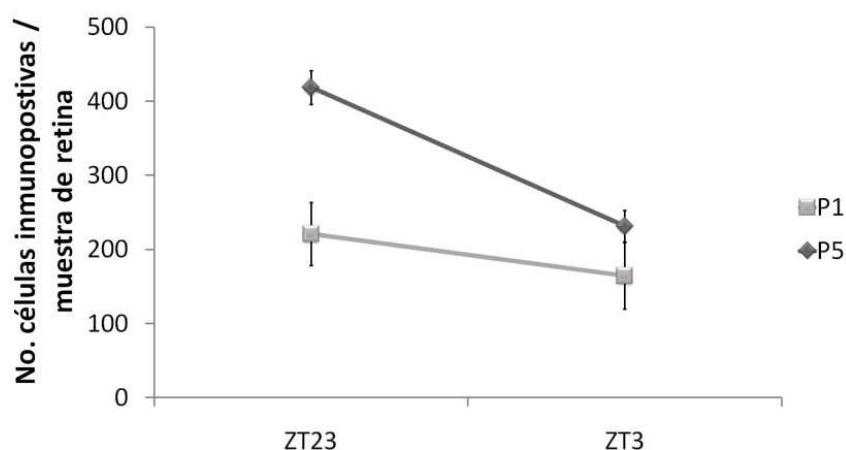


**Figura 60.** Oscilación diaria de las células M1 y M2 en el ratón C3H+/+. Ambos subtipos celulares muestran una variación diaria bajo LO (ANOVA, M1:  $p < 0,001$ ; M2:  $p < 0,01$ ). Al principio de la fase de luz se produce un

descenso en el número de células inmunopositivas, el cual es de mayor intensidad en las células M1. Al final de la fase oscura tiene lugar el incremento de las células melanopsínicas (ANOVA, M1, M2  $p < 0,01$ ). La proporción de células M1 y M2 varía durante el ciclo diario (t de Student, ZT3:  $p < 0,001$ ; ZT18:  $p < 0,01$ ).

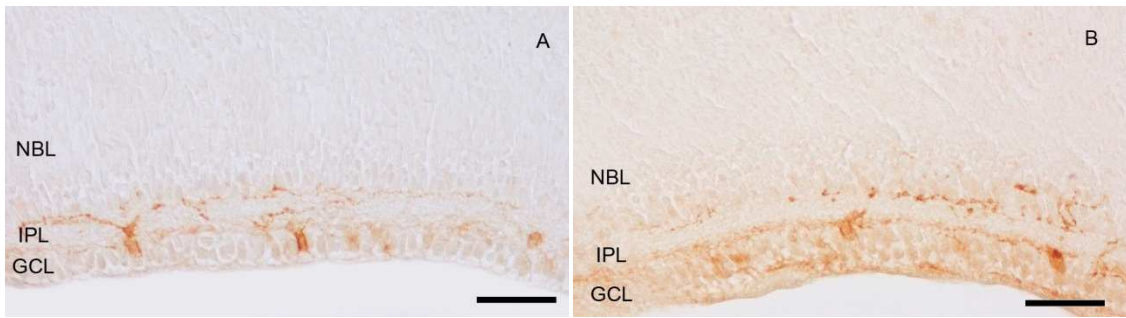
### 3.2. Oscilación diaria de las células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal

Tras observar la existencia de una oscilación diaria en el número de células melanopsínicas en adultos, se realizó un estudio con el fin de observar el establecimiento de la misma durante el desarrollo postnatal. En P5 existe una oscilación significativa del número de células melanopsínicas entre ZT23 y ZT3 ( $p < 0,01$ ) (Figura 61). Sin embargo, esta variación no está tan marcada como la detectada en los animales adultos. Además, a pesar de que existen cambios diarios en el número de células, no se aprecian diferencias en la cantidad de dendritas positivas o en la intensidad del inmunomarcaje (Figura 62). En el día postnatal 1 no se aprecian diferencias significativas entre ZT3 y ZT23 ( $p > 0,05$ ) (Figura 61).



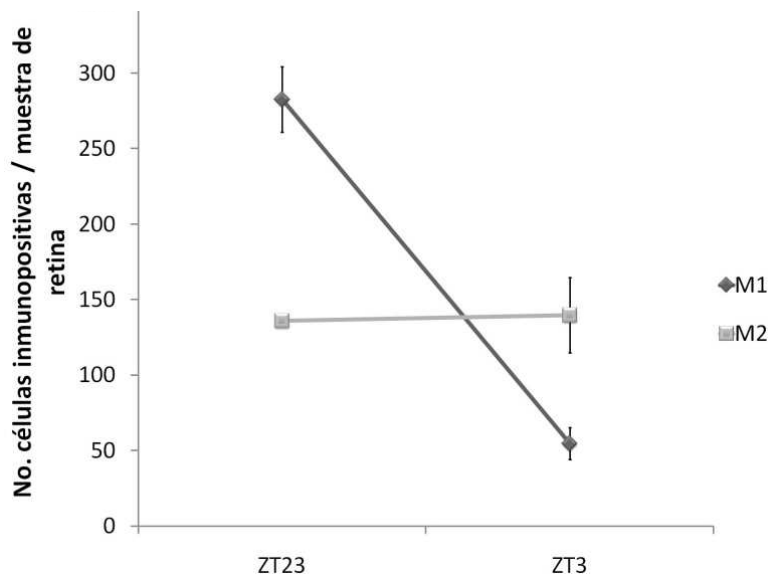
**Figura 61.** Establecimiento de la oscilación diaria de las células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal en la retina pigmentada. En P5 se observan diferencias significativas en el número de células inmunopositivas entre ZT23 y ZT3 (t de Student,  $p < 0,01$ ). Por el contrario, en P1 no se aprecia una variación significativa entre ambos puntos (t de Student,  $p > 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 62.** Imágenes representativas de retinas en P5 en distintos puntos horarios en el ratón pigmentado. No se aprecian diferencias significativas en el marcaje en los puntos analizados del ciclo diario en P5 (A: ZT23; B: ZT3).

Cuando analizamos los distintos subtipos celulares durante el desarrollo postnatal temprano, en P5 las células M1 presentan una oscilación diaria (t de Student,  $p < 0,001$ ), la cual es paralela, aunque de menor intensidad, a la observada en adultos (Figura 63). Por el contrario, en las células M2 no se observa ningún cambio entre estos puntos horarios (t de Student,  $p > 0,05$ ).



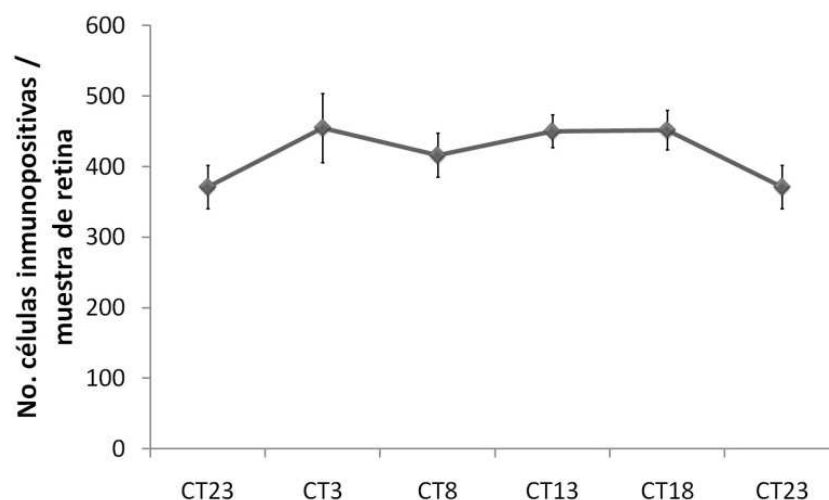
**Figura 63.** Oscilación diaria de las células M1 y M2 durante el desarrollo postnatal en la retina pigmentada. Las células M1 sufren una disminución entre ZT23 y ZT3 (t de Student,  $p < 0,001$ ), mientras que en las células M2 no se detecta ninguna oscilación.

### 3.3. Efecto de las condiciones de OO sobre la oscilación diario en el número de células que expresan melanopsina

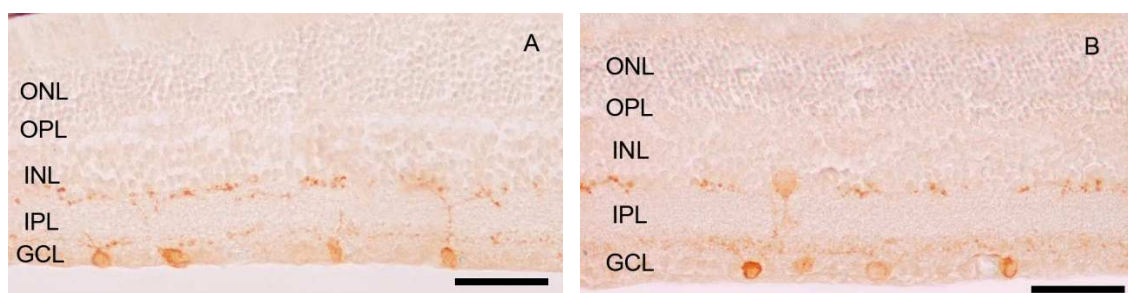
Con el objeto de determinar si la oscilación diaria de las células melanopsínicas está sujeta a una regulación endógena o simplemente es una respuesta directa a los cambios de LO,



los ratones C3H fueron mantenidos bajo condiciones de OO durante 6 días. Bajo estas condiciones constantes, las diferencias entre el valor más alto (CT23) y más bajo (CT3) desaparecen (ANOVA,  $p > 0,05$ ), por lo que no se detecta ningún ritmo (Figura 64), lo cual sugiere que no se trata de una regulación endógena. Durante el ciclo subjetivo se observa una media de 430 células por muestra de retina. La inmunoreactividad de las muestras es similar a la observada durante el desarrollo postnatal bajo OO, no mostrando diferencias cualitativas en la intensidad de marcaje en las muestras estudiadas (Figura 65).



**Figura 64.** Número de células melanopsínicas en la retina pigmentada bajo OO a lo largo de un periodo de 24 horas. No se observa una oscilación significativa del número de células inmunopositivas (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

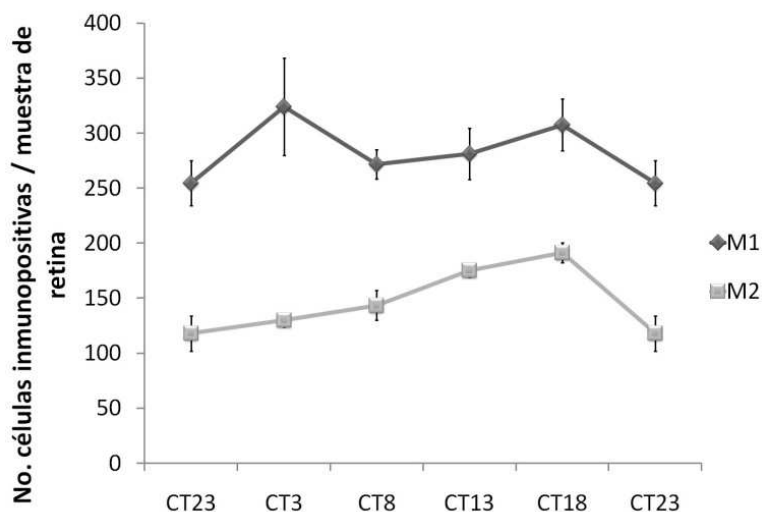


**Figura 65.** Imágenes representativas de retinas C3H adultas tras 6 ciclos en OO. Tras este tratamiento lumínico, no se observan diferencias en el inmunomarcaje entre CT23 (A) y CT3 (B).

Cuando las células M1 y M2 se estudian por separado bajo condiciones de OO, la proporción entre ambos subtipos cambia respecto a la observada previamente en LO. En todos los puntos circadianos estudiados las células M1 muestran valores más altos que las M2 (t de Student, CT23:  $p < 0,01$ ; CT3:  $p < 0,05$ , CT8:  $p < 0,001$ ; CT13:  $p < 0,01$ ; CT18:  $p < 0,01$ ) (Figura 66). Las células M1 muestran valores constantes durante todo el ciclo subjetivo (ANOVA;  $p > 0,05$ ), de

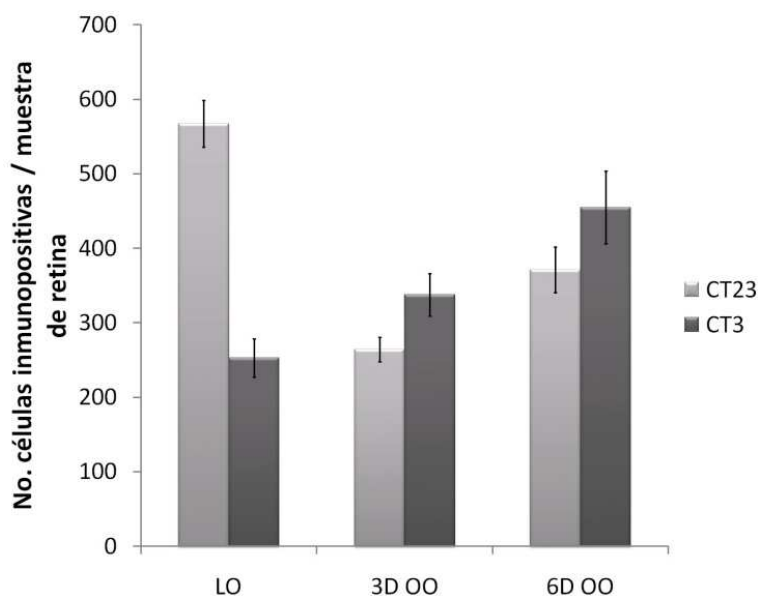
## Resultados

modo que no existe una variación circadiana de este subtipo celular. Sin embargo, las células M2 muestran una oscilación diaria (ANOVA,  $p < 0,01$ ) con una pequeña, pero significativa, disminución al final de la noche subjetiva entre CT18 y CT23 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 66.** Oscilación circadiana de las células M1 y M2 bajo OO en la retina pigmentada. Mientras que en el número de células M1 no se detecta una oscilación significativa bajo OO, las células M2 sí muestran una oscilación (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

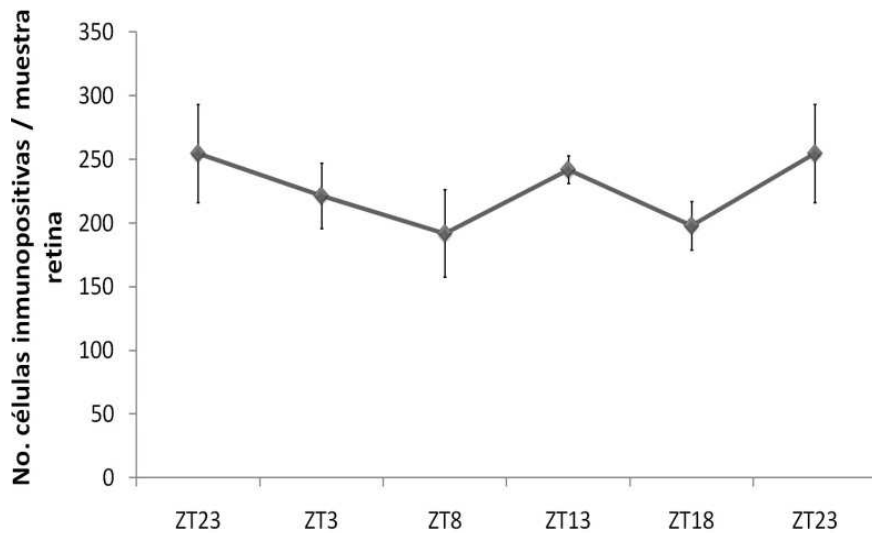
Sabemos que bajo condiciones de OO se produce la pérdida de la oscilación diaria presente en LO en la retina pigmentada, ¿pero cómo evoluciona esta pérdida?. Tal y como habíamos descrito previamente, bajo LO existe una disminución altamente significativa en el número de células inmunopositivas entre ZT23 y ZT3. Esta oscilación diaria desaparece tras mantener a los animales 3 ciclos en OO (t de Student,  $p > 0,05$ ) (Figura 67) debido a una disminución del número de células inmunopositivas en CT23 (t de Student,  $p < 0,001$ ). Cuando los animales son sometidos a 6 ciclos de OO, además de la disminución del número de células inmunopositivas en CT23, se produce un aumento del número de células melanopsina-positivas por muestra de retina en CT3 (t de Student,  $p < 0,05$ ).



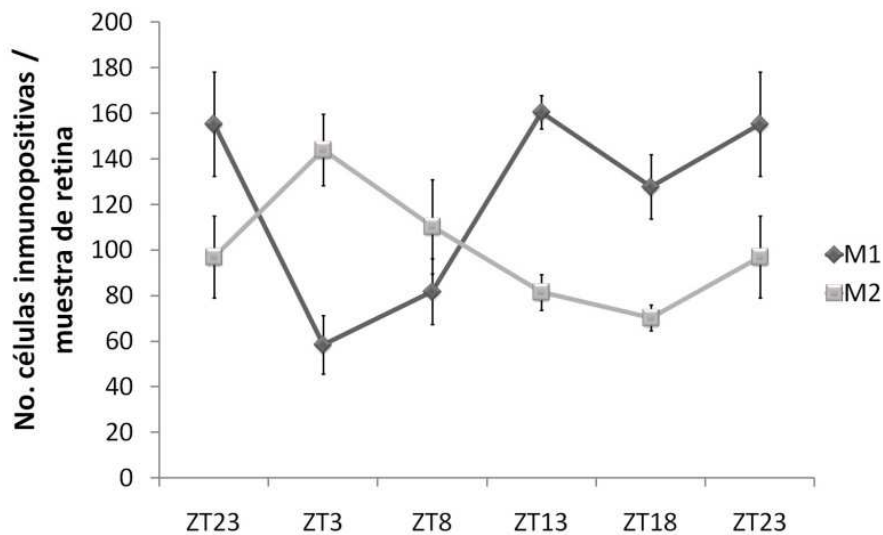
**Figura 67.** Evolución del efecto de OO sobre el número de células melanopsina-positivas en el ratón C3H +/+. Tras 3 ciclos de OO se produce una disminución significativa del número de células inmunopositivas en CT23 (t de Student,  $p < 0,001$ ), y tras 3 ciclos más bajo OO se produce un aumento del número de células melanopsínicas en CT3 ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Ritmo diario de las células melanopsínicas en la retina albina

La variación diaria del número total de células melanopsínicas fue también analizada en la retina de los animales albinos CD1. Sorprendentemente, en esta cepa de ratón no se observa una oscilación diaria en el número total de células inmunopositivas (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 68). Sin embargo, el test ANOVA factorial detecta una interacción entre tipo celular y punto horario (ANOVA, factorial,  $p < 0,001$ ), lo que indica que cada subtipo celular se comporta de manera distinta a lo largo del ciclo LO. Cuando las células M1 son estudiadas por separado se observa una oscilación diaria significativa (ANOVA,  $p < 0,001$ ) (Figura 69). Tras el encendido de la luz se observa una disminución del número de células M1 ( $p < 0,001$ ), y al final de la fase lumínica tiene lugar un incremento de este subtipo celular ( $p < 0,05$ ), que se mantiene durante la fase de oscuridad. Las células M2 también muestran una oscilación diaria (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 69), se aprecia una disminución leve, pero prolongada, en el número de células melanopsina-positivas entre ZT3 y ZT18. Posteriormente, entre ZT23 y ZT3 se produce un incremento, aunque no significativo, del número de células inmunopositivas. Es destacable que las oscilaciones de ambos subtipos son opuestas y esta es la razón por la cual no se detecta un ritmo diario en el número total de células melanopsina-positivas en la retina.



**Figura 68.** Oscilación diaria de las células melanopsínicas en la retina albina. No se detectaron diferencias significativas en el número total de células inmunopositivas durante el ciclo de LO (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 69.** Variación diaria de las células M1 y M2 en la retina albina. Ambos subtipos celulares muestran una oscilación diaria (ANOVA, M1,  $p < 0,001$ ; células M2,  $p < 0,05$ ). Es destacable que ambos subtipos muestran un comportamiento opuesto entre ZT23 y ZT8.

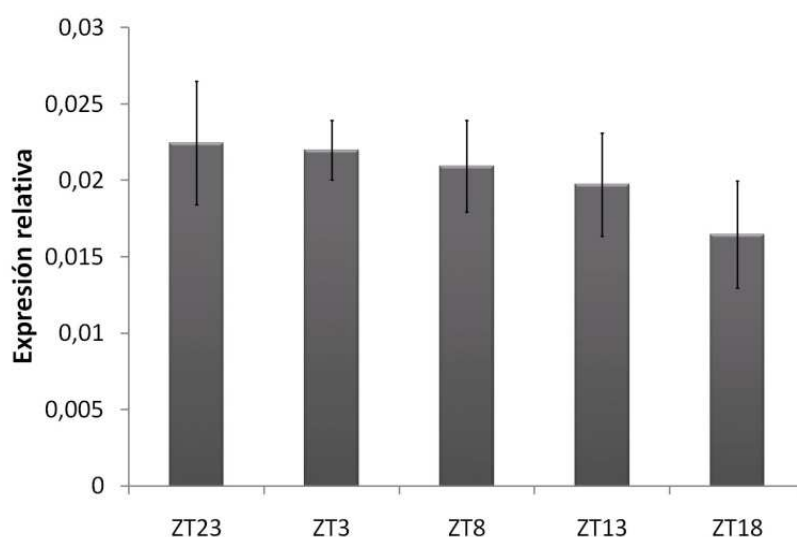
### 3.5. Oscilación del mRNA de la melanopsina en la retina

Hasta el momento sabemos que bajo condiciones de LO en el ratón pigmentado C3H existe una oscilación diaria en el número de células melanopsina-positivas. Tras el comienzo de la fase lumínica se produce una disminución significativa del número de células inmunopositivas y al final de la fase de oscuridad tiene lugar un incremento hasta alcanzar los

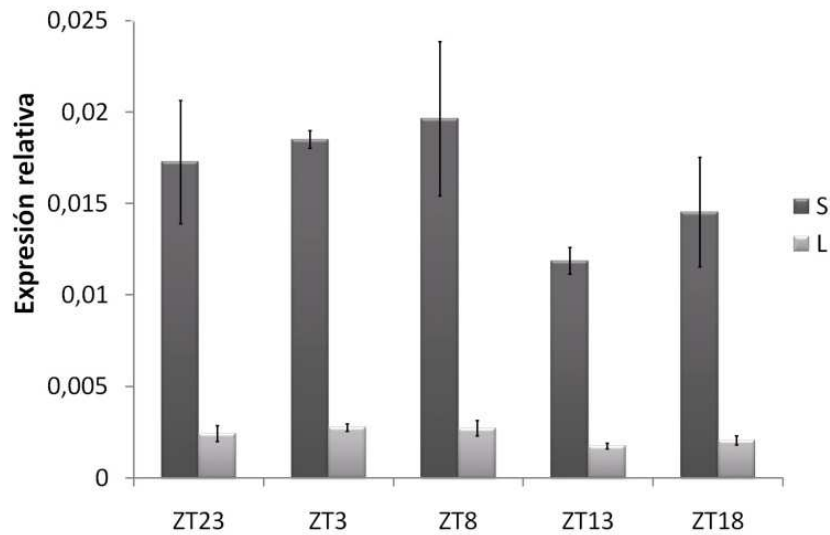
valores máximos detectados por sección de retina. Las células M1 y M2 también muestran una oscilación diaria. Por el contrario, en los ratones albinos no se detecta una oscilación diaria en el número total de células, pero sí en las células M1 y M2. Dados estos resultados, nos hemos propuesto analizar el ritmo diario del RNA mensajero de la melanopsina.

En la retina de ratón se detectan dos isoformas de la melanopsina: isoforma L y la isoforma S. Ambas isoformas se producen a partir de un único gen por *splicing* alternativo, estas comparten parte de la secuencia en el extremo amino-terminal y difieren en el extremo carboxilo-terminal. Como breve recordatorio, indicaremos que la isoforma L se encuentra en ambos subtipos celulares (M1 y M2), mientras que la isoforma S se localiza exclusivamente en las células M1. En este experimento se utilizaron cebadores contra la secuencia común de ambas isoformas, para así obtener una medida de la cantidad total de mRNA de la melanopsina. También se utilizaron cebadores contra las isoformas L y S.

**3.5.1. mRNA de la melanopsina en la retina pigmentada:** Tras analizar el mRNA total de la melanopsina en la retina pigmentada no se detectó una variación diaria (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 70). Tampoco se observó oscilación del mRNA de las isoformas L y S (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 71). No obstante, es importante destacar que la isoforma S es 7 veces más abundante que la isoforma L a lo largo del ciclo LO. Estos datos, junto con la desaparición de la oscilación diaria tras someter a los animales a OO, sugieren que la variación en el número de células melanopsina-positivas en la retina del ratón pigmentado ocurre a nivel post-transcripcional.

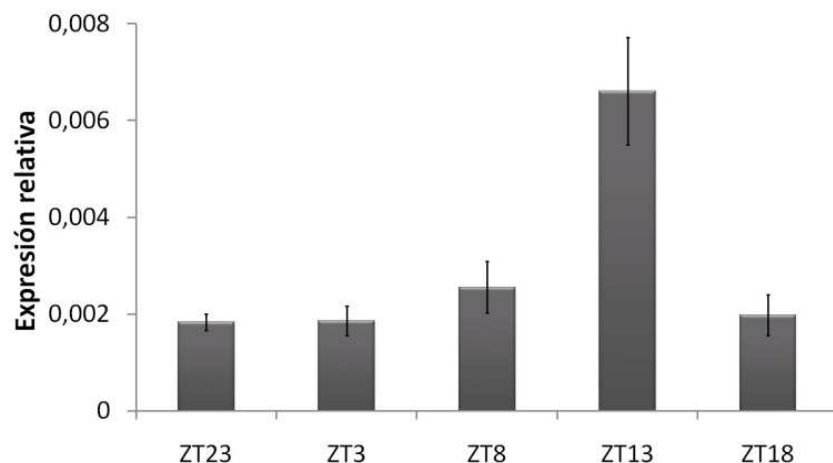


**Figura 70.** Ritmo diario del mRNA total de la melanopsina en el ratón C3H adulto. No se aprecia una oscilación diaria en la cantidad total de mRNA de la melanopsina (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

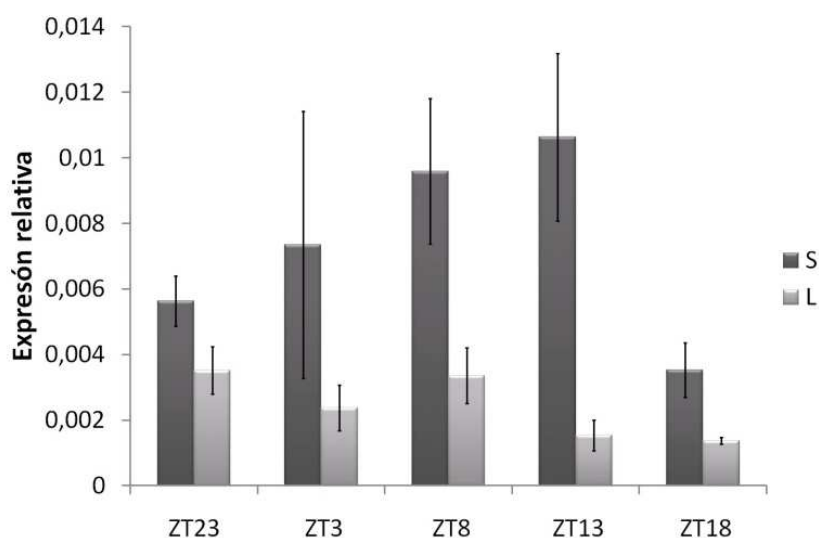


**Figura 71.** Oscilación diaria del mRNA de las isoformas L y S de la melanopsina. No se aprecian diferencias significativas durante el ciclo LO (ANOVA, isoforma L:  $p > 0,05$ ; isoforma S:  $p > 0,05$ ). Es destacable que el mRNA de la isoforma S es aproximadamente 7 veces más abundante que el de la L, esta proporción se mantiene constante durante todo el ciclo diario.

**3.5.2. mRNA de la melanopsina en la retina albina:** La oscilación diaria del mRNA de la melanopsina fue también analizado en los ratones albinos. Sorprendentemente, al analizar el mRNA total de la melanopsina se observa una variación con un pico máximo de expresión tras el comienzo de la fase de oscuridad (ANOVA,  $p < 0,001$ ) (Figura 72). Sin embargo, cuando analizamos el ritmo diario de las isoformas L y S no se detectó ninguna oscilación (Figura 73). En los animales albinos también se puede observar una mayor expresión de la isoforma S.



**Figura 72.** Oscilación diaria del mRNA total de la melanopsina en el ratón CD1 adulto. Tras el comienzo de la fase oscura se aprecia un incremento significativo de la expresión relativa total de la melanopsina (ANOVA,  $p < 0,001$ ).



**Figura 73.** Ritmo diario del mRNA de las isoformas L y S de la melanopsina en la retina albina. Ninguna de las isoformas muestra un ritmo diario significativo (ANOVA, isoforma S:  $p > 0,05$ ; isoforma L:  $p > 0,05$ ). Los ratones albinos también muestran una mayor expresión de la isoforma S de la melanopsina.

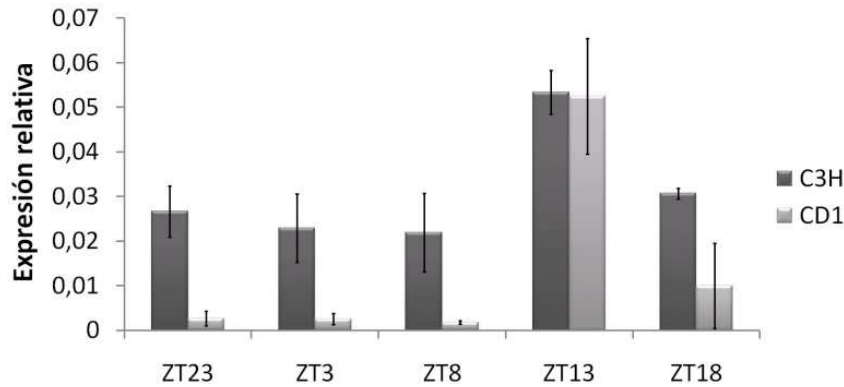
Es importante resaltar que en los animales C3H existe una mayor cantidad del mRNA total que en las retinas albinas, el test t de Student muestra diferencias significativas en todos los puntos (t de Student, ZT3:  $p < 0,001$ ; ZT8:  $p < 0,001$ ; ZT13:  $p < 0,05$ ; ZT18:  $p < 0,05$ ; ZT23:  $p < 0,01$ ). Para conocer a qué se deben estas diferencias se compararon las isoformas L y S entre los ratones C3H y CD1. Cuando se analiza la isoforma L no se detectan diferencias entre ambas cepas en ningún punto horario (t de Student,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, cuando estudiamos la isoforma S se aprecia una mayor expresión en los animales pigmentados (t de Student, ZT3  $p < 0,05$  y ZT23:  $p < 0,05$ ). Por lo cual, las diferencias en cuanto a la expresión de la melanopsina en ambas cepas parecen deberse a una baja cantidad de la isoforma S en la retina albina. Estos datos apoyan los resultados observados previamente en el número total de células melanopsínicas, donde los ratones pigmentados mostraban valores más altos por muestra de retina en algunos puntos horarios.

### 3.6. Análisis de otros genes rítmicos en la retina

Dadas las grandes diferencias acerca de la oscilación diaria de la melanopsina observadas entre los ratones pigmentados C3H y los albinos CD1, decidimos ampliar nuestro trabajo analizando mediante RT-PCR otros genes de la retina, con el fin de observar similitudes o diferencias entre ambas cepas.

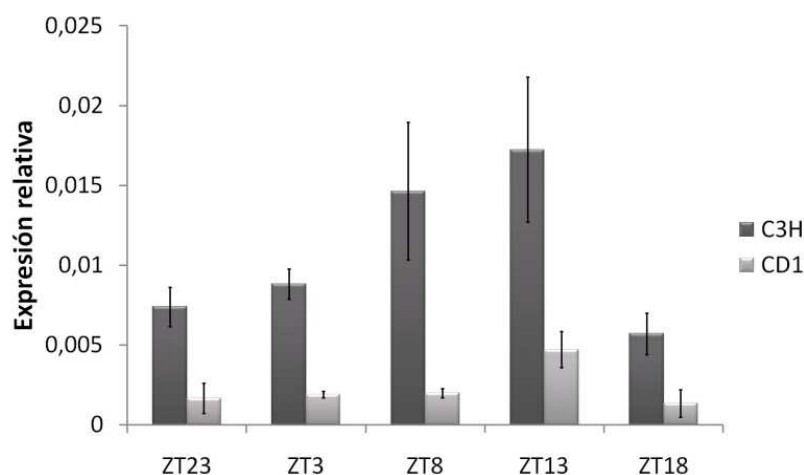
## Resultados

**3.6.1. c-Fos:** El RNAm de c-Fos muestra una oscilación diaria en ambas cepas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) con un máximo de expresión justo después del comienzo de la noche, y valores más bajos durante el segunda parte de la fase oscura y durante toda la fase lumínica del ciclo LO (Figura 74).



**Figura 74.** Ritmo diario del mRNA de c-Fos. Ambas cepas muestran una oscilación diaria en la expresión relativa de c-Fos (ANOVA, C3H:  $p < 0.05$ ; CD1:  $p < 0.05$ ).

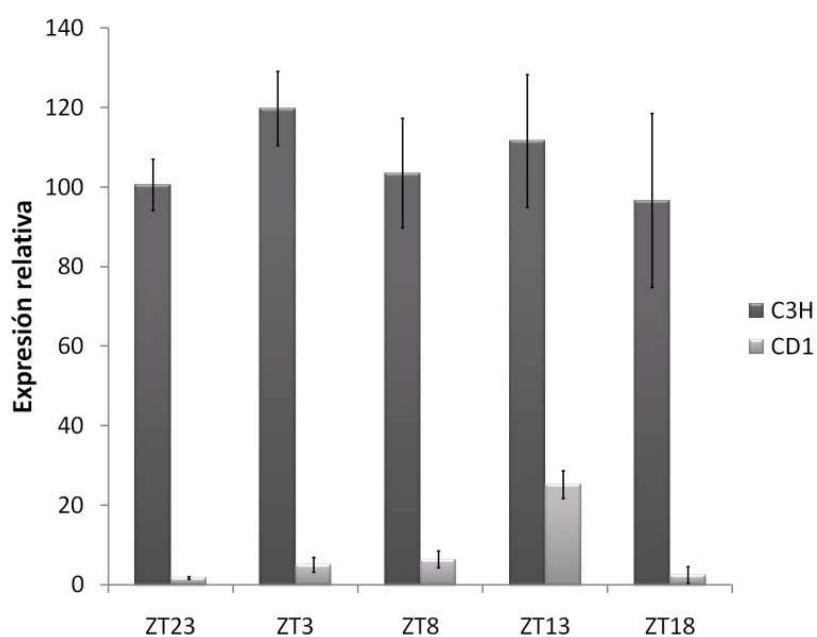
**3.6.2. Per2:** El análisis de la expresión de este gen reloj en la retina del ratón pigmentado C3H muestra una oscilación diaria con un máximo de expresión al final de la fase lumínica y comienzo de la fase de oscuridad (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Figura 75). Por el contrario, en la retina albina, a pesar de que se aprecia un incremento de la expresión de Per2 durante el comienzo de la fase de oscuridad este no es significativo (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (Figura 75). Nótese que los valores en la cepa pigmentada son significativamente más elevados que los detectados en la retina albina (t de Student, ZT23:  $p < 0.05$ ; ZT3:  $p < 0.001$ ; ZT8:  $p < 0.05$ ; ZT13:  $p > 0.05$ ; ZT18:  $p < 0.05$ ).



**Figura 75.** Oscilación diaria del mRNA de Per2. Tras el comienzo de la fase oscura se aprecia un incremento significativo de la expresión relativa en la cepa C3H (ANOVA,  $p < 0.05$ ). En la cepa albina se observa un incremento similar aunque no significativo (ANOVA,  $p > 0.05$ ).



**3.6.3. Opsina de bastones:** Esta opsina fue también analizada en ambas cepas de ratón. Cuando se analizó el ritmo diario de la opsina de bastones en la retina pigmentada no se apreció una variación diaria del RNAm (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (Figura 76). Sin embargo, sí se observa una clara oscilación diaria en la cepa albina CD1, con un incremento significativo de expresión en la primera mitad de la fase oscura (ANOVA,  $p < 0.01$ ) (Figura 76). Nótese la diferencia de expresión entre ambas cepas de ratón, resultado en unos valores significativamente más elevados en la retina pigmentada en todos los puntos horarios analizados (t de Student, ZT23:  $p < 0,001$ ; ZT3:  $p < 0,001$ ; ZT8:  $p < 0,001$ ; ZT13:  $p < 0,01$ ; ZT18:  $p < 0,05$ ).



**Figura 76.** Oscilación diaria del mRNA de la opsina de bastones. No se aprecian diferencias significativas durante el ciclo LO en la cepa C3H (ANOVA,  $p > 0,05$ ). En la retina albina tras el comienzo de la fase oscura se aprecia un incremento significativo de la expresión de la rhosopsina (ANOVA,  $p < 0,01$ ).



# *Discusión*



La fotosincronización, un episodio clave para la comprensión del sistema de fotorrecepción circadiana, es mediada por las células ganglionares melanopsínicas y tiene lugar en las interfases entre los periodos de luz y de oscuridad del ciclo diario (es decir, al amanecer y al ocaso). Es de esperar, por tanto, que la funcionalidad del sistema fotorreceptor basado en estas células presente algún tipo de oscilación a lo largo del ciclo diario, un aspecto que aún ha sido muy poco estudiado hasta la fecha. A pesar de que cada vez son más los estudios sobre este sistema fotorreceptor retiniano, poco se sabe sobre su desarrollo o sobre la influencia que las condiciones externas de iluminación puedan ejercer sobre el mismo en los estadios perinatales. Estos y otros aspectos serán discutidos en los siguientes capítulos de la presente tesis.

## **1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas**

Clásicamente, se pensaba que las crías de mamíferos se sincronizaban con las condiciones externas a través de la melatonina presente en la leche materna (Naitoh y cols., 1998; Rowe y cols., 2002), ya que la maduración funcional y anatómica de conos y bastones, únicos fotorreceptores retinianos conocidos hasta hace unas dos décadas, no tiene lugar hasta aproximadamente el día 10 del periodo postnatal. Un desarrollo similar era también esperable en la visión no formadora de imágenes, en la cual las células melanopsínicas ejercen un papel esencial. No obstante, son muchas las evidencias que sugieren que las células de la retina que expresan el fotopigmento melanopsina son funcionales desde el periodo postnatal temprano, y que este sistema fotorreceptor precede al sistema formador de imágenes. En la retina del ratón se han descrito células que expresan la proteína melanopsina desde el día del nacimiento (Sekaran y cols., 2005). De hecho, estas células ya son capaces de responder a la estimulación lumínica desde P0, en un momento en el que se asumía que no existía ningún tipo de detección lumínica funcional (Sekaran y cols., 2005; Tu y cols., 2005). El RHT de roedores es detectable desde P0 (Speh y Moore, 1993; Leard y cols., 1994; Weaver y Reppert, 1995; Hannibal y Fahrenkrug, 2004b) y, además, se ha demostrado que el SCN ya es capaz de responder en P0-1 (Lupi y cols., 2006) o en P4 (Muñoz-Llamosas y cols., 2000) con una intensidad lumínica suficiente, lo que indica que las conexiones entre la retina y el mismo son ya funcionales desde el nacimiento.

En los mamíferos, la retina se desarrolla a partir de una evaginación e invaginación del diencefalo. Durante la formación de la retina tienen lugar procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular por apoptosis (muerte celular programada). Las señales de

supervivencia no son únicamente factores neurotróficos, sino también neurotransmisores liberados por los terminales aferentes, así como la actividad eléctrica entre axones vecinos. En el proceso de formación de la retina se identifican tres olas significativas de muerte celular:

- La primera ola de muerte celular, **muerte celular morfogénica**, tiene lugar durante el desarrollo embrionario temprano (E10,5-E12,5) que parece estar implicada en el esculpido de la retina y la facilitación de la salida de las fibras ópticas (Valenciano y cols., 2008).
- La **muerte celular temprana** ocurre durante la génesis de las células ganglionares (E15,5-E17,5), que son el primer tipo celular en diferenciarse en la retina. (Valenciano y cols., 2008).
- La tercera ola de muerte celular, la **muerte celular neurotrófica**, es dependiente del éxito que tengan las neuronas en la competición por los factores neurotróficos secretados por las células diana. Se ha descrito este tipo de muerte en células ganglionares durante las sinaptogénesis intrarretiniana (E18-P12) y extrarretiniana (P13-P21) (Valenciano y cols., 2008). Se trata del proceso de selección de mayor calibre durante el desarrollo de la retina, de hecho, en el ratón C3H/He se pierden aproximadamente un 70% de las células ganglionares entre P0 y el adulto (Strom y Williams, 1998).

### **1.1. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina pigmentada**

En mamíferos, las células ganglionares de la retina sufren profundos cambios durante el desarrollo postnatal. Es de suponer que las células melanopsínicas estén también expuestas a estos procesos de selección celular previamente descritos. Sin embargo, nuestros datos en la cepa C3H +/- aportan una sólida evidencia de que las células ganglionares que expresan el fotorpigmento melanopsina no se ven afectadas por la muerte celular neurotrófica. En estudios previos, se ha descrito una disminución de la densidad de las células melanopsínicas en la retina de ratón a lo largo del desarrollo postnatal (Sekaran y cols., 2005; Ruggiero y cols., 2009), sugiriéndose en ambos trabajos que esta disminución en la densidad celular se debe a la muerte de dichas células. No obstante, en ninguno de estos estudios se tuvo en cuenta que el área retiniana sufre un considerable aumento durante el desarrollo, por lo que no se deben tomar densidades como valores absolutos. En nuestros resultados, que se obtuvieron de muestras de retina procedentes de la misma cepa de ratón que la estudiada por Sekaran y cols. (2005), no se observa una disminución del número total de células melanopsínicas

durante el periodo postnatal tanto en secciones de retina como en retinas enteras. Sin embargo, en nuestro trabajo también observamos la misma disminución en densidad de células melanopsínicas durante el desarrollo, pero esta es proporcional al incremento en el área retiniana que tiene lugar durante este periodo. Por ello, dado que no se observa una disminución del número total de células melanopsínicas desde P1 hasta P21, parece que durante el desarrollo postnatal se produce una reorganización espacial de estas células más que una muerte celular de las mismas.

Sekaran y cols (2005), administrando carbenoxolona para bloquear las uniones *gap* entre células vecinas, demostraron también una disminución de la densidad de células ganglionares fotosensibles durante el desarrollo postnatal, en particular entre P0 y P4. Sin embargo, teniendo en cuenta el estudio de Tu y cols. (2005), los datos obtenidos mediante esta técnica entre P0 y P1 no son totalmente válidos, ya que justamente en ese periodo altas dosis de carbenoxolona no son capaces de bloquear las uniones *gap* entre células vecinas. Por tanto, la disminución del número de células que responden a la luz detectada por Sekaran y cols. (2005) entre P0 y P4 podría ser en parte un artefacto.

Todos estos datos parecen indicar que las células que expresan la proteína melanopsina en la retina de ratón no se ven sujetas a muerte celular programada durante el desarrollo postnatal. Es por ello que la selección neurotrófica de dichas células, si en efecto ocurre, podría tener lugar en un periodo más temprano que el del resto de células ganglionares, en principio no implicadas en la visión no formadora de imágenes.

En la presente tesis también hemos estudiado en el periodo postnatal las subpoblaciones de las células melanopsínicas. Las células que expresan la melanopsina han sido y siguen siendo difíciles de clasificar. En función de la arborización de sus procesos dendríticos se pudieron identificar los dos subtipos principales descritos anteriormente, M1 y M2, que muestran diferencias tanto en cuanto a las respuestas fisiológicas (Schmidt y Kofuji, 2009), como a las proyecciones cerebrales (Baver y cols., 2008). Se ha descrito también un tercer subtipo, las células M3, con dendritas en ambos plexos, ON y OFF, (Viney y cols., 2007; Schmidt y cols., 2008) y que otros autores consideran células M1 anómalas (Berson y cols., 2010). No obstante, en nuestro caso, tan solo se han tenido en cuenta los subtipos M1 y M2, ya que aunque sí se observaron ocasionalmente células M3 en nuestras muestras, resultan difíciles de identificar, particularmente en secciones.

## Discusión

Durante el desarrollo postnatal en la retina del ratón pigmentado C3H hemos detectado un porcentaje constante de cada tipo celular desde P5 en adelante (22% células M1, 78% células M2), lo que apoya la idea general de que este sistema es funcional desde un periodo muy temprano del desarrollo. Son varios los estudios en los que se ha analizado la proporción de los distintos subtipos celulares en la retina de ratón (Hattar y cols., 2006; Viney y cols., 2007; Baver y cols., 2008; Schmidt y cols., 2008), si bien existe una elevada discrepancia acerca de la proporción entre las dos subpoblaciones. Estas diferencias pueden deberse al uso de distintas cepas de ratón, así como a las distintas técnicas de estudio utilizadas. No obstante, tal y como se ha descrito en nuestros resultados, en nuestro trabajo hemos observado una variación diaria en el número de células M1 y M2 a lo largo del ciclo diario de luz-oscuridad, lo que podría explicar las diferencias detectadas entre los distintos trabajos publicados, si en los mismos no se tuvo en cuenta la hora del día en la que se tomaron las muestras.

Por otra parte, en el presente estudio también se observaron diferencias en la intensidad de inmunomarcaje entre las células M1 y M2: la mayoría de las células M1 muestran una fuerte intensidad de marcaje, mientras que las células M2 están, por lo general, débilmente marcadas. Otros autores, utilizando el marcador tau-lacZ en el ratón B6/129, no detectaron células M2 (Hattar y cols., 2006; Baver y cols., 2008), de modo que en estas células la expresión de la melanopsina podría ser en efecto menor que en las M1. Consistente con estos resultados es el hecho de que las células M1 son aproximadamente 10 veces más sensibles al estímulo lumínico que las células M2 (Schmidt y cols., 2008). Recientemente, han sido descritas dos isoformas de la melanopsina en el ratón, L y S (Pires y cols., 2009). Ambas isoformas se generan por *splicing* alternativo del gen de la melanopsina y codifican fotopigmentos funcionales. La isoforma L se localiza en ambos subtipos celulares, mientras que la isoforma S tan solo se detecta en las células M1. La isoforma S es 40 veces más abundante que la L, lo que explica las diferencias en intensidad de marcaje observadas en nuestras muestras.

Las células M1 muestran generalmente una inmunotinción intensa. No obstante, aproximadamente la mitad de las células M1B (soma localizado en la INL y dendritas en el plexo OFF) son pálidas. Esto explica por qué en el estudio de Hattar y cols. (2006) tan solo se detecta un 5% de este subtipo celular respecto al total de células melanopsínicas, mientras que en nuestros datos las células M1B se corresponden con un 10% aproximadamente. No hay por el momento ninguna explicación al hecho de que la mitad de las células M1B tengan una menor intensidad de marcaje.



## 1.2. Desarrollo prenatal de las células melanopsínicas

La ritmicidad circadiana es una característica fundamental de los organismos que propicia que las funciones vitales sucedan en momento preciso y de acuerdo con los cambios ambientales cíclicos. El SCN en los fetos comienza a funcionar antes de que tenga lugar la inervación del mismo desde la retina (Reppert y cols., 1985; Reppert y cols., 1988). Durante la gestación, el organismo en desarrollo está prácticamente aislado de la influencia de las señales ambientales del medio externo y, sin embargo, está continuamente expuesto a las señales internas de la madre (El-Hennamy y cols., 2008). La mayoría de estas señales que atraviesan la barrera placentaria muestran ritmos circadianos, preparando así a los fetos para el ambiente externo cíclico que se encontrarán durante la vida postnatal. Las señales maternas que indican actividades circadianas al feto durante la gestación son los momentos en los que la madre se alimenta (Weaver y Reppert, 1989), la activación dopaminérgica materna (Grosse y Davis, 1999), que actuaría como señal diurna, y melatonina materna, que sería una señal nocturna (Davis, 1997). Todas estas señales maternas tienen efectos transitorios y se pierden progresivamente durante el desarrollo postnatal (Davis y Mannion, 1988; Grosse y cols., 1996; Grosse y Davis, 1999).

En el presente estudio hemos demostrado que existe inmunopositividad para la melanopsina (principal proteína implicada en la fotorrecepción no formadora de imágenes) desde E15 en la retina de ratón. Cuando analizamos el desarrollo prenatal de las células melanopsina-positivas, hemos detectado que entre E16 y E19 existe un bajo número de células inmunopositivas por retina comparado con el observado durante el periodo postnatal. La gestación de la cepa de ratón C3H +/- varía entre 19 y 21 días, con un pico de nacimiento de los animales del 70% en el día E20 (P0). Cuando analizamos este periodo perinatal, observamos un incremento del número de células que expresan la proteína melanopsina entre E19 y P0. En solo 24 horas se detecta el doble de neuronas inmunopositivas, sin que existiera una influencia de las condiciones ambientales externas que pudieran favorecer dicho incremento. Pero, si el control de los ritmos circadianos en el feto depende exclusivamente de las señales maternas ¿cuál es la razón por la que este sistema no formador de imágenes se desarrolla en un periodo tan temprano? En las especies altriciales, donde las crías son muy inmaduras en el momento del parto, la neurogénesis del SCN se completa en un momento muy cercano al parto, y aunque este ya es funcional desde P0, la inervación por el RHT es completada postnatalmente (Davis y Reppert, 2001). Es posible que el incremento en el

## Discusión

número de células melanopsina-positivas detectado pueda estar implicado en el desarrollo del SCN y otras áreas cerebrales no implicadas en la formación de imágenes en el recién nacido, del mismo modo que conos y bastones afectan al desarrollo del córtex visual (Berardi y cols., 2000). Además, las células que expresan la melanopsina pueden establecer uniones *gap* con células vecinas, por lo que podrían estar también influyendo en el correcto desarrollo del núcleo geniculado (Dacey y cols., 2005). De este modo, estos fotorreceptores de las capas internas de la retina podrían dirigir el desarrollo tanto de la visión no-formadora de imágenes como de la formadora de imágenes durante el desarrollo temprano.

Las RGCs inervan distintas áreas cerebrales dependiendo de su función en la visión formadora de imágenes o en la visión circadiana. El factor de transcripción Brn3a se expresa en todas las RGCs que proyectan hacia las áreas visuales, pero no en aquellas que proyectan hacia el SCN o el núcleo intergeniculado lateral, ambos implicados en la visión no-formadora de imágenes (Quina y cols., 2005). En nuestros experimentos hemos corroborado estas observaciones, las células melanopsínicas no expresan el factor Brn3a durante el desarrollo prenatal. Además, es importante tener en cuenta que en la retina de ratón se puede identificar mRNA de la melanopsina desde E10,5 (Tarttelin y cols., 2003), siendo la expresión de esta opsina coincidente con la diferenciación de las primeras RGCs (E9) (Drager, 1985; Young, 1985). La especialización de las RGCs tempranas viene dada por el factor Brn3b, el cual favorece la diferenciación de estas células mientras que bloquea la diferenciación de las RGCs tardías, células amacrinas, horizontales y demás tipos celulares de la retina (Qiu y cols., 2008). Todos estos datos sugieren que las células melanopsínicas son las primeras en diferenciarse en la retina durante el desarrollo, por lo que nuevamente hemos de plantearnos el posible papel que desempeñan estas células durante el desarrollo en la retina.

### **1.3. Desarrollo postnatal de las células melanopsínicas en la retina albina**

El albinismo es una alteración genética que provoca una falta de pigmentación por ausencia de melanina. Es ampliamente conocido que el precursor de la melanina en el epitelio pigmentario retiniano, L-DOPA, es un factor crítico para el correcto desarrollo de la retina. En el albinismo, cuando la síntesis de melanina falla, se produce hipodesarrollo de la retina central (Jeffery y Kinsella, 1992). Todas las capas celulares se ven afectadas en la retina albina, aunque el efecto más significativo tiene lugar en la ONL donde se observa una disminución del

número de bastones, si bien el de conos no se ve afectado (Jeffery y cols., 1994a). Además, en el albinismo se observan también alteraciones en el quiasma óptico. En los mamíferos, la mayoría de las proyecciones son contralaterales, pero un pequeño porcentaje de RGCs localizadas en la retina temporal proyectan ipsilateralmente. En los albinos todas las proyecciones son contralaterales (Dragüer y cols., 1980), por lo que los patrones de visión espacial se ven alterados.

Cuando analizamos las células melanopsínicas, en la retina albina se produce un incremento del número de células inmunopositivas durante el periodo postnatal temprano. A pesar de este retraso, finalmente se alcanzan valores similares a los detectados en el ratón C3H +/+. Las RGCs son células postmitóticas en el momento del nacimiento, por lo que este incremento en la retina albina podría deberse a un aumento de la expresión de melanopsina en estas células, que no habrían sido detectadas previamente por falta de sensibilidad de la técnica utilizada. También debemos considerar la posibilidad de que exista un aumento de las células postmitóticas que empiezan a expresar esta proteína. Un incremento similar del número de células melanopsínicas durante el periodo postnatal fue detectado en la rata albina Wistar (Fahrenkrug y cols., 2004).

En los animales albinos se ha descrito un retraso en el desarrollo de la retina respecto a la evolución observada en los pigmentados (Ilia y cols., 1996). Este retraso se debe a la mutación de la tirosinasa, enzima limitante en la síntesis de la melanina. Esta enzima es la encargada de la oxidación de la L-tirosina a L-dopaquinona, con L-DOPA como producto intermediario de dicha oxidación. La función de la L-DOPA es la señalización de la salida del ciclo celular, ejerciendo un papel muy importante durante el desarrollo de la retina. Lavado y cols. (2006) demostraron que mediante la expresión ectópica de la tirosinasa en el epitelio pigmentario (resultando en unos niveles normales de L-DOPA durante el desarrollo) se podían corregir las alteraciones retinianas características de los animales albinos. Dados estos resultados, parece que el retraso en el patrón de desarrollo de los animales albinos podría explicar las diferencias detectadas respecto al desarrollo postnatal de las células melanopsínicas entre los dos modelos de ratón estudiados. No obstante, es importante tener en cuenta que el albinismo no es la única diferencia entre las dos cepas estudiadas en nuestro estudio, ya que ambas cepas tienen un fondo genético distinto, por lo que podrían existir otras razones, aparte del albinismo, para explicar estas diferencias.

En el presente trabajo también hemos estudiado el desarrollo postnatal de las células M1 y M2 en los ratones albinos. Todos los estudios previos en albinos habían sido realizados en ratas (Fahrenkrug y cols., 2004; Hannibal y cols., 2005; Hannibal y cols., 2007; Mathes y cols., 2007), las cuales solo poseen una de las dos subpoblaciones celulares melanopsínicas, que se corresponde con las células M1. En el presente trabajo, bajo las condiciones control de LO estudiadas, hemos observado un incremento de las células M1 y M2 durante el desarrollo. Es destacable que, a pesar del retraso existente en los animales albinos, al final del periodo postnatal el porcentaje de ambos subtipos celulares es el mismo que el observado en los ratones pigmentados, mostrándose en ambos casos un mayor número de células M2. Nuestros resultados demuestran la existencia de una oscilación diaria de las células melanopsínicas, por lo que la diferencia de proporción entre las células M2 (más abundantes) y las células M1 en la retina albina podría deberse a la presencia de una variación diaria de ambos subtipos, cuestión que discutiremos más adelante.

## **2. Adaptación funcional de las células melanopsínicas**

### **2.1. Efecto de las condiciones ambientales externas sobre la retina en desarrollo**

Los conos y los bastones, que median la visión formadora de imágenes, son las últimas células que maduran durante el desarrollo de la retina (Olney, 1986; Bibb y cols., 2001; Fei, 2003). La fotosensibilidad de las vías de señalización que implica a estos fotorreceptores no es detectada hasta P10 (Tian y Copenhagen, 2003; Schmidt y cols., 2008), justo antes de la apertura de los ojos (P14). Por el contrario, las células melanopsínicas responden a los estímulos lumínicos desde el desarrollo postnatal temprano (Muñoz-Llamosas y cols., 2000; Lupi y cols., 2006). Dada esta capacidad de respuesta desde el nacimiento, hemos estudiado la influencia de las condiciones ambientales externas sobre las células que expresan la proteína melanopsina en la retina de ratón.

Cuando los ratones pigmentados son sometidos a condiciones de OO desde el nacimiento, se aprecia un incremento en el número de células melanopsina-positivas. Este aumento se detecta ya en el día 1 postnatal, cuando el individuo tan sólo lleva 24 horas en esta situación ambiental. Además, también hemos detectado un incremento en el inmunomarcado de las proyecciones dendríticas de las células melanopsina-positivas, bajo OO las dendritas forman una extensa red que podría tener como fin captar cualquier estímulo lumínico

ambiental. Es llamativa la rápida regulación del número de células que expresan melanopsina por parte de estas condiciones ambientales constantes. En el presente trabajo, hemos demostrado la presencia de células que expresan la melanopsina desde E15, lo que nos lleva a pensar en una posible influencia de la OO durante el desarrollo prenatal de la retina (en nuestro caso las hembras preñadas ya estaban en estas condiciones de iluminación unos días antes del parto). Sin embargo, el mecanismo a través del cual se produce esta regulación al alza del número de células que expresan la melanopsina durante el desarrollo postnatal temprano es desconocido. También ha sido descrito previamente que, durante el desarrollo prenatal, todos los ritmos presentes en el SCN del feto vienen dados por las señales maternas, por lo que es posible que algunas de estas señales influyan sobre las células melanopsínicas del feto. Sorprendentemente, la evolución de las células melanopsínicas no se ve afectada por las condiciones de LL en la cepa C3H. Bajo estas condiciones constantes, no se han observado cambios en el número de células inmunopositivas, mostrando estos animales el mismo patrón de desarrollo que los del grupo control (LO).

Un aumento similar del número de células ganglionares melanopsina-positivas y de la inmunoreactividad de las dendritas fue también observado en los ratones albinos CD1 sometidos a OO. Sin embargo, este incremento es más lento, se detecta a partir del día 5 postnatal. Estos resultados apoyan los datos previos de Hannibal y cols., (2005, 2007), donde se había demostrado que bajo condiciones de OO se producía un incremento de la proteína melanopsina tanto en adulto como en crías. En la cepa CD1 existen, sin embargo, cambios importantes respecto a los C3H +/- cuando se estudian los animales sometidos a LL. En estas condiciones ambientales, en la retina albina, el incremento del número de células inmunopositivas detectado durante el desarrollo postnatal del grupo control LO no existe. Además, bajo LL, el inmunomarcaje de las dendritas es difícilmente detectable, quedando limitado a los somas y los segmentos dendríticos proximales. En la retina albina, la luz parece ejercer un efecto represor sobre las células que expresan melanopsina, disminuyéndose la producción de esta proteína. Resultados similares fueron obtenidos por Hannibal y cols. (2005, 2007) en ratas albinas, donde también se observa una represión por parte de la luz sobre la melanopsina. La diferencia de respuesta entre ratones albinos y pigmentados ante las condiciones de LL podría deberse al albinismo, pero como ya comentamos previamente, este no constituye la única diferencia genética entre ambas cepas.

Cuando analizamos las células M1 y M2, en ambas cepas y condiciones ambientales, se observa un 30% de células M1 y un 70% de células M2 independientemente del número total

## *Discusión*

de células melanopsínicas detectadas, excepto en los animales albinos bajo LL. Este constante porcentaje de ambos tipos celulares nos lleva a pensar que exista algún tipo de control sobre las proporciones de ambas subpoblaciones. Sin embargo, hasta el momento presente no existe ninguna referencia científica respecto a este acontecimiento.

Las diferencias en el número de células inmunopositivas entre LO, LL y OO podrían deberse a las diferencias en la cantidad de proteína por célula que las hace más o menos identificables mediante la técnica utilizada, y en todos los casos sugieren una adaptación funcional a las condiciones ambientales externas. En OO, la expresión de pigmento fotosensible podría aumentar para intentar captar los estímulos lumínicos del medio, mientras que en LL, la disminución del mismo podría ser una respuesta a una sobreestimulación lumínica. Por tanto, la regulación de la expresión de la melanopsina parecer ser muy compleja y podría involucrar tanto mecanismos transcripcionales como traduccionales, así como distintas tasas de degradación, secuestro y liberación de la proteína melanopsina. En trabajos previos se ha descrito una regulación de la melanopsina por parte de las condiciones de LL u OO, tanto en adultos como en crías. Sin embargo, es destacable que estas condiciones ambientales constantes parecen provocar cambios en el mRNA y proteína de la melanopsina en los adultos, mientras que en las crías tan solo se observan cambios a nivel de proteína (Hannibal y cols., 2005; Hannibal y cols., 2007).

Son muchas las evidencias anatómicas acerca de la conectividad de las células ganglionares fotosensibles con células amacrinas y bipolares. Esto nos indica una interacción de las células melanopsínicas con los conos y los bastones, los cuales podrían participar en la adaptación de estas a las condiciones lumínicas ambientales (Belenky y cols., 2003; Østergaard y cols., 2007). Además, Güler y cols. (2008) demostraron que las células melanopsínicas son la principal vía de envío de señales desde los conos y los bastones hasta los centros cerebrales implicados en la visión no formadora de imágenes y, de hecho, la destrucción selectiva de las células melanopsínicas acaba con todas las respuestas circadianas, sin que la visión formadora de imágenes se vea afectada. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que parte de nuestros datos corresponden a muestras tomadas a edades postnatales donde los conos y bastones aún no son funcionales. Hasta la segunda semana postnatal (P11-14) no se detectan respuestas en las células ganglionares procedentes de conos y bastones (Tian y Copenhagen, 2003; Schmidt y

cols., 2008). Es por ello que los cambios observados a estas edades tempranas parecen deberse exclusivamente a la actividad intrínseca de las células melanopsínicas, que tendrían capacidad de responder y adaptarse a las condiciones externas desde el desarrollo postnatal temprano. En todo caso es bien sabido que, en la retina adulta, conos y bastones colaboran con las células melanopsínicas en la fotorrecepción no formadora de imágenes (Panda y cols., 2002; Ruby y cols., 2002). Sakamoto y cols. (2004) demostraron que en la rata adulta RCS, la cual sufre una degeneración retiniana con pérdida de conos y bastones, los niveles de mRNA y proteína de la melanopsina son prácticamente indetectables. Por el contrario, son varios los estudios donde se demuestra que la pérdida de los fotorreceptores externos no afecta a la expresión de la melanopsina (Semo y cols., 2003; Vugler y cols., 2007; Vugler y cols., 2008) y, de hecho, en los ratones knock out para la melanopsina (*Opn4<sup>-/-</sup>*), los conos y bastones son los responsables de la sincronización, aunque la respuesta observada está atenuada (Lucas y cols., 2003; Panda y cols., 2002; Ruby y cols., 2002; Mrosovsky y Hattar, 2003).

## **2.2. Recuperación de la melanopsina en las células ganglionares fotosensibles**

En nuestros resultados hemos demostrado que el número de células melanopsínicas, disminuido en los animales albinos por las condiciones de LL, muestra una recuperación tras el restablecimiento de las condiciones de LO. Este bajo número de células inmunopositivas detectado en LL parece deberse a una inhibición del sistema melanopsínico durante el desarrollo temprano. Es posible que tenga lugar una disminución de la proteína melanopsina por célula, bien por una degradación de la proteína dependiente de la luz o por una regulación a la baja de la transcripción y/o traducción, también dependiente de la luz. Resultados similares fueron obtenidos por Hannibal y cols. (2005, 2007) en ratas Wistar. Es importante indicar que nuestros datos proceden de muestras tomadas lo largo del desarrollo postnatal temprano, cuando conos y bastones aún no son funcionales, por lo que dicha recuperación se debe a una respuesta intrínseca de las células melanopsínicas de la retina. Sin embargo, este proceso de recuperación es más rápido cuando los conos y los bastones ya son funcionales (comienzan a funcionar en P11), reforzando así la idea de que existe una interacción funcional entre las células melanopsínicas y conos/bastones.

Durante esta recuperación es importante tener en cuenta la duración de los ciclos de LO a los que son sometidos los animales. Tan solo tres días después de la aplicación LO ya se observa un incremento significativo del número de células inmunopositivas. Sin embargo, son

## *Discusión*

necesarias cuatro semanas para observar una recuperación completa. Tras este periodo, los animales del grupo LL+LO muestran valores similares a los detectados en los animales control (mantenidos desde el nacimiento en LO) tanto en el número de células melanopsina-positivas, como en la proporción entre M1 y M2. Se puede afirmar, por tanto, que los efectos de la LL durante el desarrollo pueden ser revertidos si los animales se someten a condiciones LO. No obstante, hay que tener en cuenta que esta recuperación fue únicamente estudiada en las células que expresan el fotorpigmento melanopsina en la retina, por lo que no conocemos los efectos que la LL pueda tener sobre el resto del sistema circadiano. De hecho, Canal-Corretger y cols. (2001) observaron que los ratones albinos mantenidos en LL durante los primeros días del desarrollo postnatal mostraba un funcionamiento normal de SCN, pero manifestaban una disminución significativa de la sensibilidad fótica visual. Es decir, las condiciones de LL durante el desarrollo postnatal afectan a la percepción visual del ratón albino.

Con el fin de analizar el efecto de la LL sobre una retina parcialmente desarrollada, los animales albinos fueron sometidos a OO y, a continuación, fueron mantenidos bajo LL. Sorprendentemente, la esperada disminución en el número de células inmunopositivas no fue observada. Aunque sí se detectó una disminución del inmunomarcaje, hasta tal punto en que solo los somas eran identificables. Un experimento similar fue desarrollado en ratones albinos adultos obteniendo similares resultados, a pesar de que se observó una disminución del inmunomarcaje, no se apreció una disminución significativa en el número de somas inmunopositivas. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que en ambos experimentos se detectó una disminución cualitativa de la intensidad de marcaje, lo que podría reflejarse en los resultados previos de Hannibal y cols. (2005) y Mathes y cols. (2007), donde se observaba una disminución del mRNA y proteína total de la melanopsina. De cualquier modo, los efectos de la LL parecen ser más acusados en una retina inmadura que cuando la retina esta parcial o totalmente desarrollada.

Los ratones albinos mantenidos en LL muestran una menor cantidad de células inmunopositivas comparado con los valores detectados en animales sometidos a LO/OO. Esto sugiere que la oscuridad podría ser necesaria para el correcto desarrollo de las células que expresan el fotorpigmento melanopsina. Además, tras la exposición a LO se produce una recuperación de las células melanopsínicas previamente inhibidas por LL, lo que indica que los periodos de oscuridad son los responsables de dicha recuperación. Datos similares fueron obtenidos por Hannibal y cols. (2005) en ratas Wistar adultas, en las que tras la inhibición de la



melanopsina por LL, se observó una rápida recuperación cuando se mantenían los animales bajo condiciones de OO. Por tanto, los periodos de oscuridad, o más bien, la secuencia de los periodos de luz y oscuridad que tienen lugar bajo condiciones de LO, podrían ser necesarios para el correcto desarrollo de estas células en los animales albinos. Por el contrario, en los animales pigmentados, la LL podría no tener efectos negativos durante el periodo postnatal temprano debido a que el sistema melanopsínico de esta cepa es más maduro en el momento del nacimiento.

### **3. Oscilación diaria de las células ganglionares fotosensibles de la retina**

#### **3.1. Variación diaria de las células melanopsínicas en la retina pigmentada**

Además de las fluctuaciones cíclicas ambientales, los ritmos están presentes en organismos, órganos y células. Algunas de estas oscilaciones continúan incluso en ausencia de las señales ambientales, constituyendo así un mecanismo por el cual los organismos están preparados para los cambios predecibles del medio ambiente. Estos osciladores autónomos son considerados relojes biológicos. Otros órganos y células también muestran oscilaciones diarias que, o bien vienen dadas por los osciladores primarios autónomos, o son simplemente una respuesta a las fluctuaciones ambientales.

El reloj circadiano de la retina fue el primer oscilador detectado fuera del SCN en mamíferos (Tosini y Menaker, 1996). El oscilador endógeno de la retina constituye una red organizada, la cual controla muchos de los ritmos fisiológicos, celulares y moleculares presentes en la retina (Tosini y cols., 2008), pero no se conoce exactamente la naturaleza de las células que forman este reloj. Por ejemplo, conos y bastones, que liberan melatonina durante la noche, y una subpoblación de células amacrinas/interplexiformes que liberan dopamina durante el día, parecen formar parte del mecanismo celular que regula la fisiología circadiana de la retina (Green y Besharse, 2004). Barnard y cols. (2006) demostraron que las diferencias detectadas en la respuesta electrorretinográfica de los conos durante el ciclo diario de LO se debía a la influencia de las células melanopsínicas, lo que sugiere que estas células están implicadas de algún modo en las oscilaciones circadianas de la retina. Pero, el papel que las células melanopsínicas puedan desempeñar dentro de la maquinaria del reloj retiniano es aún desconocido.

## *Discusión*

El ratón pigmentado C3H, al contrario que otras cepas de ratón, posee unos ritmos robustos de melatonina en la retina, que se mantienen incluso varios días bajo condiciones de OO (Tosini y Menaker, 1998). Este ritmo de melatonina es un excelente indicativo de que el reloj de la retina funciona correctamente, haciendo de esta cepa un buen modelo experimental para el estudio de las oscilaciones presentes en la misma. Cuando analizamos el número de células inmunopositivas para la melanopsina observamos la presencia de una variación a lo largo del ciclo LO, con un máximo de células melanopsina-positivas al final del periodo de oscuridad (ZT23) y un mínimo en las primeras horas tras el encendido de la luz (ZT3). Estos datos sugieren que algunas células melanopsínicas parecen “apagarse” y “encenderse” durante el ciclo de LO, aunque las consecuencias funcionales de esta variación son aún desconocidas. Por otro lado, nuestros resultados pueden explicar las diferencias cuantitativas acerca del número de células melanopsínicas existentes en estudios previos (Hatori y cols., 2008; Hattar y cols., 2006; Baver y cols., 2008). Asimismo, estos datos también podrían explicar por qué se detectaron en algunos casos células no-melanopsínicas que proyectaban al SCN (Gooley y cols., 2001; Gooley y cols., 2003; Sollars y cols., 2003). Dichas células, que aparentemente no expresaban la melanopsina, podrían proceder de muestras de retina tomadas a determinadas horas en las que la cantidad de proteína es lo suficientemente baja para ser detectada (células “apagadas”). Aún así, hay que tener presente que estas células “apagadas” pueden transmitir al cerebro las señales provenientes de conos y bastones. Una oscilación diaria de la proteína melanopsina ya había sido detectada en la retina de rata (Hannibal y cols., 2007; Sakamoto y cols., 2004; Hannibal y cols., 2005; Mathes y cols., 2007). Sin embargo, en estos estudios los niveles máximos de RNA y proteína melanopsina en la rata se detectan en la transición de la fase lumínica a la de oscuridad. Estos resultados no concuerdan con los nuestros, ya que en nuestro caso tan solo hemos observado una variación a nivel de proteína (pero no de mRNA) y el pico de esta se observó en la transición de la noche al día. No obstante, debemos tener en cuenta que se trata de dos especies distintas que podrían tener distinta fisiología. Asimismo, es necesario también mencionar que los niveles totales de proteína detectados por western-blot en los estudios mencionados no tienen por qué ser enteramente paralelos al número de células inmunopositivas observadas.

En nuestro estudio también hemos analizado la oscilación diaria de las subpoblaciones M1 y M2 en la retina del ratón pigmentado C3H. Hasta el momento, todos los estudios realizados acerca de la variación diaria de la melanopsina en la retina habían sido desarrollados en ratas (Sakamoto y cols., 2004; Hannibal y cols., 2005; Hannibal y cols., 2007; Mathes y cols., 2007), las cuales tan solo poseen un subtipo celular que se corresponde con las

células M1 (proyecciones dendríticas en las sublámina OFF) y, de hecho, anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de la melanopsina de rata marcan específicamente las células M1 en el ratón (Baver y cols., 2008). Al estudiar por separado las dos subpoblaciones más importantes de células melanopsínicas, detectamos que ambos subtipos celulares alcanzan sus valores máximo (ZT23) y mínimo (ZT3) en el mismo momento del ciclo de LO. Sin embargo, ambas subpoblaciones no se comportan de igual manera, la proporción entre las células M1 y M2 varía a lo largo del ciclo diario. Estas diferencias podrían deberse a que ambos subtipos celulares poseen distintos papeles funcionales, dado que ambos poseen diferente estratificación dendrítica y fisiología, así como distintas proyecciones hacia el sistema nervioso central. Las diferencias observadas en otros estudios previos (Schmidt y cols., 2008; Viney y cols., 2007) en cuanto a la proporción entre células M1 y M2 también podrían deberse a la oscilación diaria presente en condiciones de LO. Es decir, dependiendo del momento del ciclo LO en el que las muestras hubieran sido tomadas, la proporción entre las dos subpoblaciones podría ser diferente.

### **3.2. Oscilación diaria de las células melanopsínicas durante el desarrollo postnatal**

La variación más brusca en el número de células melanopsina-positivas durante el ciclo LO es detectada en la transición entre la fase de oscuridad y la lumínica. Estos dos puntos horarios fueron también analizados durante el desarrollo postnatal temprano (P1, P5). Tan solo en el día P5 se detectaron diferencias, lo que sugiere que esta oscilación diaria de las células melanopsínicas se desarrolla gradualmente durante el periodo postnatal.

Las células M1 y M2 fueron analizadas en P5 y, sorprendentemente, tan solo las células M1 mostraban una oscilación diaria entre los dos puntos analizados, lo que nos indica que las células M1 podrían madurar antes que las células M2, un hecho que también podría estar relacionado con sus distintos papeles funcionales y dianas cerebrales. Hannibal y cols. (2005) demostraron la existencia de un ritmo de la proteína melanopsina en P5 en la rata albina Wistar, una oscilación durante el desarrollo postnatal temprano que podría corresponderse con la detectada para las células M1 en la retina de ratón en la misma edad postnatal. Se ha descrito que las células M1 son más susceptibles a los estímulos procedente de conos y bastones que las células M2 (Schmidt y cols., 2008). Sin embargo, la oscilación de las células M1 detectada durante el desarrollo postnatal refleja únicamente la respuesta intrínseca de las mismas, ya que a esta edad conos y bastones aún no son funcionales. Por el contrario, la

oscilación de las células M2 fue únicamente detectada en adultos. Dado que este subtipo celular tiene una menor cantidad de fotopigmento que las células M1 (Schmidt y cols., 2008), es posible que el establecimiento de la variación diaria de las células M2 dependa de la señal procedente de otras células retinianas, aun inmaduras en las edades analizadas en nuestro estudio.

Finalmente, hemos de realizar una última mención acerca del desarrollo del sistema melanopsínico en la retina del ratón pigmentado. Inicialmente, hemos descrito que el número total de células melanopsínicas no varía sustancialmente desde el nacimiento. Sin embargo, tras el estudio de la oscilación diaria de estas células fotosensibles, se ha de matizar tal afirmación, ya que durante el desarrollo postnatal temprano sí se produce un aumento de células inmunopositivas que es coincidente con el establecimiento de la oscilación diaria de las células melanopsínicas entre P1 y P5. Como ya se ha discutido en otro capítulo, lo que en ningún caso ocurre es una disminución del número de células melanopsínicas durante el periodo postnatal. Las RGCs son postmitóticas en el momento del nacimiento, por lo que este incremento se tiene que deber a un aumento de las células que comienzan a expresar la melanopsina de *novo* o bien puede producirse un incremento de la expresión de melanopsina por célula, haciéndola detectable por la técnica utilizada para su estudio.

### **3.3. Efecto de la OO sobre la oscilación diaria de las células melanopsínicas**

En el ratón C3H, bajo condiciones de LO, se detectó una oscilación del número de células que expresaban la proteína melanopsina. Con el fin de conocer si dicha oscilación en el número de células inmunopositivas es endógena o si es tan solo una respuesta a las condiciones ambientales externas, se estudiaron animales adultos que fueron sometidos a seis ciclos de OO. Tras este tratamiento desapareció la oscilación en el número total de células inmunopositivas, lo que sugiere que este ritmo diario no es endógeno. Las células M1 y M2 también fueron analizadas por separado tras el periodo de OO y, contrariamente a lo observado bajo LO, se detecta una proporción estable de ambos subtipos celulares. Esta proporción se mantiene constante durante todo el periodo subjetivo, con la excepción de las células M2, que muestran un pequeño, pero significativo, descenso al final de la noche subjetiva.

Desde el descubrimiento de la melanopsina, son varios los estudios que han analizado la oscilación endógena de este fotopigmento en la retina bajo condiciones de iluminación constantes (Sakamoto y cols., 2005; Mathes y cols., 2007), y aún hoy en día existe una elevada controversia al respecto. Sakamoto y cols. (2005) observaron que la oscilación diaria del mRNA de la melanopsina se veía atenuada tras dos ciclos de OO, pero no desaparecía completamente. Por el contrario, Mathes y cols. (2007) demostraron en una cepa distinta de rata que la oscilación diaria del mRNA de la melanopsina desaparece tras someter a los animales a LL u OO, sugiriendo así que la regulación del gen de la melanopsina no depende de un oscilador circadiano, si no que es dependiente de las condiciones del ciclo LO.

En nuestros datos, observamos que las células M2 muestran una pequeña fluctuación bajo condiciones de OO, de modo que si existe un ritmo circadiano de las células melanopsínicas en la retina de ratón, este podría ir desapareciendo gradualmente tras varios días en condiciones constantes. Sin embargo, tras someter a ratones adultos a tres ciclos de OO ya no se observa la oscilación en el número total de células melanopsina-positivas. La pregunta sobre si el ritmo es endógeno o dependiente de las condiciones ambientales sigue sin tener una respuesta clara, ya que el ritmo podría estar lo suficientemente atenuado para no detectarse con el método utilizado. Se necesita, por tanto, otro diseño experimental que permita dilucidar esta cuestión.

#### **3.4. Oscilación diaria de las células melanopsínicas en la retina albina**

La oscilación diaria de las células melanopsínicas fue también analizada en la retina del ratón albino CD1. Sorprendentemente, al estudiar el número total de células que expresan este fotopigmento en nuestro modelo albino no se detectan las variaciones esperadas, es decir, el número de células inmunopositivas permanece constante a lo largo del ciclo LO. No obstante, cuando las células M1 y M2 son analizadas, sí se detecta una oscilación diaria de ambos subtipos celulares. Hay que mencionar que las células M1 y M2 muestran un comportamiento opuesto, al menos, en una parte del periodo de 24 horas. Cuando se produce una disminución de las células M1, las células M2 muestran un incremento, siendo esta la razón por la cual al analizar el número total de células inmunopositivas no se detectaba ningún cambio. En ratas albinas se ha detectado previamente un ritmo de la proteína melanopsina con un máximo al comienzo de la fase de oscuridad (Hannibal y cols., 2005). Si tan solo tenemos en cuenta las células M1, las cuales se corresponden con las células melanopsínicas de rata, observamos un comportamiento similar en ambos modelos. Tanto en la rata, donde se

ha analizado la cantidad de proteína mediante western-blot, como en el ratón, donde se estudió el número de células inmunopositivas, se detecta un incremento en la transición de la fase lumínica a la de oscuridad. Pero, mientras que el número de células M1 en ratón permanece constante durante la fase oscura y disminuye tras el encendido de la luz, en la rata se observó una disminución progresiva de la proteína total. Previamente se mencionó que no tiene por qué existir una correlación exacta entre número de células inmunopositivas y cantidad total de proteína. Quizás, esta sea la razón de esas diferencias detectadas entre ambos estudios. Por otro lado, también debe considerarse la posibilidad de diferencias entre los distintos modelos utilizados.

Durante el estudio del desarrollo postnatal del sistema melanopsínico habíamos observado que a pesar del retraso detectado en los animales albinos, al final del periodo postnatal, en el punto horario analizado ambas cepas de ratón mostraban valores similares de células inmunopositivas. Sin embargo, tras analizar las oscilaciones diarias hemos observado que el número de células melanopsínicas durante el ciclo de LO es mayor en los animales pigmentados que en los albinos. Estas diferencias podrían deberse al albinismo pero, nuevamente, hemos de tener en cuenta que el albinismo no es solo la única diferencia entre estos dos modelos de ratón. De hecho, una de las razones por las que la cepa C3H fue utilizada para este estudio es que muestran unos niveles normales de melatonina en la retina (Goto y cols., 1989). Por el contrario, los ratones albinos CD1 son deficientes para la expresión de la melatonina, por lo que esto podría provocar esas diferencias en el ritmo diario de las células melanopsínicas.

### **3.5. Oscilación del mRNA de la melanopsina en la retina**

La variación observada en la retina del ratón pigmentado durante el ciclo de LO puede ser a nivel transcripcional o postranscripcional. Por ello, se realizó un estudio del mRNA de la melanopsina. De las dos isoformas existentes de la melanopsina, L y S, la L se encuentra en ambos subtipos celulares, mientras que la S se localiza exclusivamente en las células M1 (Pires y cols., 2009). Sorprendentemente, no se detectó un ritmo diario del mRNA de la melanopsina en la retina pigmentada, lo que nos indica que la variación observada bajo LO se debe producir solamente a nivel de proteína. Es posible, que tras el encendido de la luz, exista una degradación de la proteína o una inactivación de la misma. Asimismo, durante la fase de oscuridad podría incrementarse el número de células melanopsina-positivas al no ser esta proteína degradada o inactivada.

Es importante mencionar que la expresión de la isoforma S es aproximadamente 7 veces mayor que la de la isoforma L en todos los puntos analizados, unos datos que concuerdan con los descritos previamente por Pires y cols. (2009). En las células M1 se expresan ambas isoformas de la melanopsina, lo que explicaría el mayor inmunomarcaje detectado en las células M1. Consistente con esta elevada expresión de melanopsina en las células M1, es la mayor sensibilidad de estas células a los estímulos lumínicos aplicados (Schmidt y cols., 2008). Además, este subtipo posee una resistencia menor a inputs procedentes de la retina externa, es decir, son más influenciados por las señales de conos y bastones que las células M2 (Schmidt y cols., 2008). Todo esto provocaría una respuesta mayor de las células M1. Las células melanopsínicas se despolarizan únicamente cuando se aplica un estímulo lumínico (Viney y cols., 2005; Wong y cols., 2007), si la respuesta celular al mismo provocase una degradación o cambio conformacional de la melanopsina, estos datos podrían explicar la disminución más acusada del número de células M1 tras el comienzo de la fase lumínica.

El estudio del mRNA de la melanopsina también fue realizado en la retina albina y de nuevo observamos diferencias que son, por ahora, difíciles de explicar. Mientras el número total de células no varía en el ciclo de LO, sí que se detecta un ritmo del mRNA total con un pico de expresión en la transición de la fase lumínica a la de oscuridad. Un ritmo similar fue también observado en muestras de rata albina (Sakamoto y cols., 2004; Hannibal y cols., 2005; Mathes y cols., 2007). Sin embargo, el mRNA de las isoformas L y S no muestra oscilación diaria. No obstante, dadas las diferentes eficiencias de los cebadores utilizados para el estudio de las isoformas y la melanopsina total, los resultados obtenidos no pueden ser comparados. Todos estos datos sugieren que se necesita un estudio multidisciplinar exhaustivo para comprender el complejo comportamiento del sistema melanopsínico en la retina, especialmente en los animales albinos.

Previamente, habíamos descrito que el número total de células melanopsínicas es mayor en los ratones C3H que en los albinos CD1. Al comparar la expresión relativa del mRNA en ambas cepas, obtenemos resultados similares, la expresión de la melanopsina es significativamente mayor en los ratones pigmentados que en los albinos. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la importancia fisiológica de estas diferencias.

### 3.6. Análisis de otros genes rítmicos de la retina

En nuestro estudio hemos observado grandes diferencias entre los ratones pigmentados y los albinos respecto a la melanopsina. Con el fin de analizar otras posibles similitudes y diferencias de expresión entre ambas cepas de ratón se llevó a cabo un estudio complementario de otros genes de la retina.

El primero de los genes analizados fue el gen de expresión temprana c-Fos. Previamente se había descrito una inducción de la proteína c-Fos en las células de la INL y GCL tras el comienzo de la fase lumínica (Huerta y cols., 1999; Lupi y cols., 1999). Por el contrario, tal y como hemos descrito en ambas cepas de ratón, el mRNA de c-Fos muestra una oscilación diaria con un pico máximo de expresión al comienzo de la fase de oscuridad, datos que corroboran los resultados previos de Semo y cols., (2003) y Humphries y Carter (2004). La expresión de este gen está asociada a la despolarización de las neuronas (Hoffman y Lyo, 2002). Los conos y bastones de vertebrados se hiperpolarizan durante la fase lumínica y se despolarizan en oscuridad. De este modo, en la ONL existe una expresión muy baja durante la luz pero muy elevada durante la fase oscura (Nir y Agarwal, 1993; Yoshida y cols., 1993). Se ha sugerido que la expresión rítmica de c-Fos podría estar relacionada con la regulación rítmica de genes de fototransducción (Tosini y Fukuhara, 2002), incluidas opsinas (Bowes y cols., 1988). Sin embargo, hasta el momento no existe ninguna evidencia que apoye esta idea.

Además, en este estudio hemos definido el patrón de expresión del gen reloj Per2 en la retina pigmentada y albina mediante RT-PCR. En los ratones C3H hemos observado una oscilación diaria de este gen reloj en la retina con un pico de expresión al comienzo de la fase oscura, mientras que en la retina albina no se detecta ninguna oscilación durante el ciclo LO. Un ritmo similar de la expresión de Per2 en la retina de ratón fue descrito por Ruan y cols. (2006). No obstante, hemos de tener en cuenta que en estos estudios se utilizaron cepas de ratón con una expresión de melatonina normal (al igual que en la cepa C3H utilizada en este estudio), lo que podría influir en la presencia de esta oscilación diaria, y explicar por qué en los ratones albinos, que son deficientes para la melatonina, no se aprecia tal oscilación. De este modo, podríamos pensar que las alteraciones de los ritmos presentes en la cepa albina podrían deberse a una deficiencia de melatonina. Sin embargo, cuando analizamos mediante RT-PCR el ritmo diario de la opsina de bastones hemos detectado en la retina albina una oscilación diaria con un máximo de expresión al comienzo de la fase de oscuridad, lo cual coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Bowes y cols., 1988; von Schantz y cols., 1999). Sorprendentemente, en la cepa pigmentada C3H no hemos observado tal oscilación diaria, a



pesar de que en esta misma cepa de ratón fue descrito con anterioridad un ritmo endógeno de la rodopsina (von Schantz y cols., 1999).

Dados los resultados obtenidos en estos experimentos, no podemos concluir que el albinismo o la deficiencia de melatonina en los ratones CD1 sea la causante de las diferencias observadas entre las retinas pigmentada y albina. Por ello, debemos tener en cuenta que las dos cepas de ratón estudiadas en la presente tesis parecen ser muy diferentes entre sí a nivel de fisiología de la retina, y si bien todas estas diferencias podrían deberse al albinismo que caracteriza a los ratones CD1, debemos tener en cuenta que el fondo genético de ambas cepas de ratón es diferente.

Con la presente tesis doctoral hemos intentado profundizar en el desarrollo de las células melanopsínicas. Hemos demostrado que las células ganglionares que expresan este fotopigmento no parecen estar sujetas a la muerte celular que afecta a las neuronas durante el desarrollo postnatal. Además, hemos analizado la influencia de las condiciones lumínicas sobre la retina en desarrollo, observando grandes diferencias en la respuesta a las condiciones ambientales en la retina pigmentada y albina. Finalmente, hemos analizado la oscilación diaria de las células melanopsínicas en ambas cepas de ratón, encontrando nuevamente grandes diferencias entre los ratones albinos y los pigmentados.

Sin embargo, al concluir esta disertación que trataba de resolver algunas de las incógnitas que existían en torno a las células melanopsínicas, se nos plantean algunas otras. Entre ellas está el porqué de un desarrollo tan temprano del sistema melanopsínico, y cuáles serán las funciones de este tanto en la retina como en el cerebro en el periodo prenatal y postnatal. Además, seguimos sin conocer si es el albinismo el causante de las diferencias existentes entre las dos cepas estudiadas en este trabajo. Dado que existen albinos recuperados tras la expresión exógena de la enzima tirosinasa en el epitelio pigmentario (Lavado y cols., 2006), sería interesante estudiar el desarrollo postnatal y la influencia de las condiciones lumínicas sobre esta retina recuperada. Otra de las cuestiones que queda pendiente es si la oscilación diaria de las células que expresan melanopsina es circadiana o si es dependiente de las condiciones externas. Estos experimentos arrojarían luz sobre distintos aspectos del desarrollo y funcionalidad de las células que expresan melanopsina en los mamíferos. Éstos y otros objetivos son los que se perseguirán alcanzar en un futuro próximo en nuestro laboratorio.



# ***Conclusions***



1. No loss of melanopsin cells occurs during post-natal development in the pigmented C3H mice. If neurotrophic selection occurs for the melanopsin-expressing RGCs, it should take place earlier than for other populations of RGCs. The establishment of this non-image forming vision seems to take place during the perinatal period, without the influence of the ambient light conditions.
2. The development of the melanopsin-cell system of albino CD1 mice is delayed with regard to that of pigmented C3H +/+ mice.
3. The melanopsin-expressing RGCs are capable to adapt their responsiveness to ambient lighting conditions even in the absence of the classical photoreceptors (as it occurs in the early postnatal period), likely via their inherent photosensitivity.
4. Continuous light does not provoke irreversible changes on the albino retina during the postnatal period. The decrease in number of melanopsin-expressing cells induced by LL can be restored by simply reestablishing the standard LD conditions, even when rods and cones are not yet functional. However, this recovery is somewhat faster when rod/cone photoreceptors are fully developed. Our results reinforce the idea that rod/cone and melanopsin-cell systems interact actively.
5. Periods of darkness or more likely the sequence of light and dark periods occurring under the daily cycles might be necessary for the normal development of the melanopsin system in the albino retina.
6. The number of melanopsin-expressing cells shows a daily oscillation in the pigmented retina which is dependent on LD cycles and gradually develops within the early postnatal period. In albino mice, these cells also show a daily oscillation, but the pattern differs significantly from that observed in pigmented retina.

## *Conclusions*

7. The regulation of melanopsin expression by light/dark cycles occurs at the post-transcriptional level in the pigmented retina.

# ***Bibliografía***





- **Abrahamson EE, Moore RY** (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916, 172–191.
- **Altimus CM, Güler AD, Villa KL, McNeill DS, Legates TA, Hattar S** (2008) Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19998-20003.
- **Arendt D** (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47, 563–571.
- **Barnard AR, Hattar S, Hankins MW, Lucas RJ** (2006) Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr Biol* 16, 389–395.
- **Baver SB, Pickard GE, Sollars PJ, Pickard GE** (2008) Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci* 27, 1763-1770.
- **Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE** (2003) Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol* 460, 380-393.
- **Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Cameron MA, Tarttelin EE, Iuvone PM, Hankins MW, Tosini G, Lucas RJ** (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol* 4, e254.
- **Bellingham J, Foster RG** (2002) Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res* 309, 57–71.
- **Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L** (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10, 138-145.
- **Berson DM, Castrucci AM, Provencio I** (2010) Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol* 518, 2405-2422.
- **Berson DM, Dunn FA, Takao M** (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.
- **Bibb LC, Holt JK, Tarttelin EE, Hodges MD, Gregory-Evans K, Rutherford A, Lucas RJ, Sowden JC, Gregory-Evans CY** (2001) Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet* 10, 1571–1579.
- **Bowes C, van Veen T, Farber DB** (1988) Opsin, G-protein and 48- kDa protein in normal and rd mouse retinas: developmental expression of mRNAs and proteins and light/dark cycling of mRNAs. *Exp Eye Res* 47, 369–390.
- **Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD** (2001) Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci* 21, 6405–6412.
- **Cameron MA, Pozdeyev N, Vugler AA, Cooper H, Iuvone PM, Lucas RJ** (2009) Light regulation of retinal dopamine that is independent of melanopsin phototransduction. *Eur J Neurosci* 29, 761–767.
- **Canal-Corretger MM, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A** (2001) Effect of light on the development of the circadian rhythm of motor activity in the mouse. *Chronobiol Int* 18, 683-696.
- **Clarke RJ, Ikeda H** (1985) Luminance and darkness detectors in the olivary and posterior pretectal nuclei and their relationship to the pupillary light reflex in the rat. I. Studies with steady luminance levels. *Exp Brain Res* 57, 224–232.
- **Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF** (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* 332, 6–11.
- **Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD** (2005) Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 433, 749–754.
- **Davis FC** (1997) Melatonin: role in development. *J Biol Rhythms* 12, 498-508.

- **Davis FC, Mannion J** (1988) Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *Am J Physiol* 255, 439-448.
- **Davis FC, Reppert SM** (2001) Development of mammalian circadian rhythms. *Handbook of Behavioral Neurobiology. Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 12, 247–290.
- **Dkhissi-Benyahya O, Rieux C, Hut RA, Cooper HM** (2006) Immunohistochemical evidence of a melanopsin cone in human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 1636-1641.
- **Dräger UC** (1985) Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 224, 57-77.
- **Drager UC, Olsen JF** (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191, 383–412.
- **Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen SK, LeGates T, Renna JM, Prusky GT, Berson DM, Hattar S** (2010) Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49-60.
- **El-Hennamy R, Mateju K, Bendová Z, Sosniyenko S, Sumová A** (2008) Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 23, 435-444.
- **Fahrenkrug J, Nielsen HS, Hannibal J** (2004) Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport* 15, 781–784.
- **Fei Y** (2003) Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis* 9, 31–42.
- **Foster RG, Argamaso S, Coleman S, Colwell CS, Lederman A, Provencio I** (1993) Photoreceptors regulating circadian behavior: a mouse model. *J Biol Rhythms* 8, 17–23.
- **Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, DeGrip WJ, Menaker M** (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (*rd/rd*). *J Comp Physiol A* 169, 39–50.
- **Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray ZK, Foster RG** (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 502–504.
- **Fu Y, Zhong H, Wang MH, Luo DG, Liao HW, Maeda H, Hattar S, Frishman LJ, Yau KW** (2005) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10339–10344.
- **Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB** (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 12, 1165.
- **Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB** (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 23, 7093–7106.
- **Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S** (1989) Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res* 7, 195-204.
- **Goz D, Studholme K, Lappi DA, Rollag MD, Provencio I, Morin LP** (2008) Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS ONE* 3, e3153.
- **Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, Berson DM** (2008) Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade. *J Neurophysiol* 99, 2522–2532.
- **Green CB, Besharse JC** (2004) Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms* 19, 91-102.
- **Grosse J, Davis FC** (1999) Transient entrainment of a circadian pacemaker during development by dopaminergic activation in Syrian hamsters. *Brain Res* 48, 185-194.
- **Grosse J, Velickovic A, Davis FC** (1996) Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Am J Physiol* 270, 533-540.

- **Güler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao HW, Barnard AR, Cahill H, Badea TC, Zhao H, Hankins MW, Berson DM, Lucas RJ, Yau KW, Hattar S** (2008) Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102-105.
- **Hankins MW, Lucas RJ** (2002) The primary visual pathway in humans is regulated according to long-term light exposure through the action of a non-classical photopigment. *Curr Biol* 12, 191–198.
- **Hankins MW, Peirson SN, Foster RG** (2008) Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci* 31, 27-36.
- **Hannibal J, Ding JM, Chen D, Gillette MU, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Mikkelsen JD** (1997) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract. A daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17, 2637–2644.
- **Hannibal J, Fahrenkrug J** (2004a) Target areas innervated by PACAP immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res* 316, 99–113.
- **Hannibal J, Fahrenkrug J.** (2004b) Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 15, 2317–2320.
- **Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J** (2007) Melanopsin changes in neonatal albino rat independent of rods and cones. *Neuroreport* 18, 81-85.
- **Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J** (2005) Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* 27, 147-155.
- **Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J** (2002) The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 22, 191.
- **Hannibal J, Hindersson P, Ostergaard J, Georg B, Heegaard S, Larsen PJ, Fahrenkrug J** (2004c) Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4202–4209.
- **Hannibal J, Moller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J** (2000) PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 418, 147–155.
- **Hannibal J, Vrang N, Card JP, Fahrenkrug J** (2001) Light-dependent induction of c-Fos during subjective day and night in PACAP containing retinal ganglion cells of the retino-hypothalamic tract. *J Biol Rhythms* 16, 457–470.
- **Harrington ME** (1997) The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 705–727.
- **Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Buch T, Waisman A, Schmedt C, Jegla T, Panda S** (2008) Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One* 3, e2451.
- **Hatori M, Panda S** (2010) The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med*, 16, 435-446.
- **Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM** (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497, 326–349.
- **Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW** (2002) Melanopsin- containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- **Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW** (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 75–81.
- **Hoffman GE, Lyo D** (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 14, 259-268.
- **Hoshi H, Liu WL, Massey SC, Mills SL** (2009) ON inputs to the OFF layer: bipolar cells that break the stratification rules of the retina. *J Neurosci* 29, 8875–8883.

- **Huerta JJ, Llamosas MM, Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM** (1999) Spatio-temporal analysis of light-induced Fos expression in the retina of rd mutant mice. *Brain Res* 834, 122-127.
- **Humphries A, Carter DA** (2004) Circadian dependency of nocturnal immediate-early protein induction in rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 551-556.
- **Iliá M, Jeffery G** (1996) Delayed neurogenesis in the albino retina: evidence of a role for melanin in regulating the pace of cell generation. *Brain Res Dev Brain Res* 95, 176-83.
- **Isoldi MC, Rollag MD, Castrucci AM, Provencio I** (2005) Rhabdomic phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1217-1221.
- **Jeffery G, Darling K, Whitmore AV** (1994a) Melanin and the regulation of mammalian photoreceptor topography. *Eur J Neurosci* 6, 657-667.
- **Jeffery G, Kinsella B** (1992) Translaminar deficits in the retinae of albinos. *J Comp Neurol* 326, 637-644.
- **Johnson J, Wu V, Donovan M, Majumdar S, Rentería RC, Porco T, Van Gelder RN, Copenhagen DR** (2010) Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 17374-17378.
- **Kandel GL, Bedell HE, Walker R, Wolf BM** (1987) Negative phototaxis in pigmented, albinotic and RCS rat pups measured with a new technique. *Vision Sci* 1, 357-366.
- **Klerman EB, Shanahan TL, Brotman DJ, Rimmer DW, Emens JS, Rizzo JF, Czeisler CA** (2002) Photic resetting of the human circadian pacemaker in the absence of conscious vision. *J Biol Rhythms* 17, 548-555.
- **Koyanagi M, Kubokawa K, Tsukamoto H, Shichida Y, Terakita A** (2005) Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Curr Biol* 15, 1065-1069.
- **Koyanagi M, Takano K, Tsukamoto H, Ohtsu K, Tokunaga F, Terakita A** (2008) Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 15576-15580.
- **Kriegsfeld LJ, Leak RK, Yackulic CB, LeSauter J, Silver R** (2004) Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis. *J Comp Neurol* 468, 361-379.
- **Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L** (2006) Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem* 96, 1201-1211.
- **Leard LE, Macdonald ES, Heller HC, Kilduff TS** (1994) Ontogeny of photic-induced c-fos mRNA expression in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 5, 2683-2687.
- **Lindblom N, Hejskala H, Hatonen T, Mustanoja S, Alftan H, Alila-Johansson A, Laakso ML** (2000) No evidence for extraocular light induced phase shifting of human melatonin, cortisol and thyrotropin rhythms. *NeuroReport* 11, 713-717.
- **Lockley SW, Brainard GC, Czeisler CA** (2003) High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4502-4505.
- **Lockley SW, Skene DJ, Arendt J, Tabandeh H, Bird AC, DeFrance R** (1997) Relationship between melatonin rhythms and visual loss in the blind. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3763-3770.
- **Lucas RJ, Douglas RH, Foster RG** (2001) Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 4, 621-626.
- **Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez JM, Foster RG** (1999) Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 505-507.
- **Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW** (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin knockout mice. *Science* 299, 245-247.
- **Lupi D, Cooper HM, Froehlich A, Stanford L, McCall MA, Foster RG** (1999) Transgenic ablation of rod photoreceptors alters the circadian phenotype of mice. *Neurosci* 89, 363-374.

- **Lupi D, Sekaran S, Jones SL, Hankins MW, Foster RG** (2006) Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4<sup>-/-</sup>) mice: a developmental study. *Chronobiol Int* 23, 167-179.
- **Mathes A, Engel L, Holthues H, Wolloscheck T, Spessert R** (2007) Daily profile in melanopsin transcripts depends on seasonal lighting conditions in the rat retina. *J Neuroendocrinol* 19, 952-957.
- **Melyan Z, Tarttelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW** (2005) Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745.
- **Menaker M, Roberts R, Elliott J, Underwood H** (1970) Extraretinal light perception in sparrow, III: eyes do not participate in photoperiodic photoreception. *Proc Natl Acad Sci USA* 67, 320-325.
- **Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM, Albers HE** (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock *in vivo*. *J Neurosci* 19, 5124-5130.
- **Miura M, Dong K, Ahmed FA, Okamura H, Yamadori T** (1997) The termination of optic nerve fibers in the albino mouse. *Kobe J Med Sci* 43, 99-108.
- **Moore RY, Eichler VB** (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42, 201-206.
- **Moore RY, Lenn NJ** (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146, 1-14.
- **Moore RY, Speh JC, Card JP** (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 352, 351-366.
- **Moore RY, Speh JC, Leak RK** (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309, 89-98.
- **Morin LP, Blanchard JH, Provencio I** (2003) Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 465, 401-416.
- **Mrosovsky N, Hattar S** (2003) Impaired masking responses to light in melanopsin knockout mice. *Chronobiol Int* 20, 989-999.
- **Mrosovsky N, Lucas RJ, Foster RG** (2001) Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms* 16, 585-588.
- **Muñoz Llamosas M, Huerta JJ, Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM** (2000) Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 120, 1-6.
- **Naitoh N, Watanabe Y, Matsumura K, Murai I, Kobayashi K, Imai-Matsumura K, Ohtuka H, Takagi K, Miyake Y, Satoh K, Watanabe Y** (1998) Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 850-854.
- **Nelson D, Takahashi J** (1991) Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol* 439, 115-145.
- **Newman LA, Walker MT, Brown RL, Cronin TW, Robinson PR** (2003) Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry* 42, 12734-12738.
- **Nielsen HS, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J** (2001) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces *period 1* and *period 2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus (SCN) during late night. *Neuroscience* 103, 433-441.
- **Nir I, Agarwal N** (1993) Diurnal expression of c-fos in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 47-54.
- **Olney JW** (1968) An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol* 7, 250-268.
- **Østergaard J, Hannibal J, Fahrenkrug J** (2007) Synaptic contact between melanopsin-containing retinal ganglion cells and rod bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3812-3820.

- **Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T** (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307, 600–604.
- **Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB** (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525–527.
- **Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA** (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298: 2213–2216.
- **Peirson SN, Bovee-Geurts PH, Lupi D, Jeffery G, DeGrip WJ, Foster RG** (2004) Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Brain Res Mol Brain Res* 123, 132–135.
- **Peirson SN, Oster H, Jones SL, Leitges M, Hankins MW, Foster RG** (2007) Microarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. *Curr Biol* 17, 1363–1372.
- **Pickard GE, Baver SB, Ogilvie MD, Sollars PJ** (2009) Light-induced fos expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in melanopsin knockout (opn4) mice. *PLoS One* 4, e4984.
- **Pickard GE, Smeraski CA, Tomlinson CC, Banfield BW, Kaufman J, Wilcox CL, Enquist LW, Sollars PJ** (2002) Intravitreal injection of the attenuated pseudorabies virus PRV Bartha results in infection of the hamster suprachiasmatic nucleus only by retrograde transsynaptic transport via autonomic circuits. *J Neurosci* 22, 2701–2710.
- **Pires SS, Hughes S, Turton M, Melyan Z, Peirson SN, Zheng L, Kosmaoglou M, Bellingham J, Cheetham ME, Lucas RJ, Foster RG, Hankins MW, Halford S** (2009) Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *J Neurosci* 29, 12332–12342.
- **Pires SS, Shand J, Bellingham J, Arrese C, Turton M, Peirson S, Foster RG, Halford S** (2007) Isolation and characterization of melanopsin (Opn4) from the Australian marsupial *Sminthopsis crassicaudata* (fat-tailed dunnart). *Proc Biol Sci* 274, 2791–2799.
- **Provencio I, Cooper HM, Foster RG** (1998b) Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol* 395, 417–439.
- **Provencio I, Jiang G, DeGrip WJ, Hayes WP, Rollag MD** (1998a) Melanopsin: an opsin in melanophores, brain and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 340–345.
- **Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD** (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 20, 600–605.
- **Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM** (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415, 4493.
- **Provencio I, Wong S, Lederman AB, Argamaso SM, Foster RG** (1994) Visual and circadian responses to light in aged retinally degenerate mice. *Vision Res* 34, 1799–1806.
- **Qiu F, Jiang H, Xiang M** (2008) A comprehensive negative regulatory program controlled by Brn3b to ensure ganglion cell specification from multipotential retinal precursors. *J Neurosci* 28, 3392–3403.
- **Qiu X, Kumbalasisiri T, Carlson SM, Wong KY, Krishna V, Provencio I, Berson DM** (2005) Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745–749.
- **Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE** (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25, 11595–11604.
- **Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M** (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- **Reppert SM, Duncan MJ, Goldman BD** (1985) Photic influences on the developing mammal. *Ciba Found Symp* 117, 116–128.

- **Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA** (1988) Maternal communication of circadian phase to the developing mammal. *Psychoneuroendocrinol* 13, 63–78.
- **Roenneberg T, Foster RG** (1997) Twilight times: Light and the circadian system. *Photochem Photobiol* 66, 549–561.
- **Rollag MD, Berson DM, Provencio I** (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 18, 227–234.
- **Rowe SA, Kennaway DJ** (2002) Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, 797–804.
- **Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG** (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 9703–9708.
- **Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF** (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211–2213.
- **Ruggiero L, Allen CN, Lane Brown R, Robinson DW** (2009) The development of melanopsin-containing retinal ganglion cells in mice with early retinal degeneration. *Eur J Neurosci* 29, 359–367.
- **Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Pozdeyev NV, Iuvone PM, Tosini G** (2005) Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 22, 3129–3136.
- **Sakamoto K, Liu C, Tosini G** (2004) Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci* 24, 9693–9697.
- **Schmidt TM, Kofuji P** (2009) Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci* 29, 476–82.
- **Schmidt TM, Taniguchi K, Kofuji P** (2008) Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J Neurophysiol* 100, 371–384.
- **Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, Hankins MW** (2003) Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner retinal neurons. *Curr Biol* 13, 1290–1298.
- **Sekaran S, Lall GS, Ralphs KL, Wolstenholme AJ, Lucas RJ, Foster RG, Hankins MW** (2007) 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 3981–3986.
- **Sekaran S, Lupi D, Jones SL, Sheely CJ, Hattar S, Yau KW, Lucas RJ, Foster RG, Hankins MW** (2005) Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 15, 1099–1107.
- **Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG** (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless / coneless (*rd/rd cl*) mice. *Eur J Neurosci* 17, 1793–1801.
- **Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB** (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271, 216–219.
- **Silva MM, Albuquerque AM, Araujo JF** (2005) Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *J Circadian Rhythms* 3, 10.
- **Sollars PJ, Smeraski CA, Kaufman JD, Ogilvie MD, Provencio I, Pickard GE** (2003) Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Vis Neurosci* 20, 601–610.
- **Soucy E, Wang Y, Nirenberg S, Nathans J, Meister M** (1998) A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* 21, 481–493.
- **Speh JC, Moore RY** (1993) Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Brain Res Dev Brain Res* 76, 171–181.
- **Stephan FK, Zucker I** (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 1583–1586.
- **Strom RC, Williams RW** (1998) Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number. *J Neurosci* 18, 9948–9953.

- **Tamotsu S, Morita Y** (1986) Photoreception in pineal organs of larval and adult lampreys, *Lampetra japonica*. *J Comp Physiol A* 159, 1–5.
- **Tarttelin EE, Bellingham J, Bibb LC, Foster RG, Hankins MW, Gregory- Evans K, Gregory-Evans CY, Wells DJ, Lucas RJ** (2003) Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res* 76, 393–396.
- **Taylor DH** (1972) Extra-optic photoreception and compass orientation in larval and adult salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Anim Behav* 20, 233–236.
- **Terakita A** (2005) The opsins. *Genome Biol* 6, 213.
- **Thapan K, Arendt J, Skene DJ** (2001) An action spectrum for melatonin suppression: Evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 535, 261–267.
- **Tian N, Copenhagen DR** (2003) Visual stimulation is required for refinement of ON and OFF pathways in postnatal retina. *Neuron* 39, 85–96.
- **Tosini G, Fukuhara C** (2002) The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res* 309, 119–126.
- **Tosini G, Menaker M** (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419–421.
- **Tosini G, Menaker M** (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 789, 221–224.
- **Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM** (2008) The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays* 30, 624–633.
- **Trejo LJ, Cicerone CM** (1984) Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain Res* 300, 49–62.
- **Tu DC, Zhang D, Demas J, Slutsky EB, Provencio I, Holy TE, Van Gelder RN** (2005) Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 48, 987–999.
- **Underwood H** (1975) Extraretinal light receptors can mediate photoperiodic photoreception in male lizard *Anolis carolinensis*. *J Comp Physiol* 99, 71–78.
- **Valenciano AI, Boya P, de la Rosa EJ** (2008) Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol* 53, 1515–1528.
- **Vandewalle G, Schmidt C, Albouy G, Sterpenich V, Darsaud A, Rauchs G, Berken PY, Baiteau E, Degueldre C, Luxen A, Maquet P, Dijk DJ** (2007) Brain responses to violet, blue, and green monochromatic light exposures in humans: prominent role of blue light and the brainstem. *PLoS ONE* 2, e1247.
- **Viney TJ, Balint K, Hillier D, Siegert S, Boldogkoi Z, Enquist LW, Meister M, Cepko CL, Roska B** (2007) Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr Biol* 17, 981–988.
- **von Frisch K** (1911) Beiträge zur physiologie der pigmentellen in der fischhaut. *Pflügers Arch* 138, 319–387.
- **von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG** (1999) Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* 72, 108–114.
- **Vugler AA, Redgrave P, Semo M, Lawrence J, Greenwood J, Coffey PJ** (2007) Dopamine neurones form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Exp Neurol* 205, 26–35.
- **Vugler AA, Semo M, Joseph A, Jeffery G** (2008) Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis Neurosci* 25, 125–138.
- **Wan J, Zheng H, Hu BY, Xiao HL, She ZJ, Chen ZL, Zhou GM** (2006) Acute photoreceptor degeneration down-regulates melanopsin expression in adult rat retina. *Neurosci Lett* 400, 48–52.
- **Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW** (2006) The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 23, 2477–2487.



- **Weaver DR, Reppert SM** (1989) Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res* 46, 291-296.
- **Weaver DR, Reppert SM** (1995) Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 136–148.
- **Wong KY, Dunn FA, Graham DM, Berson DM** (2007) Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 582, 279-296.
- **Yan L, Silver R** (2002) Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci* 16, 1531–1540.
- **Yoshida K, Kawamura K, Imaki J** (1993) Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells: regulation by light/dark cycle. *Neuron* 10, 1049-1054.
- **Young MJ, Lund RD** (1994) The anatomical substrates subserving the pupillary light reflex in rats: origin of the consensual pupillary response. *Neuroscience* 62, 481–496.
- **Young RW** (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205.
- **Zhang DQ, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG** (2008) Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 14181–14186.



# ***Publicaciones***





# Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina

Irene González-Menéndez, Felipe Contreras, Rafael Cernuda-Cernuda and José M. García-Fernández\*

Department of Morphology and Cell Biology, Oviedo University, Oviedo, Spain

## Edited by:

Dieter Wicher, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany

## Reviewed by:

Jane L. Witten, University of Wisconsin Milwaukee, USA

Monika Stengl, Philipps Universität Marburg, Germany

## \*Correspondence:

José M. García-Fernández, Department of Morphology and Cell Biology, University of Oviedo, C/Julían Clavería s/n, Oviedo 33006, Asturias, Spain.  
e-mail: jmgf@uniovi.es

In addition to some other functions, melanopsin-expressing retinal ganglion cells (RGCs) constitute the principal mediators of the circadian photoentrainment, a process by which the suprachiasmatic nucleus (the central clock of mammals), adjusts daily to the external day/night cycle. In the present study these RGCs were immunohistochemically labelled using a specific polyclonal antiserum raised against mouse melanopsin. A daily oscillation in the number of immunostained cells was detected in mice kept under a light / dark (LD) cycle. One hour before the lights were on (i.e., the end of the night period) the highest number of immunopositive cells was detected while the lowest was seen 4 h later (i.e., within the first hours of the light period). This finding suggests that some of the melanopsin-expressing RGCs “turn on” and “off” during the day/night cycle. We have also detected that these daily variations already occur in the early postnatal development, when the rod/cone photoreceptor system is not yet functional. Two main melanopsin-expressing cell subpopulations could be found within the retina: M1 cells showed robust dendritic arborization within the OFF sublamina of the inner plexiform layer (IPL), whilst M2 cells had fine dendritic processes within the ON sublamina of the IPL. These two cell subpopulations also showed different daily oscillations throughout the LD cycle. In order to find out whether or not the melanopsin rhythm was endogenous, other mice were maintained in constant darkness for 6 days. Under these conditions, no defined rhythm was detected, which suggests that the daily oscillation detected either is light-dependent or is gradually lost under constant conditions. This is the first study to analyze immunohistochemically the daily oscillation of the number of melanopsin-expressing cells in the mouse retina.

**Keywords:** retina, melanopsin, circadian rhythm, postnatal development, mouse

## INTRODUCTION

Circadian rhythms are oscillations with a period of about 24 h. Animals express these rhythms in their behavior and their physiology. The main role of the so-called circadian system is to set the time at which physiological and behavioral events occur with respect to the 24-h period, i.e. the day/night cycle. By anticipating physiological processes, organisms get ready for predictable changes in the environment. The period of the inner clock is not exactly 24 h and, hence, it must be entrained everyday. Twilight transition provides the most reliable indicator of environmental time and mediates this synchronization, a process that has been called photoentrainment. The principal pacemaker in mammals is the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) (Foster and Hankins, 2002).

The perception of the external day/night cycle, which is perhaps the most important function of the so-called non-image-forming visual system, is mediated by rod/cone photoreceptors and by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) whose phototransduction is based on the photopigment melanopsin (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2003). These ipRGCs transmit light information to the SCN through a monosynaptic pathway called the retinohypothalamic tract (RHT), allowing the photoentrainment to the external light-dark cycle (Gooley et al., 2001; Hankins et al., 2008; Hannibal et al., 2002; Hattar et al., 2002; Panda et al., 2002). Some other major projections of these

cells include the olivary pretectal nucleus, which controls pupil constriction and the intergeniculate leaflet, in which photic and non-photoc circadian cues converge (Fu et al., 2005). Minor innervation from the ipRGCs is also received in brain areas involved in the promotion of sleep (the ventrolateral preoptic nucleus), gaze control (superior colliculus), image-forming vision (dorsal lateral geniculate nucleus), etc. (Fu et al., 2005). Apart from perceiving light, melanopsin-expressing RGCs are also the principal conduits for rod-cone input to the mentioned responses (Güler et al., 2008), and in fact, their targeted destruction altered the effects of light on circadian rhythms (Göz et al., 2008).

The retina itself behaves as a clock, showing circadian oscillations. Which cells contribute to the clock mechanism that drives the inner retinal rhythm, as well as to what extent the ipRGCs are involved in such mechanism, is still unknown. Hannibal et al. (2005) and Sakamoto et al. (2004, 2005) demonstrated that melanopsin mRNA shows a daily oscillating pattern, with a peak in the transitional phase from day to night, whilst the minimum was observed at the end of the night. This rhythm appears to be influenced by rod/cone inputs, since melanopsin expression in rats with retinal degeneration, lacking rod and cone photoreceptors, is lower than in controls and also arrhythmic (Sakamoto et al., 2004). Moreover, the elimination of dopamine in the rat retina provoked an alteration in the expression of melanopsin mRNA (Sakamoto et al., 2005),

which means that dopamine is also involved in this daily oscillation. Under constant darkness pigmented rats (Sakamoto et al., 2005) showed an attenuated oscillation of melanopsin mRNA expression; however, Hannibal et al. (2005) and Mathes et al. (2007) showed that this daily rhythm was abolished by exposure to constant conditions.

The melanopsin daily rhythm could be observed in the early postnatal development, when rods and cones are not functional yet (Hannibal et al., 2007), which means that, at least at this early stage, is independent of the rod/cone input. Also, the ipRGCs were seen to be responsive to light stimulation since postnatal day (P) 0 (Sekaran et al., 2005; Tu et al., 2005). Moreover, it has been reported that the SCN begins to respond to stimulation of the retina at P0–1 (Lupi et al., 2006), or at P4 (Muñoz-Llamas et al., 2000) depending on intensity of the light administered, suggesting that functional connections between the retina and the SCN are already established on the day of birth.

Two main different morphological types of melanopsin-expressing RGCs have been previously described: M1 and M2 cells, which show different dendritic arborisation in different sublayers of the inner plexiform layer (IPL). Baver et al. (2008) demonstrated that these cell subpopulations have different brain projections, and in a recent study by Schmidt and Kofuji (2009) electrophysiological differences between them were also reported.

In the present work we have analyzed for the first time the daily variation of the number of the mouse melanopsin-expressing ipRGCs and of their main subpopulations, by means of immunohistochemistry, as well as the effects of darkness on such variation.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS AND EXPERIMENTAL DESIGN

Male pigmented mice *C3H/He* were used in the present study. Although commercially available *C3H/He* mice are retinally degenerate (*rd/rd*), we only studied *C3H/He* mice with normal retinas, i.e. wild-type at the *rd* locus (+/+), which were kindly donated by Dr. R. G. Foster (Oxford University, UK).

All the animals were maintained in the central animal care facilities under constant temperature conditions ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fed with standard food and tap water *ad libitum* and maintained under a 12-h light/12-h dark cycle (LD). As we will indicate below, a group of animals were also exposed to continuous darkness (DD). Under LD conditions the illumination source was a white light fluorescent lamp, so that the animals were exposed to an intensity of 200 lux at cage level.

Within the 24-h period two timing systems were considered in the present study: zeitgeber time (ZT), when the rhythms of the animals are synchronised with the external cycle (LD conditions); and circadian time (CT), when the animals show their endogenous rhythms (DD conditions).

In order to study the possible oscillation of melanopsin-expressing cells under the LD cycle or the effects of DD, several groups of mice were analyzed.

### LD mice

Mice aged 1–3 months kept under 12-h light/ 12-h dark were used. Animals were killed at ZT3, ZT8, ZT13, ZT18, ZT23 (ZT0 = lights on, ZT12 = lights off,  $n = 4$  animals at each time point). In order

to analyze the postnatal development of this daily rhythm pups of P1 and P5 were used. Pups were kept with their mothers under LD conditions until P1 and P5. Two time points were analyzed: ZT3 and ZT23.

### DD mice

To study the effects of constant darkness (DD), a group of adult mice were maintained in DD conditions for 6 days and killed at CT3, CT8, CT13, CT18 and CT23 ( $n = 4$  animals at each time point). To calculate the CT of these animals we considered that the period length was 23.5 h, as estimated in previous publications (Hatori et al., 2008; Kollag et al., 2003).

### TISSUE PREPARATION

In order to minimize pain, animals were anaesthetized prior to sacrifice. Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Eyes from decapitated animals were removed and fixed in a 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for 24 h, and then washed in PB for 24 h at  $4^\circ\text{C}$ . Then, the cornea and lens were removed and the eyecup was dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Only one eyecup per animal was used for the present study. 10  $\mu\text{m}$ -thick sections covering the whole eyecup were obtained from the paraffin blocks with a microtome and then mounted onto slides in six parallel series, of which only one was used. Paraffin sections were collected on gelatine-coated slides, deparaffined in xylene, hydrated in ethanol and placed in phosphate-buffered saline solution (PBS 0.01 M phosphate, 0.15 M NaCl) for 10 min.

For immunohistochemical labelling, endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in a solution of 0.3% hydrogen peroxide in PBS at room temperature (RT) for 30 min. Then they were washed twice for 5 min in PBS containing 0.4% Triton-100 (PBS-T) at RT to enhance permeability. Unspecific binding was blocked with normal goat serum (Vector Labs) diluted in PBS for 30 min. at RT. This was followed by incubation with the UF006 anti-mouse melanopsin polyclonal antibody at a dilution 1:5000 at  $4^\circ\text{C}$  for 3 days. This antiserum, which was raised in rabbit against the N-terminus peptide of the mouse melanopsin, was generously donated by Dr. Ignacio Provencio (University of Virginia, USA). Immunoreaction was visualized via the avidin–biotin–peroxidase method (Elite ABC kit, Vector Labs), using 0.025% DAB (3-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma) in 0.003% hydrogen peroxide Tris–HCl (0.05 M, pH 7.5) buffer as chromogen. Finally, the sections were dehydrated in an ethanol series, cleared in eucalyptol, and coverslipped.

### CELL COUNT AND CLASSIFICATION

Retinal sections were observed in a bright-field microscope (Nikon Eclipse E400). The somata of melanopsin-immunopositive cells were counted in the whole area of all the retinal sections of the series analyzed (1 out of 6 series per retina were used). Immunopositive cells were classified in M1 or M2 cells attending to the location of their soma and dendritic processes.

### STATISTICAL ANALYSIS

The SPSS 15 software was used for all the statistical analyses of the present study. Kolmogorov–Smirnov test was used to confirm

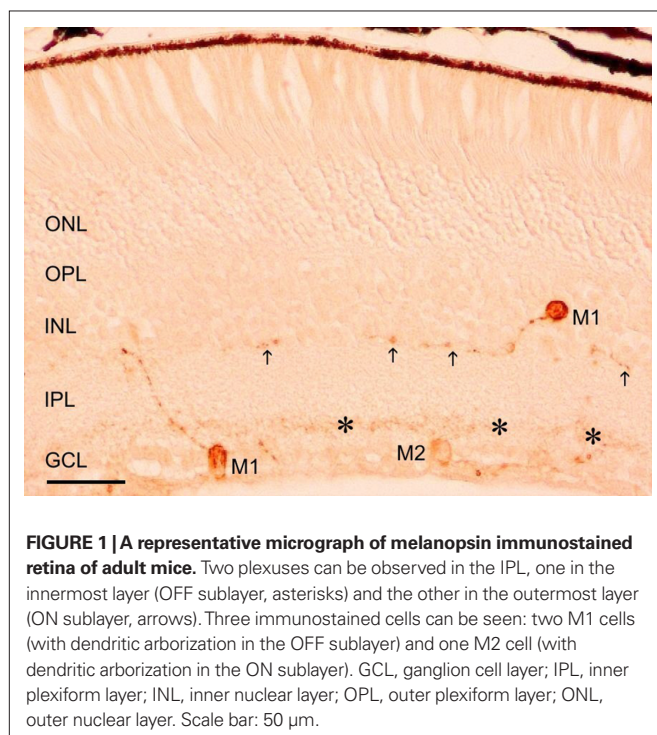
the normality of the data. The homogeneity of the variances was assessed with Levene's test. Student's *t*-tests were performed when the groups to be compared were only two. One-way ANOVA tests were used to analyse the total number of melanopsin-immunopositive cells, as well as the numbers of M1 and M2 cell subpopulations, throughout the LD cycle and throughout the DD cycle. *Post hoc* tests were performed to detect differences between specific time-points. In order to study possible interactions between the variables "cell subpopulation" and "time-point" throughout the LD cycle or the DD cycle, factorial ANOVA tests were performed. The number of melanopsin-expressing cells per retinal sample was presented as mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Melanopsin immunostaining could be observed in somata, dendrites and proximal segments of axons. Melanopsin-expressing cells were located throughout the retina and their somata were found either in the ganglion cell layer (GCL) or displaced in the inner nuclear layer (INL). Two dendritic plexuses could be distinguished in the inner plexiform layer (IPL) (**Figure 1**): one in the innermost sublamina (ON) and another in the outermost sublamina (OFF).

Two clearly distinguishable cell populations were considered for the present study attending to the different location of their somata and dendritic processes (**Figure 1**):

- **M1 cells**, with robust dendrites arborizing in the outer margin of the IPL (OFF-sublayer). Within this group, most of the cells, which were frequently heavily stained, had their somata located in the GCL. Some other cells had their somata displaced in the amacrine cell sublayer (i.e., the inner margin of the INL). Among the latter, heavily and weakly stained cells could be observed (not shown in the figure).



- **M2 cells** had their somata located in the GCL and their dendritic processes, which were finer and more numerous than those of M1 cells, were placed in the inner margin of the IPL (ON-sublayer). These cells usually showed weak staining.

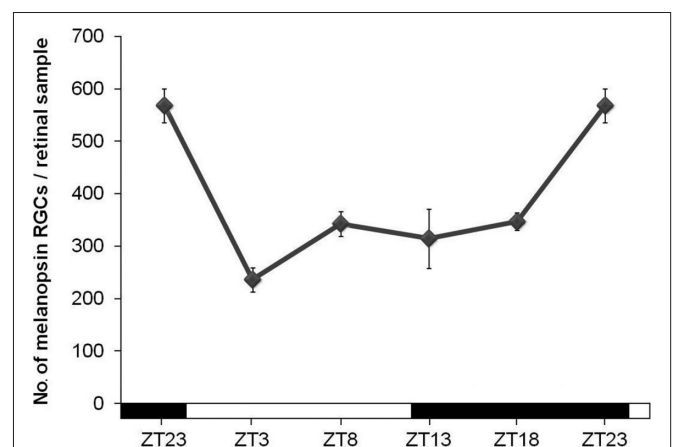
Some other cell populations (not shown) were only occasionally seen and, hence, were not considered for our analysis: a few immunostained cells had their somata located in the amacrine cell layer and their processes in the inner margin of the IPL (ON sublayer) and some other cells seemed to arborize in both the inner and outer plexuses of the IPL.

## NUMBER OF MELANOPSIN-IMMUNOSTAINED CELLS THROUGH THE LD CYCLE

Under LD conditions an oscillation in the total number of cells that expressed melanopsin was detected in adult mice retinas (**Figure 2**). The highest number of immunopositive cells was found 1 h before lights were on (ZT23), while the lowest was seen 4 h later (ZT3) ( $p < 0.001$ ). Then, a small increase of the number of immunopositive cells, which is maintained during the late day and the early night, was observed (not significant). The increase of melanopsin-expressing cells was found at the late night ( $p < 0.05$ ).

In order to find out whether such differences between ZT23 and ZT3 were also present at the early postnatal stages, the retinas of newborn mice of P1 and P5 were also analyzed. In this case, a significant increase between ZT23 and ZT3 was found at P5 ( $p < 0.01$ ). Such increase was not so marked as in adults. At P1 no statistical difference was detected between these time-points (**Figure 3**).

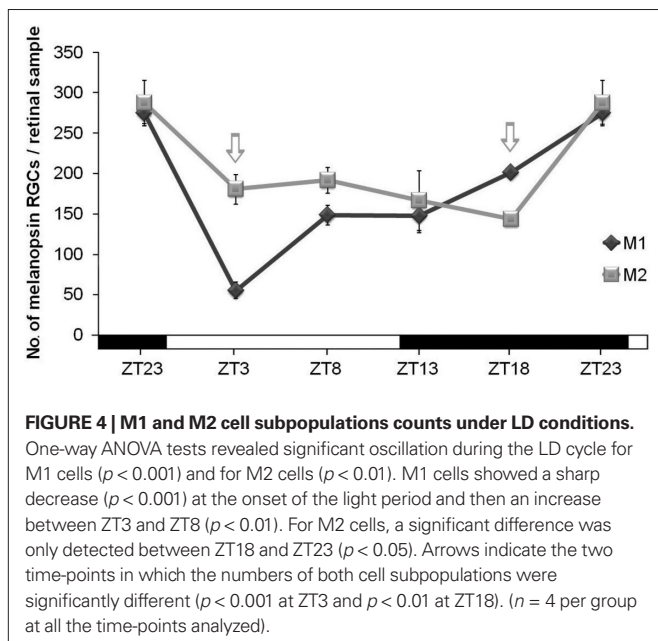
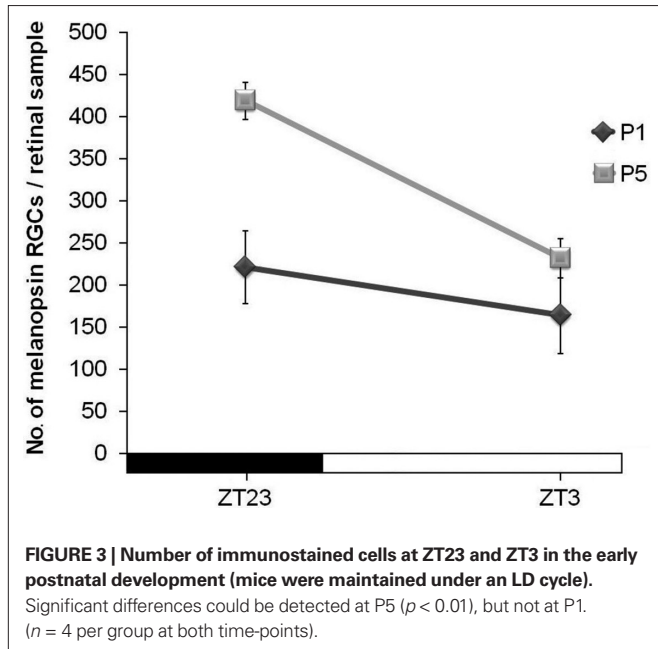
When M1 and M2 cells were counted separately under LD conditions, factorial ANOVA revealed an interaction between "cell subpopulation" and "time-point" ( $p < 0.001$ ), which indicates that variations of both cell subpopulations were significantly different. One-way ANOVA tests for each subpopulation revealed that both of them had different oscillations throughout the period analyzed (M1 cells,  $p < 0.001$ ; M2 cells,  $p < 0.01$ ). In fact, as can be seen in **Figure 4**, the M1 cell oscillation is more pronounced than that of



**FIGURE 2 | Number of immunopositive cells throughout the 12 h L/12 h D cycle.** The ANOVA test revealed a daily significant oscillation ( $p < 0.001$ ). *Post hoc* tests detected a significant decrease at the beginning of the light period ( $p < 0.001$ ) and an increase at the end of the night ( $p < 0.05$ ). ( $n = 4$  at each time-point).

M2 cells, in which just a significant difference was found between ZT18 and ZT23 ( $p < 0.05$ ). Also, the ratio between these two cell types changed at some time-points: at ZT3 M2 cells were more abundant than M1 ( $p < 0.001$ ), and at ZT18, vice versa ( $p < 0.01$ ), as revealed by Student's *t*-tests performed to compare both cell subpopulations in parallel at the same time points. The maxima were observed at ZT23 and, after the onset of the light period (ZT3), the decrease of M1 cells was stronger than that of M2 cells (Figure 4).

We also analyzed whether M1 and M2 cells presented a similar oscillation between ZT23 and ZT3 at P5. Student's *t*-tests revealed

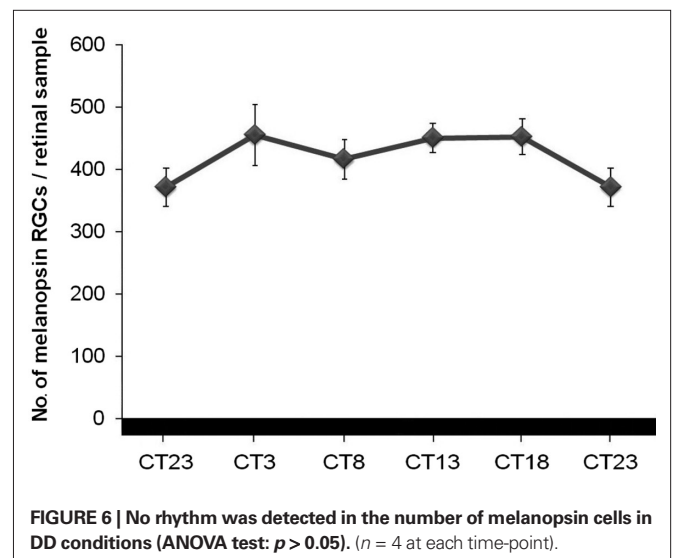
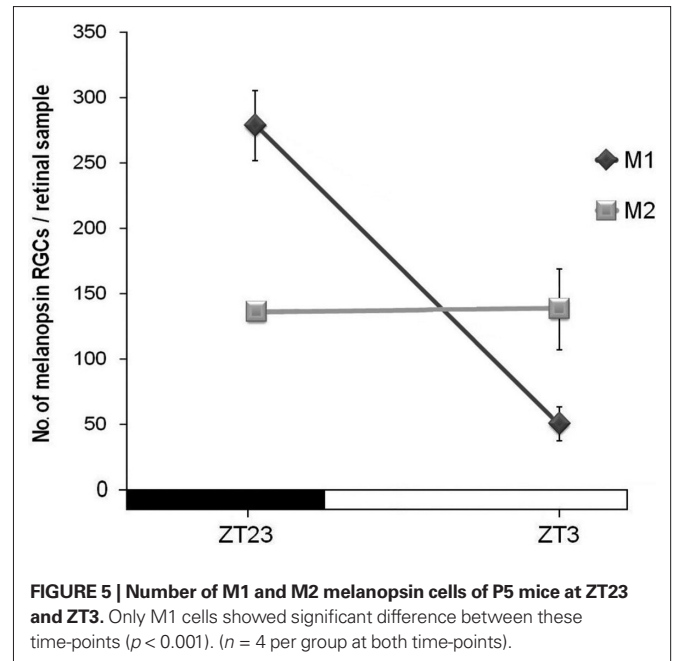


that while M2 cells showed no fluctuation between these time-points at this early postnatal age, M1 cells did show a fluctuation ( $p < 0.001$ ), which was parallel to that found in adults (Figure 5).

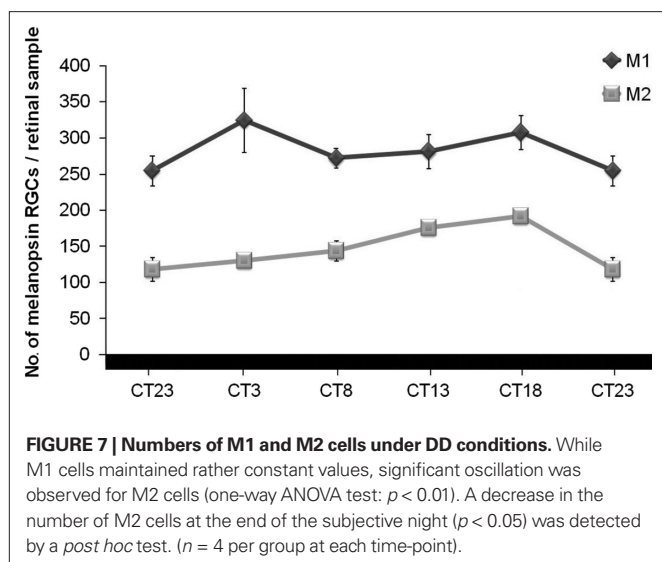
#### NUMBER OF MELANOPSIN-IMMUNOSTAINED CELLS IN DD CONDITIONS

With the aim to study whether or not the melanopsin oscillation was endogenous, animals were maintained in DD for 6 days. Under DD, differences between the highest and the lowest numbers disappeared ( $p > 0.05$ ) and no rhythm could be detected (Figure 6).

When analyzed separately under these DD conditions, the ratio between both cell subtypes changed with regard to those in LD conditions: M1 cells maintained a higher number than M2 cells at all the time-points studied (Figure 7). Factorial ANOVA test







did not reveal interaction between “cell subpopulation” and “time-point”, which means that both cell populations behave similarly throughout the period analyzed. One-way ANOVA tests and *post hoc* tests for each cell subpopulation revealed that M1 cells maintained rather constant values throughout the period, but curiously M2 cells did show a daily oscillation ( $p < 0.01$ ), with a small but significant diminution at the end of the subjective night between CT18 and CT23 ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

In addition to environmental cyclic fluctuations, rhythms are present in organisms, organs and cells. Some of these oscillations even persist in absence of external cues and constitute a way by which the organisms are prepared to predictable variations of the environment. These autonomous oscillators are considered biological clocks. Other organs and cells oscillate because they are governed by primary autonomous oscillators or simply as a response to environmental fluctuations. The retinal circadian clock was the first extra-SCN oscillator to be discovered in mammals (Tosini and Menaker, 1996). The endogenous oscillators of the retina are supposed to constitute an organized network to control many of the physiological, cellular and molecular rhythms that are present within this organ (Tosini et al., 2008). The nature of the cells that constitute such network has not been yet completely established. As an example, cone/rod photoreceptors, which release melatonin that peaks at night, and a subpopulation of amacrine/interplexiform cells that produce dopamine peaking at day, are known to form an intercellular feedback loop that regulate circadian retinal physiology (Green and Besharse, 2004). The C3H/He mice used in the present study, unlike some other mouse strains, have robust retinal melatonin rhythms that persist even after several days under continuous darkness (Tosini and Menaker, 1998), indicating that the retinal clock is fully operative and, therefore, this murine strain constitutes an appropriate model to study oscillations within the retina.

Since they were discovered a decade ago, melanopsin-expressing cells have continuously been subject of thorough study. Together

with the cone/rod photoreceptors, these photosensitive neurons contribute to circadian photoentrainment, but also have other remarkable roles (Fu et al., 2005; Göz et al., 2008; Hattar et al., 2003), including the modulation of some classical image-forming visual pathways. Barnard et al. (2006) demonstrated that the differences between the electroretinographic responses of the cone cell pathway at midday and at midnight are related to the presence of melanopsin-expressing RGCs. This suggests that these cells are somehow involved in the fluctuations occurring within the retina. Daily oscillations of both the melanopsin mRNA and the melanopsin protein have been previously reported in the rat (Hannibal et al., 2005; Sakamoto et al., 2004). In these studies, the total content of mRNA and the total amount of protein, by means of RT-PCR and Western-blot analyses, respectively, were measured. However, to date no previous studies had been done with regard to the possible variation in number of melanopsin-expressing cells through the 24-h cycle. The results presented in this paper clearly demonstrate that this number does oscillate throughout the day/night cycle, with a maximum at the end of the dark period (ZT23) and a minimum within the first hours of the light period (ZT3). A remarkable conclusion can be immediately extracted from this finding: at least some ipRGCs turn on and off during the LD cycle. When we analyzed these two time points (ZT3 and ZT23) at P1 and P5, i.e. the early postnatal stage when the rod/cone photoreceptors are not yet functional, we only could detect significant difference between them at P5, which suggests that the melanopsin system gradually develops within the early postnatal period. In the previous studies mentioned (Hannibal et al., 2005; Sakamoto et al., 2004) the maximum levels of melanopsin mRNA and protein in the rat occur at the transition from day to night, which is difficult to fit with our results in the mouse, in which the peak occurs in the transition from night to day. It must be taken into account that two mammalian species may have a different physiology and also that the total amount of protein detected by Western-blot analyses need not reflect the number of immunostained cells.

It is important to remark that the present work analyses for the first time the daily oscillation of M1 and M2 cells, which are the main morphologically and physiologically different subpopulations recognised among the melanopsin-expressing RGCs (Baver et al., 2008; Schmidt and Kofuji, 2009). In adult mice the numbers of both cell types reached the maximum and the minimum at similar times of the day; however, these numbers did not run parallel, which means that the ratio of the two cell types varied throughout the day/night cycle. This finding might be related to their likely distinct functional roles, since they have different dendritic stratification and physiology (Schmidt and Kofuji, 2009), as well as different brain projections (Baver et al., 2008); however, further data are required to discuss the meaning of their different oscillation through the LD cycle.

When M1 and M2 cells were analyzed separately at P5, difference between ZT3 and ZT23 was only significant for M1 cells, which indicates that this cell subpopulation develops earlier than the M2 cells, a fact that might also be related to their distinct central connectivity and functional roles. Of the two cell subpopulations described above, only one has been reported to date in the rat and this makes any comparison between the two species more difficult. Such cell population in the rat retina likely correspond to the mouse

M1 cells, due to their common dendritic arborization in the OFF sublamina, and also to the fact that antibodies raised against the C-terminus of the rat melanopsin specifically labeled the M1 cells in the mouse (Baver et al., 2008). Hannibal et al. (2007) detected a daily rhythm in neonatal rats (P5) that could correspond to the oscillation described in this paper for the mouse M1 cells at the same postnatal day. Our finding, like theirs, supports the idea that at least the oscillation of M1 cells during the 24-h cycle is independent of the rod/cone input, since it was detected even before these photoreceptors were developed. On the other hand, Sakamoto et al. (2004) observed that cone/rod photoreceptor loss in RCS-rdy rats abolishes melanopsin production by the ipRGCs. Curiously, in a mouse model Semo et al. (2003) did not observe any significant diminution of melanopsin production after retinal degeneration, which again reveals the variability between species. M2 cell oscillation, which was only detected in adults in our experiments, might depend on the development of other retinal neurons, like rod/cone photoreceptors or the dopaminergic amacrine cells, which are not functional at the early postnatal stage.

After 6 days under constant darkness, we did not detect any rhythm in the total number of melanopsin-immunostained cells, which suggests that the oscillation is not endogenous, but subjected to the day/night cycle. When M1 and M2 cells were analyzed separately, their ratio was roughly maintained at all the time-points analyzed, with the exception that M2 cells showed a small but significant decrease at the end of the subjective night in such experimental conditions. This finding is difficult to explain, but suggests that the physiology of the two subpopulations is different and still poorly understood. Whether the melanopsin oscillation through the 24-h period is endogenous or not is a controversial matter. Sakamoto et al. (2005) detected an attenuated circadian oscillation in melanopsin mRNA in rats after 2 days in constant darkness. In contrast, Mathes et al. (2007) reported in a different rat strain that the daily rhythm of melanopsin mRNA was abolished after both constant light or constant darkness exposure, suggesting that the regulation of the melanopsin gene does not rely on a circadian oscillator but is directly illumination-dependent. Therefore, no comparisons can be established between our results in mice and any of these studies. Moreover, only M2 cells showed a small fluctuation in constant conditions. Therefore, no comparisons can be established between

our results in mice and any of these studies. Moreover, only M2 cells showed a small fluctuation in constant conditions. If the melanopsin-expressing RGCs had an endogenous rhythm, they should work in a synchronized way. If this was the case, exposure to continuous darkness might induce disruption of the coupling among them and, thus, a loss of their circadian oscillation. Additional analyses on each cell subpopulation, administering shorter periods of exposure to constant conditions, are needed to clarify this issue.

Our study contributes to understanding the physiology of melanopsin-expressing cells and their two subpopulations, which respond differently to changes in environmental conditions. Some of these retinal neurons seem to turn on and off during the LD cycle. Moreover, the effects that these cells exert on different brain areas might be additive, i.e., dependent on the number of cells being active at a certain time. Apart from the physiological importance that this finding may have on its own, this could also explain some quantitative differences reported in previous studies by other authors regarding the melanopsin content of the retina, and why some retinal ganglion cells that project to the SCN do not show melanopsin immunostaining (Sollars et al., 2003). These cells that do not apparently express the melanopsin photopigment might correspond to retinal samples taken at hours in which such cells were switched off, but still might transmit inputs from the cone/rod pathway to the brain. Differences found in previous studies regarding the total number of melanopsin-expressing cells in the retina, or the numbers of M1 and M2 cell subpopulations, might also be derived from different times of the day for sample collection. Further research is needed to answer questions related to the networks established among neurons within the retina and to what extent the melanopsin-expressing neurons contribute to the circadian physiology of this organ.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The UF006 antiserum was generously donated by Dr. Ignacio Provencio, University of Virginia, USA. The C3H/He mice (wild-type at the *rd* locus) were kindly donated by Dr. Russell G. Foster (Oxford University, UK). This study was supported by Grant BFU2006-15576 (from the Spanish Ministry of Science and Innovation) to J.M. García-Fernández, I. González-Menéndez was supported by fellowship BP07-088 (from the Spanish FICYT).

## REFERENCES

- Barnard, A. R., Hattar, S., Hankins, M. W., and Lucas, R. J. (2006). Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr. Biol.* 16, 389–395.
- Baver, S. B., Pickard, G. E., Sollars, P. J., and Pickard, G. E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1763–1770.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.
- Foster, R. G., and Hankins, M. W. (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog. Retin. Eye Res.* 21, 507–527.
- Fu, Y., Liao, H. W., Do, M. T., and Yau, K. W. (2005). Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 415–422.
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., and Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 12, 1165.
- Göz, D., Studholme, K., Lappi, D. A., Rollag, M. D., Provencio, I., and Morin, L. P. (2008). Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS ONE* 3, e3153.
- Green, C. B., and Besharse, J. C. (2004). Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J. Biol. Rhythms* 19, 91–102.
- Güler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H. W., Barnard, A. R., Cahill, H., Badea, T. C., Zhao, H., Hankins, M. W., Berson, D. M., Lucas, R. J., Yau, K. W., and Hattar, S. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–105.
- Hankins, M. W., Peirson, S. N., and Foster, R. G. (2008). Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31, 27–36.
- Hannibal, J., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2007). Melanopsin changes in neonatal albino rat independent of rods and cones. *Neuroreport* 18, 81–85.
- Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., and Fahrenkrug, J. (2005). Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J. Mol. Neurosci.* 27, 147–155.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively

- present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retino-hypothalamic tract. *J. Neurosci.* 22, 191–197.
- Hatori, M., Le, H., Vollmers, C., Keding, S. R., Tanaka, N., Schmidt, C., Jegla, T., and Panda, S. (2008). Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS ONE* 3, e2451.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Science* 295, 1065–1075.
- Hattar, S., Lucas, R. J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R. H., Hankins, M. W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R. G., and Yau, K. W. (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76–81.
- Lupi, D., Sekaran, S., Jones, S. L., Hankins, M. W., and Foster, R. G. (2006). Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4<sup>-/-</sup>) mice: a developmental study. *Chronobiol. Int.* 23, 167–179.
- Mathes, A., Engel, L., Holthues, H., Wolloscheck, T., and Spessert, R. (2007). Daily profile in melanopsin transcripts depends on seasonal lighting conditions in the rat retina. *J. Neuroendocrinol.* 19, 952–957.
- Muñoz-Llamas, M., Huerta, J. J., Cernuda-Cernuda, R., and García-Fernández, J. M. (2000). Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 15, 1–6.
- Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenesch, J. B., Provencio, I., and Kay, S. A. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213–2216.
- Rollag, M. D., Berson, D. M., and Provencio, I. (2003). Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J. Biol. Rhythms* 18, 227–234.
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Pozdeyev, N. V., Iuvone, P. M., and Tosini, G. (2005). Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3129–3136.
- Sakamoto, K., Liu, C., and Tosini, G. (2004). Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J. Neurosci.* 24, 9693–9697.
- Schmidt, T. M., and Kofuji, P. (2009). Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29, 476–482.
- Sekaran, S., Lupi, D., Jones, S. L., Sheely, C. J., Hattar, S., Yau, K. W., Lucas, R. J., Foster, R. G., and Hankins, M. W. (2005). Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr. Biol.* 15, 1099–1107.
- Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R. J., Jeffery, G., and Foster, R. G. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1793–1801.
- Sollars, P. J., Smeraski, C. A., Kaufman, J. D., Ogilvie, M. D., Provencio, I., and Pickard, G. E. (2003). Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Vis. Neurosci.* 20, 601–610.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419–421.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1998). The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789, 221–224.
- Tosini, G., Pozdeyev, N., Sakamoto, K., and Iuvone, P. M. (2008). The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays* 30, 624–633.
- Tu, D. C., Zhang, D., Demas, J., Slutsky, E. B., Provencio, I., Holy, T. E., and Van Gelder, R. N. (2005). Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 48, 987–999.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 14 April 2009; paper pending published: 08 May 2009; accepted: 05 June 2009; published online: 15 June 2009.

Citation: González-Menéndez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R and García-Fernández JM (2009) Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front. Cell. Neurosci.* (2009) 3:3. doi:10.3389/neuro.03.003.2009

Copyright © 2009 González-Menéndez, Contreras, Cernuda-Cernuda and García-Fernández. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and the Frontiers Research Foundation, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.



# No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina

Irene González-Menéndez, Felipe Contreras, Rafael Cernuda-Cernuda and José M. García-Fernández

Department of Morphology and Cell Biology, Oviedo University, Oviedo, Spain

**Summary.** Melanopsin, an opsin protein expressed in mammalian retinal ganglion cells (RGCs), makes them responsive to light. Such photosensitive RGCs form the retinohypothalamic tract (RHT) that provides signals to the suprachiasmatic nucleus (SCN), the master regulator of circadian rhythms. The SCN is adjusted daily to the environmental day/night cycle by signal inputs incoming from the RHT. In the present work we have studied, using immunohistochemistry techniques, the types and number of cells which expressed melanopsin during the postnatal development of pigmented C3H/He mice maintained in a standard daily cycle (12-h light / 12-h dark). Our results clearly show for the first time that the retina maintains a rather constant number of melanopsin-expressing RGCs from the first postnatal day and, thus, demonstrate that no loss of these photosensitive cells occurs during postnatal development. This supports the general idea that the non-image-forming system, in which these cells are involved, is functional at the very early postnatal stage.

**Key words:** Melanopsin, Postnatal development, Retina, Mice, Non-image-forming vision

## Introduction

Retinal rods and cones are the primary photoreceptors for vertebrate image formation; however, sight is not the sole function of the retina. The so-called non-image forming vision, which basically consists of the perception of the day-night cycle and light intensity, is mediated by classical rod/cone photoreceptors and by

a small subset of retinal ganglion cells (RGCs). Such RGCs express the photopigment melanopsin and are intrinsically photosensitive (ip) (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002). Such melanopsin-expressing cells also constitute the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision (Güler et al., 2008) and project to several brain areas, including the suprachiasmatic nucleus (SCN), the organ in which the circadian rhythms that command the circadian physiology are generated (Gooley et al., 2001; Berson et al., 2002; Hannibal et al., 2002; Hattar et al., 2002; Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002). In fact, it has been recently demonstrated that the targeted destruction of these ipRGCs alters the effects of light on circadian rhythms (Göz et al., 2008; Guler et al., 2008; Hatori et al., 2008). Some other major projections of these cells include the olivary pretectal nucleus, which controls pupil constriction and the intergeniculate leaflet, in which photic and non-photic circadian cues converge (Hattar et al., 2006). Minor innervation from the ipRGCs is also received in brain nuclei involved in the promotion of sleep, photic modulation of neuroendocrine outputs, image-forming vision, etc. (Hattar et al., 2006).

The different brain projections for image-forming and non-image-forming vision do not develop functionally at the same time. The onset of image-forming activity depends on the intraretinal synaptogenesis of cone/rod photoreceptors, the extraretinal ganglion cell synaptogenesis to the lateral geniculate nucleus and the eye opening, which occurs at postnatal day (P) 14 approximately (i. e., mice are totally image-blind until this postnatal day). However, the melanopsin-expressing ganglion cells are responsive to light stimulation since P0 (Sekaran et al., 2005; Tu et al., 2005). Moreover, it has been reported that the SCN begins to respond at P0-1 (Lupi et al., 2006), or at P4 (Muñoz-Llamas et al., 2000) depending on light

intensity. This means that functional connections between the retina and the SCN are already established at birth, when the production of RGCs is essentially complete (i.e. they all are postmitotic). A number of studies have described a neurotrophic cell death in the mouse ganglion cell layer (GCL) during the postnatal extraretinal and intraretinal synaptogenesis. A peak of RGC death occurs shortly after birth and a second peak seems to coincide with eye opening, approximately at the end of the second postnatal week (Valenciano et al., 2008). At least 70% of the RGCs generated are selected by programmed cell death during the three postnatal weeks (Strom and Williams, 1998).

Regarding the morphological and functional heterogeneity of ipRGCs in the mouse, previous works have identified two main cell types: M1 cells, with their dendritic arborisation in the outer-most sublayer of the inner plexiform layer (IPL), which corresponds to the sublamina a (OFF sublamina), and M2 cells, which have their dendrites forming a second plexus in the inner-most part of the IPL, which corresponds to the sublamina b (ON sublamina). Bayer et al. (2008) demonstrated that these types have different brain projections, and in a recent study by Schmidt and Kofuji (2009) functional differences among them were also reported.

Although both the morphology and physiology of the melanopsin-expressing cells have been thoroughly analysed in mice, studies on their development are rather scarce to date (Sekaran et al., 2005; Tu et al., 2005; Lupi et al., 2006; Schmidt et al., 2008). Hence, our goal was to analyse the postnatal development of such photosensitive RGCs in pigmented C3H/He, mice in order to elucidate to what extent M1 and M2 cell subpopulations were affected by the selection occurring in the retina during the early postnatal period.

## Materials and methods

### *Animals*

Male and female pigmented mice *C3H/He* were used in the present study. Although commercially available *C3H/He* mice are retinally degenerate (*rd/rd*), we only studied *C3H/He* mice with normal retinas, i.e. wild-type at the *rd* locus (+/+), which were kindly donated by Dr. R. G. Foster (Oxford University, UK).

All the animals were maintained in the central animal care facilities under constant temperature conditions ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and a 12-h light/12-h dark cycle, and fed with standard food and tap water ad libitum. Four ages were analysed: 1, 5, 11 and 21 postnatal (P) days, with a total of 4 animals per age group. The illumination source was a white light fluorescent lamp, so that the animals were exposed to a light intensity of  $250\pm 50$  lux at cage level.

### *Tissue retrieval and preparation*

In order to minimize pain, animals were

anaesthetized prior to sacrifice. Animals were sacrificed 3 hours after light on. Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Eyes from decapitated animals were removed and fixed in a 4% paraformaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for 24 hours, and then washed in PB for 24 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ .

### *Eye measurements*

The diameter of the ocular globe, as well as the area of the whole flat-mounted retina, was measured at P1 and P21. Only one eye was analysed per animal. The diameter was measured by means of a gauge. The area of the photographed whole mount retinas was calculated with Corel Photopaint Software (Corel Corporation). The area was measured in pixels and then transformed in square millimetres.

### *Immunohistochemistry of retinal sections*

For the immunohistochemistry techniques, the cornea and lens were removed. To obtain retinal sections the eyecup was dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Sections of  $10\ \mu\text{m}$  were obtained from the paraffin blocks with a microtome (only one eye per animal was sectioned) and then mounted onto slides in six parallel series, of which only one was used for the present study. Paraffin sections were collected on gelatine-coated slides, deparaffined in xylene, hydrated in ethanol and placed in phosphate-buffered saline solution (PBS, 0,01M phosphate, 0,15M NaCl) for 10 min.

For the immunohistochemistry techniques, endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in a solution of 0.3% hydrogen peroxide in PBS at room temperature (RT) for 30 minutes. Then they were washed twice for 5 minutes in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBS-T) at RT to enhance permeability. Unspecific binding was blocked with normal goat serum (Vector Labs) diluted in PBS for 30 min. at RT. This was followed by incubation with anti-melanopsin primary antibody (UF006, generously donated by Dr. Ignacio Provencio, University of Virginia, USA) at a dilution 1:5000 at  $4^{\circ}\text{C}$  for 3 days. Immunoreaction was visualized via the avidin-biotin-peroxidase method (Elite ABC kit, Vector Labs), using 0.025% DAB (3,-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma) in 0.003% hydrogen peroxide Tris-HCl (0.05M, pH 7.5) buffer as chromogen. Finally, the sections were dehydrated in an ethanol series, cleared in eucalyptol, and coverslipped.

### *Immunofluorescence in flat mounted retinas*

Flat-mounted retinas at P1 and P21 were also analysed. Four animals per age group and only one eye per animal were used. After eye fixation and washing,

## No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs

the cornea and lens were removed and the retinas were isolated from the eyecup. Melanopsin immunohistochemistry was performed as described above, but with PBS-T containing 1% Triton X-100. Also, immunofluorescence with an Alexa-fluor 488 goat anti-rabbit antiserum (Invitrogen, with a dilution of 1:200), instead of the ABC method, was used. Finally, the retinas were mounted onto slides with mounting medium for fluorescence (Vectashield, Vector Labs), coverslipped and sealed.

### Cell count and classification

The somata of melanopsin positive cells were counted, regardless of their localization or morphology, in the whole area of all the immunostained sections and of the flat-mounted retinas. For counting melanopsin positive cells on retinal sections a bright-field microscope was used (Nikon Eclipse E400). For whole flat-mounted retinas a confocal microscope was used (Leica TCS-SP2-AOBS). Melanopsin-positive cells were classified attending to the location of their soma and dendritic processes.

### Statistical analysis

Student t test was used to compare ocular diameter and retinal area between P1 and P21. In total, the diameter of four eye globes and the area of four flat-mounted retinas were measured per age group.

A one-way ANOVA analysis was used to compare cell counts in retinal sections between ages P1, P5, P11 and P21. In flat mounted retinas Student t test was also used to compare total cell counts.

## Results

The ocular globe diameter of pigmented mice increased significantly from P1 ( $2\pm 0.04$  mm) to P21 ( $3.025\pm 0.05$  mm) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1A,B). The retinal area also showed significant differences between P1 ( $5.25\pm 0.30$  mm<sup>2</sup>) and P21 ( $14.03\pm 0.39$  mm<sup>2</sup>) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1C,D), which means a 2.7-fold increase.

The UF006 antibody revealed immunoreactivity in somata, dendrites and proximal axonal segments of a RGC subpopulation. Melanopsin-expressing cells could be observed throughout the retina, at both the peripheral (Fig. 2A) and the central areas (Fig. 2B,C) from P1 on, and their somata were located either in the GCL or displaced in the INL. At P1 ipRGCs had already developed dendritic processes but they did not show any discrete plexus (Fig. 2D). At P11 we could observe two well-constituted plexuses in two sublayers of the inner plexiform layer (IPL): one plexus in the ON-sublayer (next to the GCL) and another in the OFF-sublayer (next to the INL). Dendritic processes in the ON plexus were finer and more numerous than those situated in the OFF plexus (Fig. 2E).

The total number of melanopsin-immunopositive

cells in the retina did not vary significantly ( $p > 0.05$ ) during postnatal development. In retinal sections the number of melanopsin-positive cells ranged between 160 and 250 per retinal sample (P1, P5, P11, P21) (Fig. 3A). In whole flat-mounted retinas the number of melanopsin-positive cells ranged between 1600-1800 cells/retina (P1 to P21) (Fig. 3B). We have observed a similar total number of melanopsin-expressing cells in the retina at both ages. However, the total area of the retina increased during postnatal development (Fig. 4A,B) and, thus, the density of melanopsin-immunopositive cells decreased within the same period (Fig. 4C,D).

In the present study we have also analyzed and classified the melanopsin-expressing cells attending to the different location of their somata and dendritic processes from P5 on, since at P1 the different cell subtypes are not yet identifiable.

### M1 cells

The dendritic processes of these cells were located in the outer margin of the IPL (OFF-sublayer). Two subtypes could be distinguished:

In the M1a cells the somata were located in the GCL and their dendritic processes were longer than those of M2 cells, showing prominent varicosities (Fig. 5A). These cells were frequently heavily stained, although some weakly stained cells with the same characteristics could also be detected.

M1b cells (approximately 10% of the total) had their somata displaced in the amacrine cells sublayer (i.e., the inner margin of the INL), and their dendrites were finer than those of M1a cells. Heavily (50%) (Fig. 5B) and weakly (50%) (Fig. 5C) stained cells with these characteristics could be observed.

M1 cells constituted about 22% of the total melanopsin-expressing cells during postnatal development and no differences between ages were detected. There was a roughly equal number of cells of subtypes 1a and 1b (Fig. 5D).

### M2 cells

These cells had their dendritic processes in the inner margin of the IPL (ON side) and usually were weakly stained. Their bodies were located in the GCL (Fig. 6A). The percentage of M2 cells did not vary during postnatal development and ranged about 75% (Fig. 6B).

Some exceptions to this classification must be mentioned: a few immunostained cells, which constituted  $0.5\pm 0.1\%$  of the total at all the ages studied had their bodies located in the amacrine cell layer and their processes in the inner margin of the IPL (ON sublayer) (not shown); moreover, we have observed some other cells that have their bodies located in the neuroblastic layer or in the INL and whose dendrites do

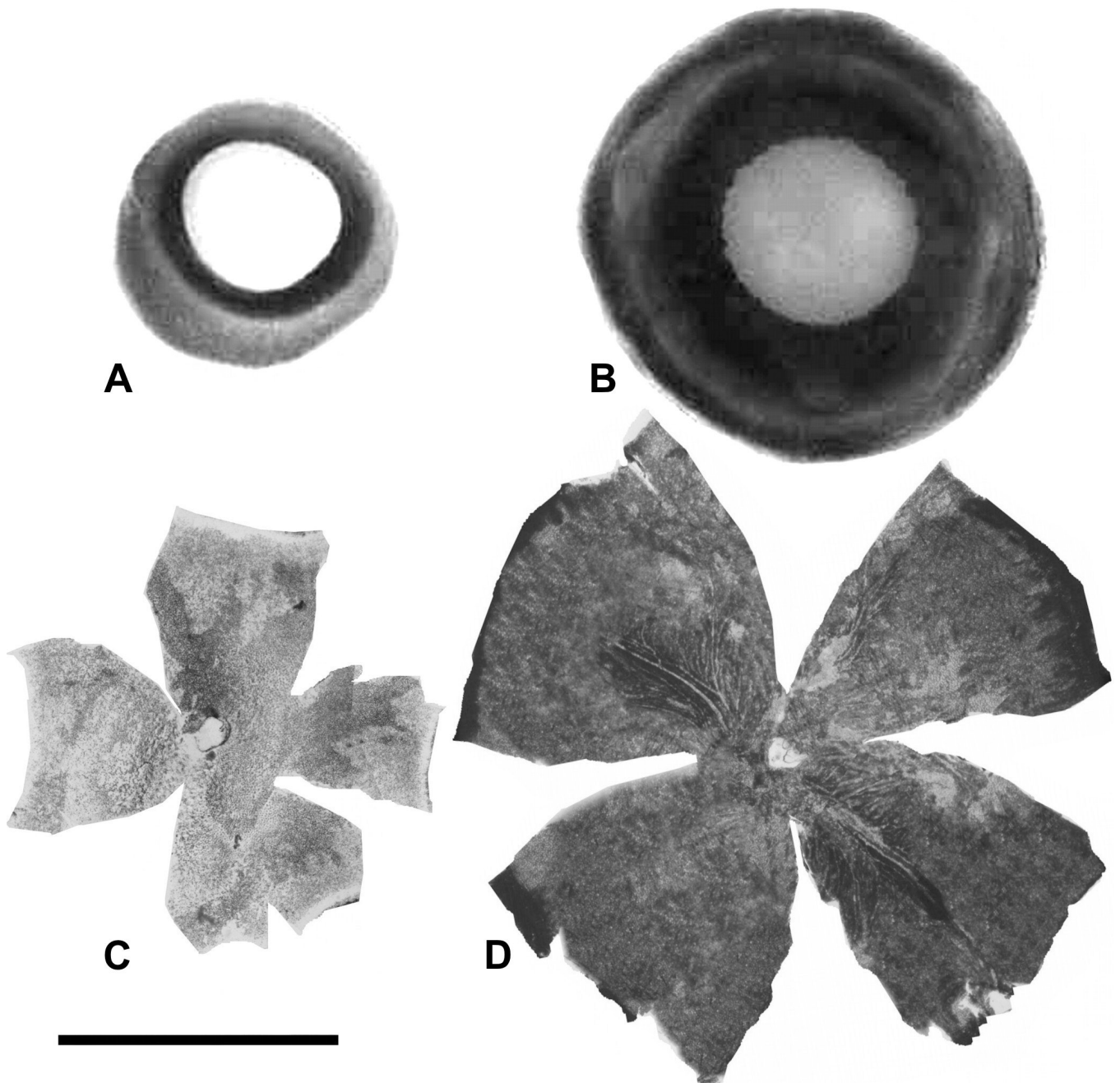
*No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs*

not branch into the IPL plexuses (not shown). A general decrease of these cell types during postnatal development was detected, so that at the end of this period their presence is merely occasional. Finally, the dendrites of a number of melanopsin-immunopositive cells seemed to arborize in the two plexuses of the IPL (not shown). All of these exceptions were not taken into

account in the counts carried out for our study.

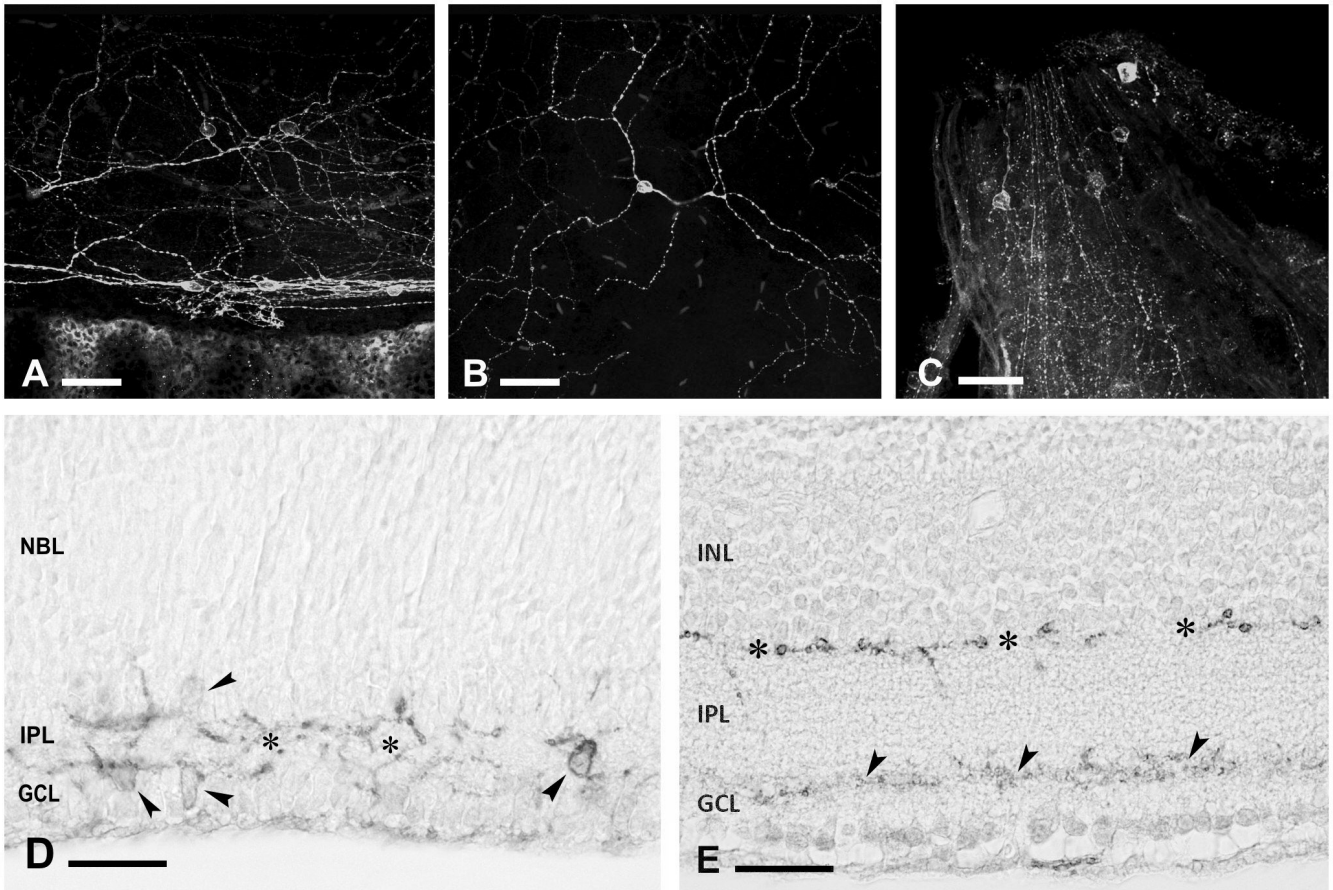
**Discussion**

Non-image forming vision is mediated by rod/cone photoreceptors and by melanopsin-expressing ipRGCs (Hattar et al., 2003; Panda et al., 2003). The latter

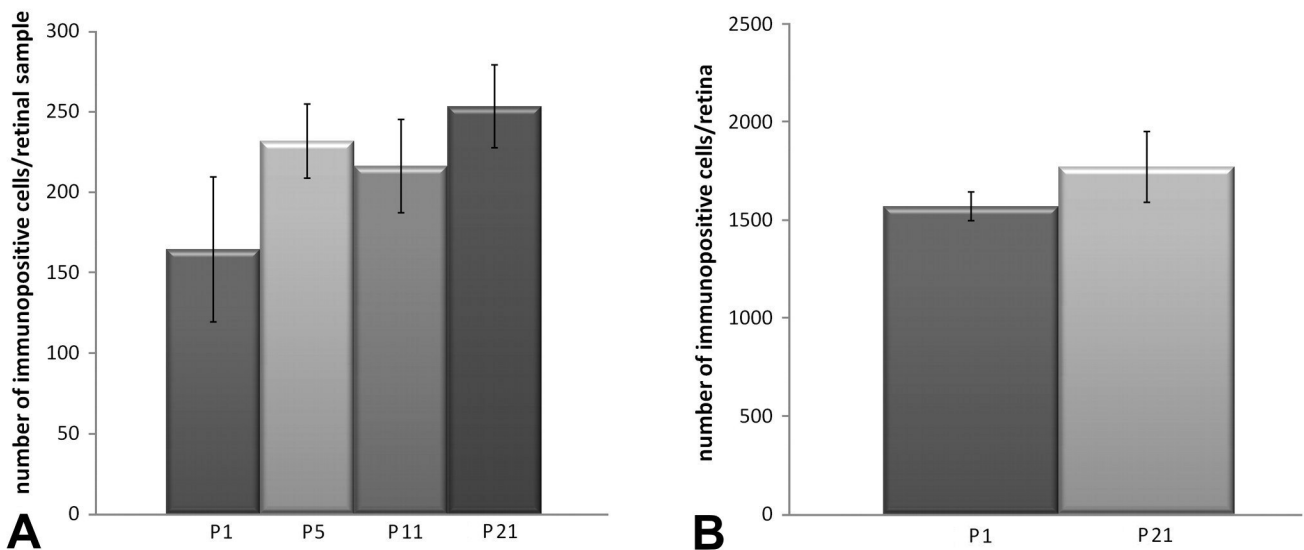


**Fig. 1.** C3H/He mice representative examples of ocular globes and flat-mounted retinas at P1 (A, C) and P21 (B, D). Note the increase in both the eye volume and the retinal area. Scale bar: 2 mm.





**Fig. 2.** Representative micrographs showing melanopsin-immunostained cells: with their somata located in the GCL, next to the ciliar body, and the dendrites situated in the inner plexus of the IPL (**A**), with the soma situated in the INL, next to amacrine cells (**B**), with the somata in the GCL near to the optic nerve (**C**). Note that the axons also show immunoreactivity. Micrographs **A**, **B** and **C** correspond to whole-mounted retinas at P21. **D**. Retinal section with melanopsin-immunostained cells at P1: both the somata (arrowheads) and the dendrites (asterisks) can be recognised. **E**. The dendritic plexuses at P11 can be seen in the inner (arrowheads) and in the outer margin (asterisks) of the IPL in a retinal section. GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; NBL: neuroblastic layer. Scale bars: 50  $\mu$ m.

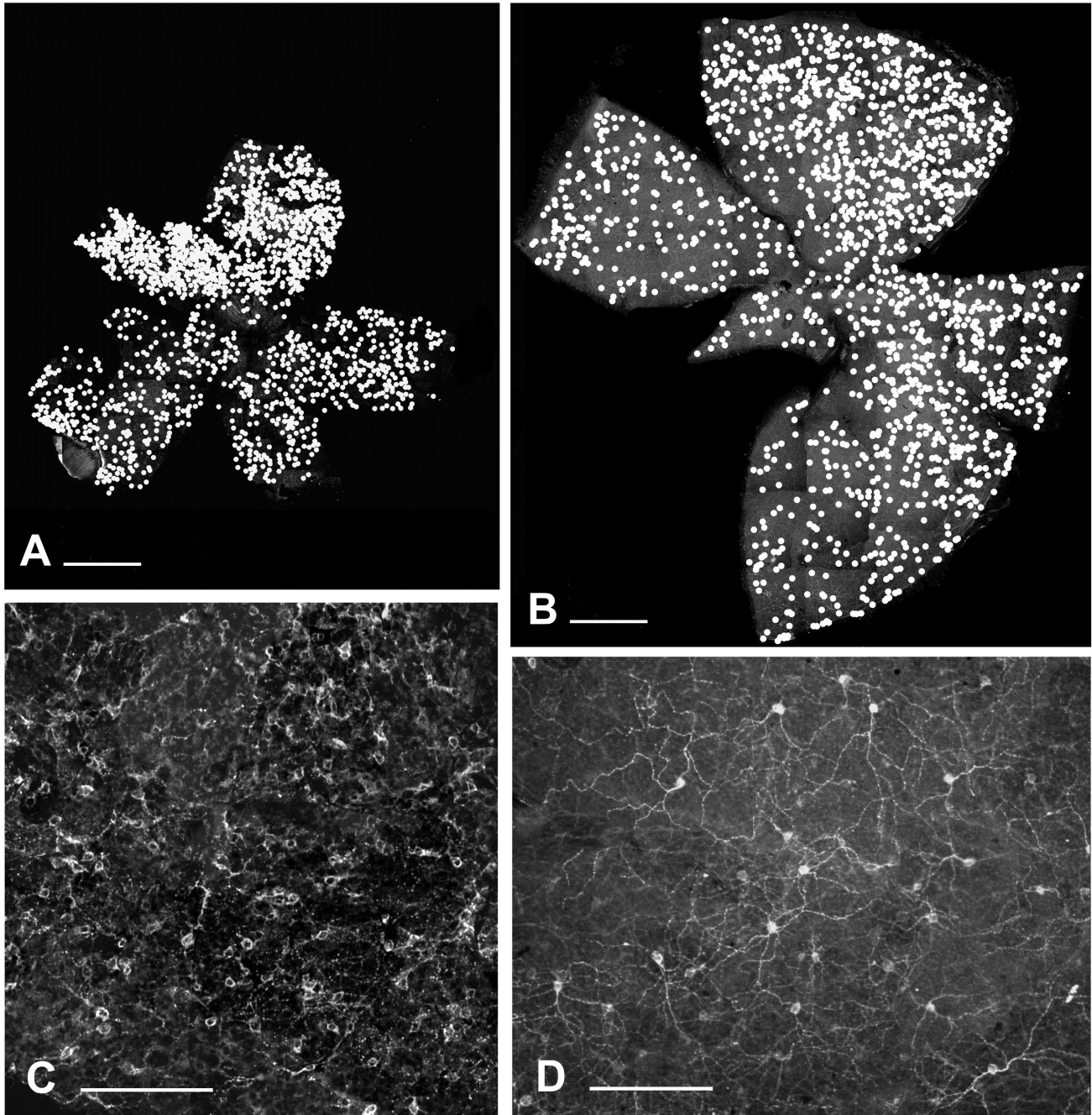


**Fig. 3. A.** Histogram showing the number of melanopsin-expressing cells per retinal sample (1 out of 6 series) (mean  $\pm$  SEM) at the four postnatal ages analysed. No significant differences have been observed. **B.** Histogram showing the total number of melanopsin-expressing cells in whole-mounted retinas (mean  $\pm$  SEM) at P1 and P21. No significant differences have been detected between these ages.

*No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs*

project to the suprachiasmatic nucleus, the master clock controlling circadian rhythms, and also to other brain nuclei involved in diverse functions, such as the promotion of sleep and pupil constriction, as well as some other aspects of image-forming vision (Hattar et al., 2006).

Melanopsin-expressing cells are responsive to light since the day of birth (Sekaran et al., 2005; Tu et al., 2005). During the development of the central nervous system a general overproduction of neuron cells occurs. The neurotrophic theory postulates that neuron survival is dependent on their successful competition for limited



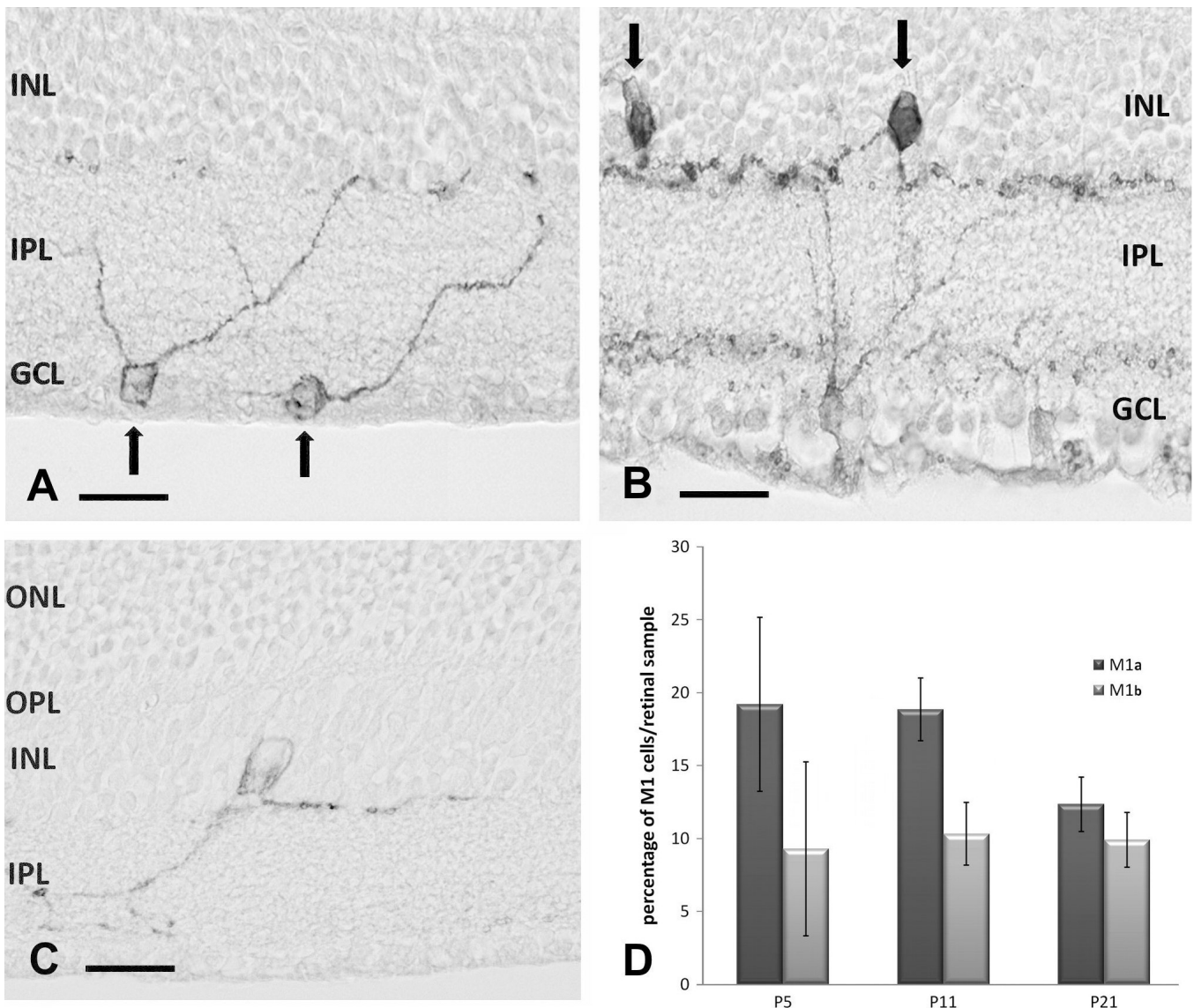
**Fig. 4.** Representative micrographs showing whole-mounted retinas at P1 (**A**) and P21 (**B**). Each white dot represents one melanopsin-expressing cell. Note also the difference in size of both retinas. Representative micrographs showing the cell densities at P1 (**C**) and at P21 (**D**). Note that the cell density at P21 is lower than at P1. Scale bars: A, B, 750  $\mu\text{m}$ ; C, D, 150  $\mu\text{m}$ .

## No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs

neurotrophic factors secreted retrogradly by target cells. The ability of the neuron to compete for the survival factor will determine whether it survives or undergoes programmed cell death (apoptosis). In particular, many of the retinal neurons die from P2 to P15 (Valenciano et al., 2008). In C3H/He mice it has been described that 70% of RGCs die between P0 and adulthood (Strom and Williams, 1998). Regarding the melanopsin-expressing RGCs, little has been studied to date. Contrary to what some other authors found previously, our study provides

evidence that no significant cell selection occurs after birth for the ipRGCs, a matter that is discussed below.

Sekaran et al. (2005) and Ruggiero et al. (2009) have reported a decrease in melanopsin immunopositive cells per mm<sup>2</sup> from the first postnatal days to adulthood. However, these authors do not seem to take into account that the retinal area increases considerably during postnatal development (a three-fold increase is reported in our results) and analyse their data as absolute values. Surprisingly, our results, which were obtained from



**Fig. 5.** Representative micrographs at PN21 showing some ipRGCs types. **A.** M1a cells have their somata located in the GCL and dendritic processes in the outer margin of the IPL (black arrow). **B.** M1b cells show heavily stained cell bodies located in the amacrine sublayer and dendritic processes in the outer margin of the IPL (black arrows). **C.** Weakly stained cell body located in the amacrine layer and dendritic processes in the outer margin of the IPL. **D.** Histogram showing the percentage of M1a and M1b melanopsin-expressing cells sampled in the retinal sections (mean  $\pm$  SEM) at P5, P11 and P21. No significant differences between both cell subtypes have been detected during postnatal development. GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer. Scale bar: 50  $\mu$ m.

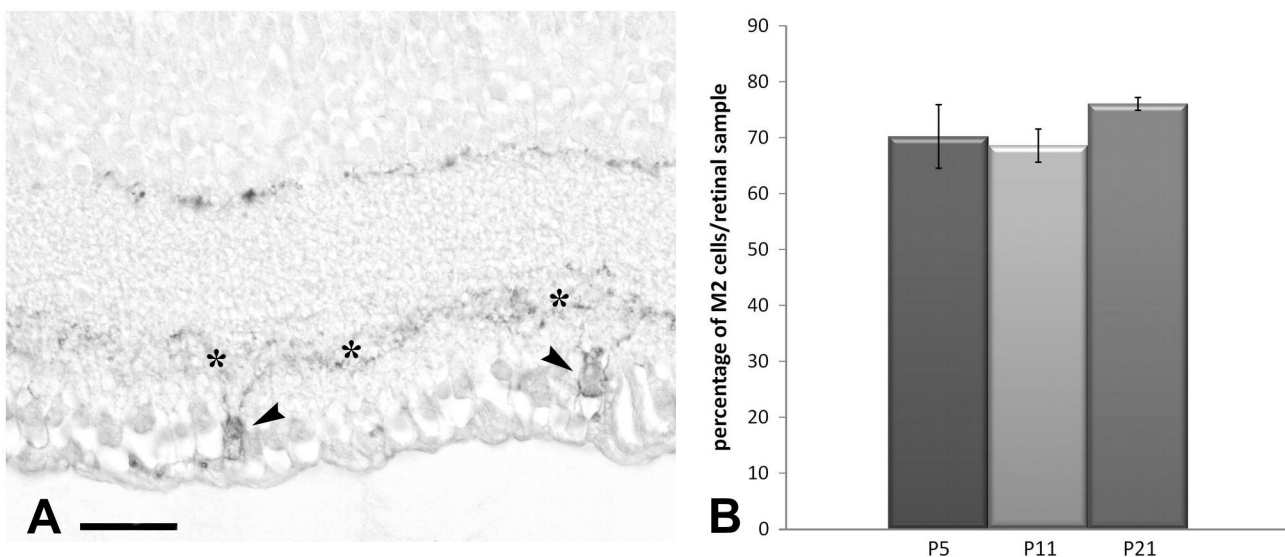
### No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs

retinal samples of the same mouse strain as that studied by Sekaran et al. and do refer to absolute values (immunopositive cells counted in one out of the six series obtained by sectioning the retinas completely and the total number of immunopositive cells when such cells were counted in the whole-mounted retinas), clearly show a rather constant number of melanopsin-expressing ganglion cells during postnatal development from P1 to P21 (160 to 250 immunostained cells/retinal sample, and 1600 to 1800 cells/retina). The three-fold increase of the total retinal area that we measured fits well with the three-fold decrease in cell density reported by Sekaran et al. (2005). The total number of melanopsin-expressing cells does not vary significantly from P1 to P21 and, therefore, a spatial reorganisation of these ipRGCs, rather than cell death, can be hypothesized for these cells during their postnatal development.

Sekaran et al. (2005) also detected a diminution in the density of light-responsive cells during postnatal development using  $Ca^{2+}$  imaging in the presence of carbenoxone to block gap junctions and avoid correlated activity of neighboring non-ipRGCs. Such a decrease was particularly dramatic between P0 and P4. However, according to Tu et al. (2005), data obtained with this methodology during the first two postnatal days, P0 and P1, are not reliable, because in their experiments high doses of carbenoxone could not prevent the activity of the neighboring cells within these postnatal days. Therefore, the decrease in ipRGCs between P0 and P4 observed by Sekaran et al. (2005) might be, at least in part, artifactual.

An important conclusion can be extracted from our finding: the melanopsin-expressing RGCs do not seem to experience significant apoptosis during the postnatal period. It is also known that melanopsin-expressing cells respond to light stimulation from P0 on (Sekaran et al., 2005). Moreover, the SCN responds to light since the very early postnatal period (Muñoz-Llamosas et al., 2000; Lupi et al., 2006), which means that functional connections between the retina and the SCN are established on the day of birth. We can thus infer that neurotrophic selection of melanopsin-expressing RGCs by programmed cell death, if it indeed occurs, might take place earlier than that of the remaining RGCs, which in principle are not involved in the non-image-forming vision. The latter begin to provide information to the central nervous system around P12, once the vertical synaptic connections between rod/cone photoreceptors and ganglion cells become functional (Sernagor et al., 2001).

We also analyzed ipRGCs morphology during postnatal development. In the mouse some ipRGCs have their dendritic processes branching in the sublamina a of the IPL (termed as M1 cells), while others do it in the sublamina b (termed as M2 cells). Different functional roles can be expected for these cells, since their dendritic arborisation is located either in the OFF area or in the ON area of the IPL, respectively (Schmidt and Kofuji, 2009). Some authors have even described a third type of ipRGCs whose dendrites branch in both sublayers (Viney et al., 2007; Schmidt et al., 2008). Although we occasionally found some of these cells, we preferred not to consider them in our analysis due to the difficulty to



**Fig. 6. A.** M2 cells with their somata (arrowheads) located in the GCL and the dendritic processes in the inner margin of the IPL (asterisks). **B.** Histogram showing the percentage of M2 melanopsin-expressing cells sampled in the retinal sections (mean ± SEM) at P5, P11 and P21. No significant differences have been detected during postnatal development. GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## *No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs*

identify them, particularly in the retinal sections. We have observed the evolution of M1 and M2 cells, which showed stable percentages from P5 on. At P21 we detected 22% of M1 cells and 76% of M2 cells. Percentages of the cell types given in previous studies (Hattar et al., 2006; Baver et al., 2008) are difficult to fit with ours. The differences might be due to the use of different mice strains or techniques, or even to the time of the day in which the samples were collected, since the M1/M2 ratio was seen to vary within the 24-hour period (Gonzalez-Menendez et al., 2009). Moreover, we have observed differences in immunostaining intensity, which makes any comparative analysis even more complicated. Hattar et al. (2006), using the tau-lacZ marker gene to detect melanopsin-expressing cells, reported that B6/129 mice do not have ipRGCs that process in the inner margin of the IPL (i.e. M2 cells), hypothesizing that the melanopsin gene expression in these cells could be lower than in M1 cells. This might also be the explanation for the differences we observed in immunostaining intensity in our samples, i. e., the melanopsin expression in pale cells (weakly stained) could be lower than that of dark cells (heavily stained). As shown in our results, most of the M1 cells were dark and most of M2 cells were pale; however, exceptions occurred: for example, only half of the M1b cells (of those whose somata are located in the inner margin of the INL, constituting 10% of the total) were heavily stained. This would explain why Hattar et al. (2006) only detected 5% of immunopositive cells with their somata in the amacrine cell sublayer. Possibly, those showing low intensity of immunostaining in our samples were missed in their study.

In summary, the relevance of our study is to have reported that no apparent loss of ipRGCs occurs within the postnatal developmental period in the mouse. Moreover, the different cell types that express the photopigment melanopsin maintain their ratio from P5 on. These results support the general idea that the system these cells are involved in is functional at the very early postnatal stage. We think this work contributes to a better understanding of the development of the non-image-forming visual system. Further research must be carried out in order to find out the differential roles of the ipRGCs types in both the image-forming and non-image-forming visual systems, as well as their potential involvement in the control of the retinal clock.

---

*Acknowledgements.* The UF006 antiserum was generously donated by Dr. Ignacio Provencio, University of Virginia, USA. The C3H/He mice (Wild-type at the rd locus) were kindly donated by Dr. Russell G. Foster (Oxford University, UK). This study was supported by Grant BFU2006-15576 (from the Spanish Ministry of Science and Innovation) to J.M. G.-F. I. G.-M was supported by fellowship BP07-088 (from the Spanish FICYT).

---

## References

Baver S.B., Pickard G.E., Sollars P.J. and Pickard G.E. (2008). Two

- types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1763-1770.
- Berson D.M., Dunn F.A. and Takao M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070-1073.
- Gonzalez-Menendez I., Contreras F., Cernuda-Cernuda R. and Garcia-Fernandez J.M. (2009). Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front. Cell. Neurosci.* 3:3. doi: 10.3389/neuro.
- Gooley J.J., Lu J., Chou T.C., Scammell T.E. and Saper C.B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 12, 1165.
- Göz D., Studholme K., Lappi D.A., Rollag M.D., Provencio I. and Morin L.P. (2008). Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS ONE* 3, e3153.
- Güler A.D., Ecker J.L., Lall G.S., Haq S., Altimus C.M., Liao H.W., Barnard A.R., Cahill H., Badea T.C., Zhao H., Hankins M.W., Berson D.M., Lucas R.J., Yau K.W. and Hattar S. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102-105.
- Hannibal J., Hindersson P., Knudsen S.M., Georg B. and Fahrenkrug J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J. Neurosci.* 22, 191-197.
- Hatori M., Le H., Vollmers C., Keding S.R., Tanaka N., Buch T., Waisman A., Schmedt C., Jegla T. and Panda S. (2008). Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS ONE* 3, e2451.
- Hattar S., Liao H.W., Takao M., Berson D.M. and Yau K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Science* 295, 1065-1075.
- Hattar S., Lucas R.J., Mrosovsky N., Thompson S., Douglas R.H., Hankins M.W., Lem J., Biel M., Hofmann F., Foster R.G. and Yau K.W. (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76-81.
- Hattar S., Kumar M., Park A., Tong P., Tung J., Yau K.W. and Berson D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326-349.
- Lupi D., Sekaran S., Jones S.L., Hankins M.W. and Foster R.G. (2006). Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4<sup>-/-</sup>) mice: a developmental study. *Chronobiol. Int.* 23, 167-179.
- Muñoz-Llamosas M., Huerta J.J., Cernuda-Cernuda R. and García-Fernández J.M. (2000). Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 15, 1-6.
- Panda S., Sato T.K., Castrucci A.M., Rollag M.D., DeGrip W.J., Hogenesch J.B., Provencio I. and Kay S.A. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-2216.
- Panda S., Provencio I., Tu D.C., Pires S.S., Rollag M.D., Castrucci A.M., Pletcher M.T., Sato T.K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S.A., Van Gelder R.N. and Hogenesch J.B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525-527.

*No postnatal loss of melanopsin-expressing RGCs*

- Ruby N.F., Brennan T.J., Xie X., Cao V., Franken P., Heller H.C. and O'Hara B.F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-2213.
- Ruggiero L., Allen C.N., Brown R.L. and Robinson D.W. (2009). The development of melanopsin-containing retinal ganglion cells in mice with early retinal degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 29, 359-367.
- Schmidt T.M. and Kofuji P. (2009). Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29, 476-482.
- Schmidt T.M., Taniguchi K. and Kofuji P. (2008). Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J. Neurophysiol.* 100, 371-84.
- Sekaran S., Lupi D., Jones S.L., Sheely C.J., Hattar S., Yau K.W., Lucas R.J., Foster R.G. and Hankins M.W. (2005). Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr. Biol.* 15, 1099-1107.
- Sernagor E., Eglon S.J. and Wong R.O. (2001). Development of retinal ganglion cell structure and function. *Prog. Retin. Eye. Res.* 20, 139-174.
- Strom R.C. and Williams R.W. (1998). Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number. *J. Neurosci.* 18, 9948-9953.
- Tu D.C., Zhang D., Demas J., Slutsky E.B., Provencio I., Holy T.E. and Van Gelder R.N. (2005). Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 48, 987-999.
- Valenciano A.I., Boya P. and de la Rosa E.J. (2008). Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int. J. Dev. Biol.* 52. doi: 10.1387/ijdb.072446av.
- Viney T.J., Balint K., Hillier D., Siegert S., Boldogkoi Z., Enquist L.W., Meister M., Cepko C.L. and Roska B. (2007). Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr. Biol.* 17, 981-988.

Accepted August 27, 2009

# Postnatal Development and Functional Adaptations of the Melanopsin Photoreceptive System in the Albino Mouse Retina

Irene González-Menéndez,<sup>1</sup> Felipe Contreras,<sup>1</sup> Rafael Cernuda-Cernuda,<sup>1</sup> Ignacio Provencio,<sup>2</sup> and José M. García-Fernández<sup>1</sup>

**PURPOSE.** To study the melanopsin system of the albino CD1 mouse retina during postnatal development.

**METHODS.** Pups were kept under different ambient conditions: light/dark (LD) cycles, constant light (LL), constant darkness (DD), LL followed by LD, and DD followed by LL. Using immunohistochemistry, melanopsin-expressing cells were classified as M1 or M2 according to the location of their somata and dendritic processes and were counted.

**RESULTS.** Under LD cycles an increase in the number of immunoreactive cells was observed within the first week of postnatal development. When mice were maintained in DD, the increase in the number of immunopositive cells detected was significantly higher than that in LD. On the contrary, when mice were exposed to LL within the same period, no increase was detected. To determine whether the effect of LL during the early postnatal period was reversible, the authors studied animals born in LL and subsequently maintained under LD cycles. After 3 days in LD, these animals showed a significant increase in melanopsin cell number. However, after 1 month in LD, the number was similar to that of the LD controls. Surprisingly, when mice born in DD were exposed to LL, no decrease was detected, though the immunostaining was of low intensity.

**CONCLUSIONS.** The amount of melanopsin protein per cell varies, depending on ambient light conditions. Periods of darkness or, more likely, the sequence of light and dark periods occurring under the daily cycles might be necessary for the normal development of the melanopsin system. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:4840–4847) DOI:10.1167/iovs.10-5253

The vertebrate eye mediates both image-forming and non-image-forming photoreception. Image-forming photoreception (vision) enables the animal to detect and track objects in the environment, whereas non-image-forming photoreception is responsible for the measurement of ambient irradiance,

so that, for example, the internal circadian biological clock can be synchronized with the astronomical day, a process called photoentrainment.<sup>1,2</sup> The hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN), which is considered the central circadian pacemaker of mammals, is adjusted on a daily basis to the environmental light/dark cycle<sup>1</sup> by the detection of light by melanopsin-expressing, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs).<sup>3–6</sup> Such ipRGCs transmit this light information to the SCN by way of the retinohypothalamic tract.<sup>7,8</sup> These cells also project to other brain areas involved in pupil constriction, promotion of sleep, gaze control, image-forming vision, and other activities.<sup>9</sup> Moreover, ipRGCs constitute the principal conduits for rod-cone input involved in non-image-forming responses, including circadian photoentrainment.<sup>10</sup> In fact, the destruction of these cells altered the effects of light on circadian rhythms.<sup>10–12</sup> Therefore, the rod and cone photoreceptors and the ipRGCs are complementary in providing signals for nonvisual photoreceptive functions.

In mice, at least 70% of the RGCs generated during retinal development die through programmed cell death during the postnatal period<sup>13</sup>; however, as we previously demonstrated in pigmented mice, no diminution in the number of melanopsin-expressing cells occurs during postnatal development.<sup>14</sup> ipRGCs are responsive to light from birth.<sup>15,16</sup> Moreover, the SCN begins to function as a circadian pacemaker during late fetal development.<sup>17</sup> Depending on the intensity of the stimulus, light was able to induce expression of the immediate early gene *cfos* in the SCN at postnatal day (P) 0 to P1<sup>18</sup> or at P4.<sup>19</sup> Taken together, these data indicate that the melanopsin-based system is functional as early as the day of birth.

Previous studies have demonstrated that melanopsin expression shows daily oscillation.<sup>20–22</sup> Such rhythm was also demonstrated in neonatal albino rats and neonatal pigmented mice,<sup>22,23</sup> when rods and cones are not yet fully developed. Hannibal et al.<sup>21</sup> and Mathes et al.,<sup>24</sup> using albino rats, also reported differential regulation of melanopsin expression in response to continuous darkness (DD) or continuous light (LL). Such changes in melanopsin expression were also detected in albino rat pups.<sup>23</sup> This suggests that ipRGCs can adapt their responsiveness to the external illumination conditions by regulating their melanopsin content even in the absence of functional rod-cone photoreceptors.

Among the ipRGCs, two main morphologic types have been previously identified: M1 cells, with their dendritic arborization in the OFF sublayer of the inner plexiform layer (IPL), and M2 cells, with their dendrites forming a plexus in the ON sublayer of the IPL. Recently, two isoforms of melanopsin, *Opn4S* and *Opn4L*, have been identified. M1 cells express both melanopsin isoforms, whereas M2 cells express only the *Opn4L* isoform.<sup>25</sup> Different electrophysiological responses,<sup>26</sup> as well as different brain projections,<sup>27</sup> were reported for these two cell subpopulations. In a previous study,<sup>22</sup> we detected a

From the <sup>1</sup>Department of Morphology and Cell Biology, Oviedo University, Oviedo, Spain; and the <sup>2</sup>Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia.

Supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grant BFU2006-15576 (JMFG), National Institutes of Health Grant R01 NS052112 (IP), and Spanish FICYT Fellowships BP07-088 (IGM) and BP09-081 (FC).

Submitted for publication January 22, 2010; revised March 5 and 22, 2010; accepted April 2, 2010.

Disclosure: I. González-Menéndez, None; F. Contreras, None; R. Cernuda-Cernuda, None; I. Provencio, None; J.M. García-Fernández, None

Corresponding author: José M. García-Fernández, Department of Morphology and Cell Biology, Laboratory 8.3, C/ Julián Clavería, Oviedo 33006, Asturias, Spain; jmfg@uniovi.es.

different daily oscillation for M1 and M2 cells that was already present in the early postnatal period.

Albino animals are often used as models in numerous studies concerning the retina, despite the fact that most mutations causing albinism provoke anomalous retinal development, including lower numbers of rods, incomplete development of the central retina, and chiasmatic abnormalities.<sup>28</sup> Therefore, it should be taken into account that results obtained in albino models are not fully comparable with those of pigmented animals.

To better understand the development of the ipRGCs, the present study analyzed for the first time in albino mice these cells and their main subpopulations within the postnatal period under standard 12-hour light/12-hour dark cycles. Furthermore, the effects of exposure to constant light or constant darkness on the postnatal development of these cells were also studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Experimental Design

Pregnant female albino mice (CD1; Charles River Laboratories, Malvern, PA) were used in the present study. All animals were maintained in the central animal care facilities under constant temperature conditions ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), fed with standard food and tap water ad libitum. Pregnant females were subjected to a 12-hour light/12-hour dark cycle (LD). Three days before the estimated date of delivery, a group of females continued under LD conditions, whereas others were kept under constant light (LL) or constant darkness (DD). The illumination source for LD or LL conditions was a white light fluorescent lamp, so that the animals were exposed to an intensity of  $200 \pm 60$  lux at cage level. This intensity of light was sufficient to stimulate the melanopsin system and prevent possible damage of the retina by prolonged exposure to light. Pups were maintained with their mothers under the quoted ambient conditions (LD, LL, and DD) within the post-

natal period. Five ages were analyzed: 1, 5, 8, 11, and 21 days (Fig. 1, experiment 1). In addition, we analyzed the retinas of pigmented C3H/He pups exposed to LL to compare the postnatal development of both strains under such conditions. The experiment carried out was identical with that in albino pups (Fig. 1, experiment 1, LL). In a previous paper we studied the postnatal development of the melanopsin ganglion cells of C3H/He mice under LD conditions.<sup>14</sup> Four animals per group (age and ambient condition) were analyzed.

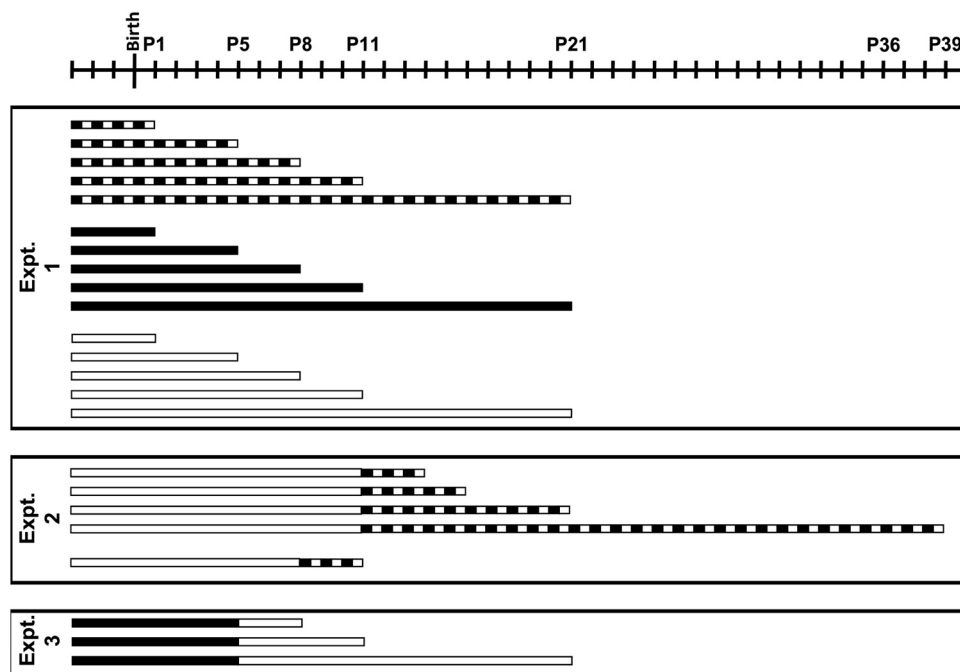
To study whether the effect of constant light was or not reversible in the albino pups, they were maintained under LL until P11 and then were subjected to several LD cycles: 3, 5, 10, and 28. Another albino group was under LL until P8 and then was exposed to 3 LD cycles (Fig. 1, experiment 2). To analyze the effect of constant light in the developed melanopsin system, albino animals were exposed to DD until P5 and then were maintained under LL conditions for 3, 6, and 16 days (Fig. 1, experiment 3).

### Tissue Preparation

All the animals were killed by decapitation 3 hours after the lights were on. To minimize pain, animals were anesthetized before euthanatization. All the experimental and animal handling procedures complied with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Tissue preparation and melanopsin immunohistochemistry were performed using the UF006 anti-mouse melanopsin polyclonal antibody (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) and the avidin-biotin-peroxidase method (Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA), as described in detail previously.<sup>14,22</sup>

### Cell Classification and Counting

Retinal sections were observed in a bright-field microscope (Eclipse E400; Nikon, Tokyo, Japan). Immunopositive cells were classified as M1 or M2 according to the location of their soma and dendritic processes. Somata were counted across the entire length of each retinal section of the series (1 of 6 parallel series per retina was used).



**FIGURE 1.** Representation of the experiments and the different light treatments performed. Experiment 1 under LL conditions was also carried out in pigmented mice. The periods of light and darkness were drawn in white and dark colors, respectively. The days of birth and sample collection are indicated above. Note that pregnant females were subjected to different ambient conditions 3 days before the estimated day of delivery.



## Statistical Analysis

Statistical software (SPSS 15; SPSS, Chicago, IL) was used for all the statistical analyses. The Kolmogorov-Smirnov test was used to confirm the normality of the data. The homogeneity of the variances was assessed with Levene's test. Student's *t*-tests were performed when comparing two groups. To detect possible differences between groups throughout the postnatal period, factorial ANOVA tests were performed. One-way ANOVA tests were used to analyze the total number of melanopsin-immunopositive cells throughout postnatal development, the recovery detected after LL, and the effect of LL after DD. To detect differences between specific time points, post hoc tests were performed. To detect possible differences between M1 and M2 cell subpopulations, factorial ANOVA tests were performed. Additional one-way ANOVA tests were performed separately for M1 and M2 cells. Post hoc tests were also performed for each cell subpopulation. The number of melanopsin-expressing cells per retinal sample was presented as mean  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Melanopsin immunoreactivity could be detected in somata, dendrites, and proximal segments of axons. M1 and M2 cell subpopulations (Figs. 2A–E) were identified according to the location of the somata and dendritic processes. M1 cells showed robust dendritic arborization in the outer margin of the IPL (OFF sublayer). Most of the M1 cells, which frequently were heavily stained, had somata located in the ganglion cell layer (GCL), whereas other somata were seen in the inner margin of the inner nuclear layer (INL). M2 cells usually were weakly stained and had somata located in the GCL. Their dendritic processes were finer and more numerous than those of M1 cells and were placed in the inner margin of the IPL (ON sublayer).

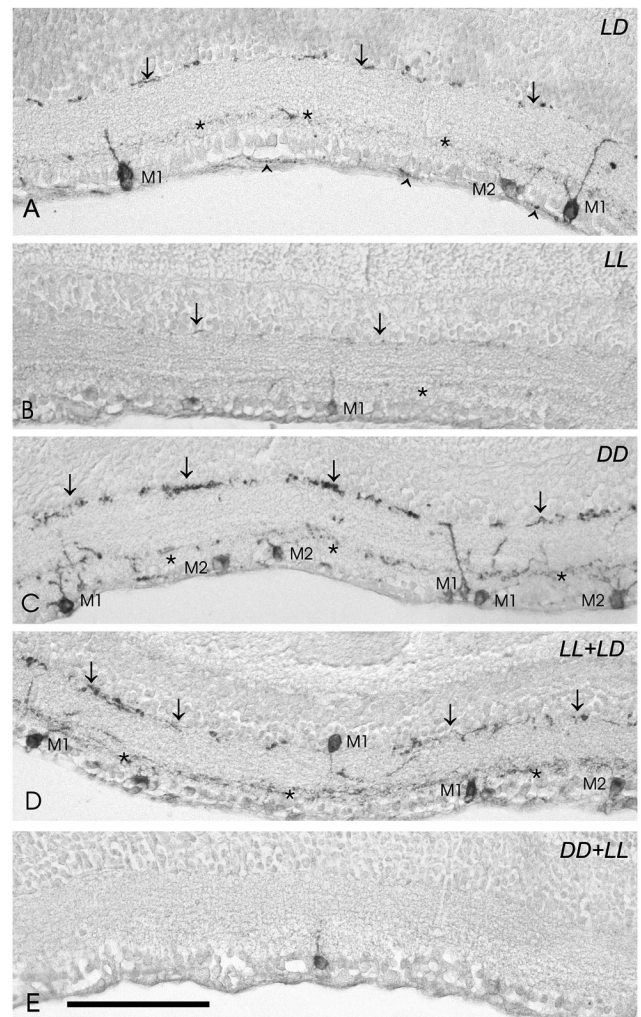
### Postnatal Development of Albino Mice Retinas

Factorial ANOVA revealed an interaction between “ambient conditions” and “postnatal day” ( $P < 0.001$ ), which indicates that the number of immunostained cells differed significantly within the postnatal period, depending on the ambient light conditions to which the animals were subjected.

Under the standard LD cycle, melanopsin immunostaining was present since P1. Although at this stage the number of melanopsin immunoreactive cells was small and the staining seemed relatively weak compared with later stages, some melanopsin-containing cells had already formed dendritic processes in the IPL. From P8 onward, two plexuses could be observed (Fig. 2A). One-way ANOVA revealed that the number of melanopsin-expressing cells varied significantly ( $P < 0.001$ ) throughout the postnatal period. Post hoc tests detected a progressive increase in the number of these cells from P5 to P8 ( $P < 0.01$ ; Fig. 3). Later, the number of immunostained cells reached the maximum values, ranging in a narrow interval (200–250 cells per retinal sample) in the remaining ages analyzed.

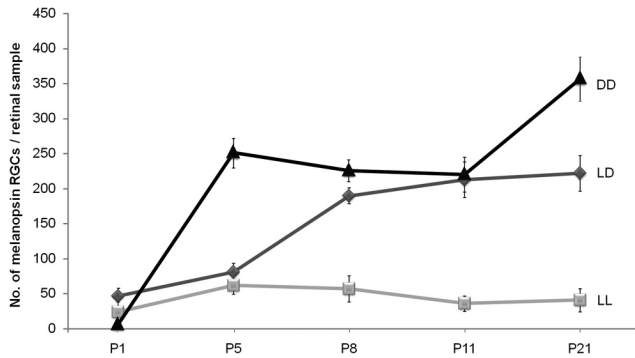
Under LL no variation in the number of immunoreactive cells was detected in the ages studied (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ). Under these LL conditions, the count remained around 30 to 50 cells/retinal sample during the whole postnatal development (Fig. 3). Both ON and OFF plexuses could be observed under LL, but the dendritic network was much less extensive (Fig. 2B) than under LD conditions.

When animals were exposed to DD, a significant increase in immunopositive cells was detected between P1 and P5 ( $P < 0.001$ ) and between P11 and P21 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3). At the end of the postnatal period (P21), these DD mice showed a higher number of immunostained cells than the LD controls (Student's



**FIGURE 2.** Representative micrographs of retinas immunostained with the UF006 anti-melanopsin antibody corresponding to mice (P21) maintained under five different conditions of illumination and darkness. (A) Retina of a mouse kept under LD conditions. Three immunostained cells can be seen: two M1 cells (with dendritic arborization in the OFF sublayer) and one M2 cell (with dendritic arborization in the ON sublayer). Some axons also showed melanopsin immunostaining (arrowheads). (B) The retina of a mouse kept under LL conditions shows a low number of melanopsin-expressing cells; only one M1 cell soma and diminished dendritic processes can be observed. Note that the OFF plexus shows a low number of dendrites, and the ON plexus is barely detectable. (C) Under DD conditions, a higher number of immunopositive cells can be seen in the retina. This micrograph shows four M1 cells and three M2 cells. In addition, an increase of dendritic immunostaining is observed. (D) Although melanopsin immunostaining was low after exposure to LL, a recovery in the number of immunopositive somata and dendritic processes was detected when the LD conditions were restored. The micrograph shows three M1 cells and one M2 cell. (E) Progressive diminution in staining intensity of the dendritic network and somata was detected in pups kept 5 days under DD and then subjected to LL. This micrograph shows an immunopositive soma. The dendritic plexuses are not observed and, therefore, M1 and M2 cells cannot be identified. Asterisks and arrows: inner and outer immunostained plexuses of the IPL, respectively. Scale bar, 100  $\mu$ m.

*t*-test;  $P < 0.05$ ). One-way ANOVA revealed significant differences during postnatal development ( $P < 0.001$ ). Melanopsin expression seemed to be stimulated by exposure to DD. In addition, the number of dendrites detected in the immunolabeled plexuses was much higher than that observed in the LD controls (Fig. 2C).



**FIGURE 3.** Number of immunopositive cells during postnatal development under LD, LL, and DD cycles. One-way ANOVA for LD revealed a significant increase in the number of melanopsin-expressing cells throughout the postnatal period ( $P < 0.001$ ). No significant differences were detected under constant light conditions ( $P > 0.05$ ). However, in animals maintained under DD conditions, the number of immunostained cells increased significantly in two intervals: P1 to P5 and P11 to P21 (one-way ANOVA;  $P < 0.001$ ).  $n = 4$  animals per group.

### Postnatal Development of M1 and M2 Cells under LD, LL, or DD Conditions

When M1 cells under LD, LL, and DD conditions were compared, factorial ANOVA did not reveal significant differences among groups ( $P > 0.05$ ). That is, M1 cells behaved similarly under different ambient conditions. Factorial ANOVA did detect significant differences ( $P < 0.001$ ) for the M2 cell subpopulation, which showed different response patterns depending on the light treatment. Indeed, the M2 cells seemed to be the only ones affected by the different ambient conditions.

When M1 and M2 cell subpopulations were analyzed separately under LD conditions, one-way ANOVA tests performed revealed significant increases for M1 ( $P < 0.05$ ) and for M2 ( $P < 0.001$ ) cells. Post hoc tests detected an increase between P5 and P8 in both subpopulations ( $P < 0.01$ ; Fig. 4A). M2 cells were more abundant than M1 cells, as revealed by Student's *t*-tests performed to compare them in parallel at the same postnatal day (P5,  $P < 0.05$ ; P8,  $P < 0.01$ ; P11 and P21,  $P < 0.001$ ).

M1 and M2 cells were also analyzed in animals subjected to LL. One-way ANOVA tests did not detect any variation in the number of each cell type during the postnatal period ( $P > 0.05$ ; Fig. 4B).

When animals were subjected to DD, one-way ANOVA detected that the number of M2 cells increased at the end of this period ( $P < 0.01$ ), whereas the number of M1 remained constant (Fig. 4C).

### Postnatal Development of Pigmented Mouse Retinas

In a previous report we demonstrated that under LD conditions, no change in the number of melanopsin-expressing cells was detected during postnatal development.<sup>14</sup> The number of melanopsin-positive cells ranged between 160 and 250 per retinal sample.

Under LL no variation in the number of immunoreactive cells was detected (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ) from P1 to P21. Also, the number of melanopsin-positive cells of this LL group, which ranged between 215 and 266 per retinal sample, was similar to that of the LD controls of the previous study (Student's *t*-test,  $P > 0.05$  at all the comparisons between LL and LD groups).

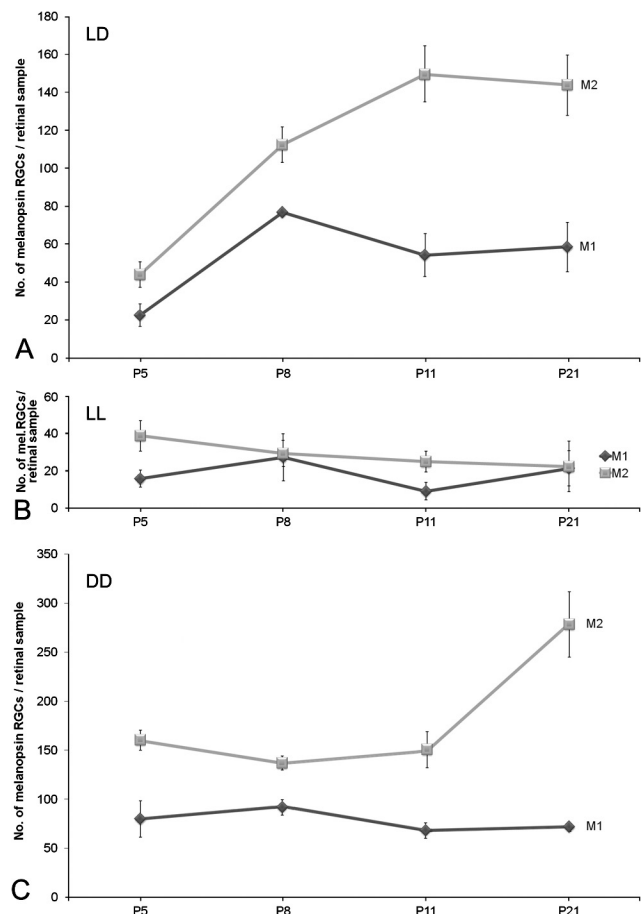
Factorial ANOVA test did not reveal interaction between ambient condition and postnatal day, which means that both

groups (LL and LD) behaved similarly throughout the postnatal period analyzed.

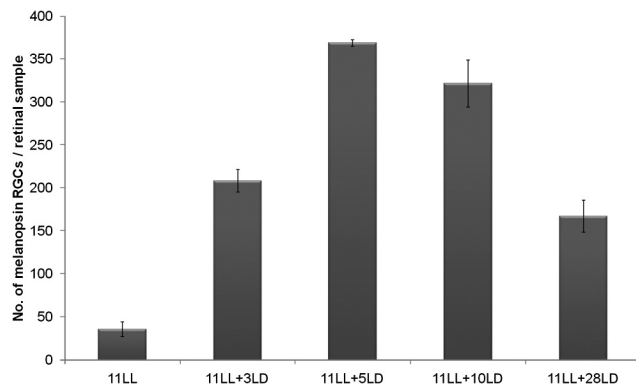
### Exposure of Albino Mice to LL Followed by LD Cycles

To examine whether the melanopsin system could be restored after being exposed to LL, albino animals were subjected to LL from the day of birth to P11 (when rods and cones start to be functional) followed by 3, 5, 10, or 28 LD cycles.

After keeping animals 11 days in LL plus 3 days in LD cycles, the number of immunopositive cells increased significantly (fourfold increase;  $P < 0.001$ ; Fig. 5). Immunoreactive processes were more numerous and showed more intense staining. After 5 LD cycles the number of immunopositive somata was even higher ( $P < 0.001$ ), which suggests that the increase was time dependent. Dense dendritic plexuses comparable to those seen in mice exposed to DD could be observed in the IPL (Fig. 2D). After 10 LD cycles (post-LL), the values did not increase further ( $P > 0.05$ ). Finally, after 28 LD cycles (post-LL), the number of melanopsin cells decreased ( $P > 0.001$ ),



**FIGURE 4.** (A) Development of M1 and M2 cells under LD conditions. No global differences were detected (factorial ANOVA;  $P > 0.05$ ). One-way ANOVA performed separately for each subpopulation revealed significant increases in number for M1 ( $P < 0.05$ ) and for M2 ( $P < 0.001$ ) cells. Both subpopulations showed an initial parallel increase between P5 and P8 ( $P < 0.01$ ). (B) Postnatal development of M1 and M2 cells under LL conditions. No global differences were detected (factorial ANOVA;  $P > 0.05$ ). (C) M1 and M2 cells under DD. M1 cell number did not change during development, whereas M2 cell number showed a significant increase at the late postnatal period ( $P < 0.01$ ).  $n = 4$  animals per group.

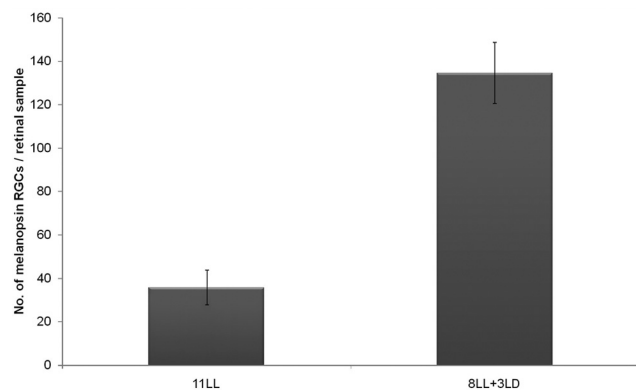


**FIGURE 5.** Increase in the number of melanopsin-immunopositive cells in animals maintained in LD conditions after a period of exposure to LL. One-way ANOVA showed significant differences after the LD periods ( $P < 0.001$ ).  $n = 4$  animals per group.

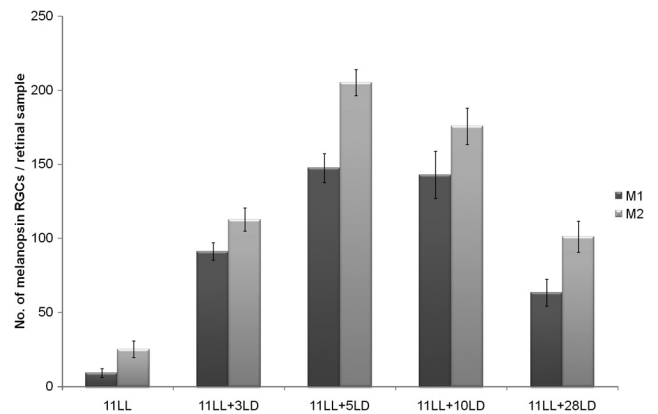
and the values were comparable to those in untreated animals (LD controls).

Therefore, changes induced by continuous light on the melanopsin system in the early postnatal period seemed to be reversible. Assuming that until P11 rods and cones were not fully developed, we intended to examine the recovery of the melanopsin system independently of rod-cone inputs.<sup>29</sup> Animals were exposed to LL from the day of birth to P8, followed by 3 LD cycles. In this group an increase in the number of immunopositive cells ( $P < 0.001$ ; Fig. 6) was detected in response to the LD cycles. Within this period, the ipRGCs are the only functional photoreceptors in the retina, which means that these cells are capable in the absence of rods and cones. However, the cell number increase observed under 8 days in LL + 3 LD cycles was less than that observed after 11 days in LL + 3 LD cycles ( $P < 0.01$ ), suggesting that in the presence of functional rods and cones, recovery is somewhat faster.

In addition, we analyzed the recovery of this non-image-forming vision mediated by the M1 and M2 cell subtypes. After 11 days under LL conditions and 3, 5, 10, and 28 LD cycles, factorial ANOVA showed that M1 and M2 cells behaved similarly ( $P > 0.05$ ). Post hoc tests detected that both subtypes increased gradually until 11 days under LL plus 5 days in LD cycles ( $P < 0.001$ ; Fig. 7). Then a significant diminution of both subtypes after 28 LD cycles could be observed ( $P <$



**FIGURE 6.** Effect of exposure to three LD cycles after 8 days in LL on the melanopsin-expressing cell number in the early postnatal period, when pathways of rod-cone photoreceptors are not functional. Student's *t*-test detected significant differences ( $P < 0.001$ ) between the two ambient lighting conditions.  $n = 4$  animals per group.



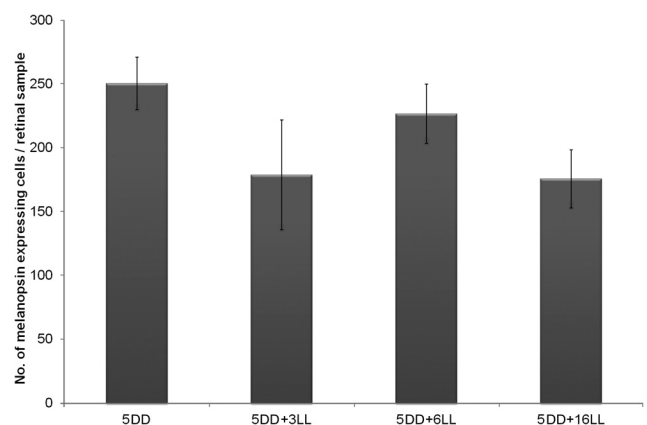
**FIGURE 7.** Increase in the number of M1 and M2 cells under LD after the severe decrease induced by LL. Both cell subpopulations showed an increase in numbers during the first days of the LD period ( $P < 0.001$ ). Afterward a decrease ( $P < 0.001$ ) was observed, and the values reached the standard ones observed in the LD controls.  $n = 4$  animals per group.

0.001). At this time, no differences in M1 and M2 cells were detected between 11 days LL + 28 LD cycles and animals that have been maintained only under LD conditions. M1 and M2 cells were also analyzed after 8 days LL + 3 LD cycles, and post hoc tests detected a similar increase of M1 and M2 cells.

#### Exposure of Albino Mice to DD Followed by LL

At P5, mice kept under DD conditions showed a high number of positive cells. To determine whether LL was able to inhibit melanopsin expression during postnatal development, mice were kept under DD until P5 and then were exposed to LL for 3, 6, and 16 days. Surprisingly, after 16 LL cycles, we did not detect a diminution in the number of immunostained cells ( $P > 0.05$ ; Fig. 8). However, the intensity of staining was very weak, particularly in the dendrites, which were barely visible (Fig. 2E).

M1 and M2 cells were also analyzed after 5 days under DD plus 3–6 days under LL, and factorial ANOVA revealed that both cell subpopulations behaved similarly ( $P > 0.05$ ). When one-way ANOVA was performed separately for M1 and M2 cells, no changes in the number of cell subtypes were detected ( $P > 0.05$ ). M1 and M2 cell numbers could not be analyzed after 5 days under DD plus 16 days under LL because of the



**FIGURE 8.** Effect of LL exposure after 5 days in DD. No decrease in the number of immunopositive cells was detected (one-way ANOVA test;  $P > 0.05$ ).  $n = 4$  animals per group.

absence of two well-defined plexuses. In this group, only the somata were clearly immunolabeled.

## DISCUSSION

Within the past decade, the role of melanopsin-expressing RGCs in image-forming and non-image-forming photoreceptive processes has been a matter of thorough study. The ipRGCs contribute to circadian photoentrainment but have also other important functional roles, such as the promotion of sleep and the control of pupil diameter.<sup>2</sup>

Classically, it was believed that pups were indirectly synchronized to external cues through melatonin present in maternal milk<sup>30,31</sup>; however, there are many findings suggesting that the melanopsin system is indeed active at very early stages. Tarttelin et al.<sup>32</sup> found evidence of melanopsin transcripts in the mouse retina as early as embryonic day 10.5. This means that melanopsin is expressed much earlier than rod and cone opsins, which appear in the postnatal period.<sup>33</sup> In addition, it has been shown that as early as P1, melanopsin immunoreactivity was present in retinal ganglion cells.<sup>14,15,29,34</sup> Additionally, it is known that melanopsin-expressing cells respond to light at birth<sup>15</sup> and it has been reported that the SCN is photically responsive in an intensity-dependent manner from the day of birth<sup>18</sup> or from P4 on.<sup>19</sup> This means that functional connections between the retina and the SCN are already established on the day of birth, when classical photoreceptors are not functional. In a previous study we detected that the number of melanopsin-expressing cells in pigmented mice does not change significantly during the postnatal period.<sup>14</sup> Taken together, these data indicate that melanopsin-expressing cells, which are principal elements of the non-image-forming photoreceptive system, are functional during early postnatal development.

Under LD conditions, we detected an increase in the number of melanopsin-expressing cells during the early postnatal period of albino CD1 mice. Fahrkrug et al.<sup>34</sup> showed that the immunostaining intensity and the number of melanopsin-positive cells increased during the postnatal development of the albino Wistar rat, which is in agreement with our findings on a different albino rodent model.

When pups were maintained under LL conditions, a lower number of melanopsin-immunoreactive RGCs was detected relative to LD controls, which showed an increase. On the contrary, when newborn mice were kept under DD, the number of immunopositive cells increased significantly compared with the LD controls. Moreover, differences in the immunolabeling of the dendrites were also detected. During DD melanopsin immunoreactive dendrites formed an extensive network that could fulfill the requirements for a broad-capture photoreceptive system, whereas during LL melanopsin immunoreactive dendrites were limited to the somata and proximal dendrites. These results agree with those of Hannibal et al.<sup>21,23</sup> and Mathes et al.<sup>24</sup> in albino rats, who reported a diminution of melanopsin protein and mRNA under LL and an increase under DD. Changes in the number of melanopsin-immunoreactive cells and dendritic network that we observed in LL and DD conditions suggest a functional adaptation of the retina to the external illumination conditions. This regulation at such early developmental stages must necessarily be due to melanopsin-expressing RGCs. Schmidt et al.<sup>29</sup> detected synaptically driven light responses in the ipRGCs that were evoked by cone/rod pathways by the second postnatal week (P11–P14). Some of our observations were made at ages when rod-cone pathways are not yet functional (P1, P5, P8), indicating that melanopsin-expressing RGCs are capable of adapting their responsiveness to ambient lighting conditions even in the absence of the

classical photoreceptors, likely through their inherent photosensitivity. Differences in the number of immunopositive cells among LD, LL, and DD groups could be attributed to the amount of melanopsin protein per cell. However, pigmented mice (C3H/He) raised under LL conditions from birth did not show a decrease in the number of immunopositive cells. Therefore, we hypothesized that such melanopsin suppression might be associated with albinism. However, both strains have genetically different backgrounds (i.e., the mutation causing albinism is not the only difference between them); thus, additional data on other strains are needed to elucidate this issue.

The present work analyzes for the first time the postnatal development of M1 and M2 cells in albino mice, which are the main subpopulations recognized among the melanopsin-expressing RGCs.<sup>26,27</sup> All previous studies in albino models were conducted in rats,<sup>20,21,23,34</sup> in which only one of the two cell subpopulations mentioned has been reported to date, corresponding to the mouse M1 cells. Under LD conditions, we analyzed the development of M1 and M2 cells from P5 through P21, and the ratio of the two cell types changed through the postnatal period. Under LL conditions, we did not detect any change in the number of M1 and M2 cells. Under DD conditions, an increase in both cell types was observed; however, M2 cells showed a higher number than M1 cells. Such differences in the M1/M2 ratio might be attributed to daily fluctuations given the fact that in a previous study in pigmented mice, we detected a daily oscillation of both cell types from P5 on.<sup>22</sup>

In the present study we demonstrated that the melanopsin system can be restored by simply reestablishing standard LD conditions after inhibition by continuous light. Therefore, as we mentioned previously, the low number of melanopsin-expressing cells detected under LL seems to have resulted from an inhibition of the melanopsin system during early development or from a decrease of melanopsin protein per cell, perhaps because of a light-dependent degradation of the protein or a light-dependent downregulation of melanopsin transcription or translation. It should be noted that our results, which agree with those of Hannibal et al.<sup>21</sup> in Wistar adult rats were obtained in mouse pups at very early postnatal stages, when rods and cones were not yet functional. This led to the conclusion that there is a light-mediated intrinsic response from these melanopsin-expressing cells. However, this recovery is somewhat faster when rod-cone photoreceptors are fully developed (at P11, they start to be functional). Therefore, rod-cone input might also contribute to the response detected in the melanopsin-expressing cells. Interactions of the ipRGCs with the rod-cone pathways were reported previously. Melanopsin-expressing RGCs were shown to synapse with both bipolar and amacrine cells,<sup>35,36</sup> which indicates interactions with the rod-cone pathway. Moreover, Güler et al.<sup>10</sup> have demonstrated that melanopsin-expressing RGCs are the principal conduits for rod-cone input to the non-image-forming vision. Our data reinforce the idea that classical photoreceptors and melanopsin interact actively.

Finally, the duration of the LD period (after LL exposure) also seems important. We found that 2 weeks are required to reach the standard levels observed in the LD controls. At the end of the LD period, the values of both M1 and M2 cell subpopulations in the LL+LD group were similar to those of the LD group. Our experiments demonstrate that the effects of constant light exposure on the ipRGC postnatal development can be reverted if the animals are maintained in a period of LD cycles. However, Canal-Corretger et al.<sup>37</sup> reported that albino mice raised in an environment of continuous light during the first days of life showed normal functioning of the suprachiasmatic nucleus but that these mice manifest a significant decline

in photic visual sensitivity (i.e., continuous light during postnatal development affects visual perception of mice).

Surprisingly, when newborn mice were kept in constant darkness and maintained under LL conditions afterward, the expected decrease in the number of melanopsin-immunostained cells was not observed. However, the intensity of immunolabeling was lower, and dendritic arborization was not seen.

As mentioned, differences observed between albino and pigmented mice under LL might be related to albinism. It is known that albinism provokes a delay in retinal development,<sup>38</sup> and, in fact, we have observed that the development of the melanopsin system of albino mice is delayed with regard to C3H/He mice. However, as shown in Results, LL did not provoke a decrease in the number of melanopsin-expressing cells in P5 albino mice that were previously exposed to DD. Hence, we suggest that the inhibition of melanopsin expression detected might be an effect of LL on a yet immature retina. If this is the case, delayed development makes this strain a very interesting model in which to study the influence of ambient illumination on the melanopsin photoreceptive ganglion cells at the early postnatal period.

Albino mice kept in LL since P1 showed a low number of melanopsin-immunostained cells compared with those exposed to LD/DD. These data suggest that darkness is somehow necessary for the development of the melanopsin system. As we have shown, exposure to LD cycles also restored the melanopsin expression previously inhibited by LL, which again points to the periods of darkness as responsible for the recovery. Therefore, periods of darkness or, more likely, the sequence of light/dark periods taking place under LD conditions may be necessary for the proper development of the melanopsin system.

The complex physiology of the photosensitive RGCs and the attendant signal pathways undoubtedly require further investigation with a multidisciplinary approach. Here we provide an initial analysis of the development and responsiveness of these cells in an albino mouse strain. New experiments will be carried out in the short term to understand more deeply the effects of ambient illumination on the murine melanopsin system during perinatal life.

## References

- Foster RG, Hankins MW. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:507-527.
- Fu Y, Liao HW, Do MT, Yau KW. Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15:415-422.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 2002;295:1070-1073.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Science.* 2002;295:1065-1075.
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, et al. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science.* 2002;298:2213-2216.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, et al. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science.* 2002;298:2211-2213.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci.* 2001;12:1165.
- Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci.* 2002;22:191-197.
- Hattar S, Kumar M, Park A, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 2006;497:326-349.
- Güler AD, Ecker JL, Lall, GS, et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature.* 2008;453:102-105.
- Göz D, Studholme K, Lappi DA, Rollag MD, Provencio I, Morin LP. Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS ONE.* 2008;3:e3153.
- Hatori M, Le H, Vollmers C, et al. Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS ONE.* 2008;3:e2451.
- Strom RC, Williams RW. Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number. *J Neurosci.* 1998;18:9948-9953.
- Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Garcia-Fernandez JM. No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina. *Histol Histopathol.* 2010;25:73-82.
- Sekaran S, Lupi D, Jones SL, et al. Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol.* 2005;15:1099-1107.
- Tu DC, Zhang D, Demas J, et al. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron.* 2005;48:987-999.
- Reppert SM, Schwartz WJ. The maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci.* 1986;6:2724-2729.
- Lupi D, Sekaran S, Jones SL, Hankins MW, Foster RG. Light-evoked FOS induction within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of melanopsin knockout (Opn4<sup>-/-</sup>) mice: a developmental study. *Chronobiol Int.* 2006;23:167-179.
- Muñoz-Llamas M, Huerta JJ, Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM. Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;15:1-6.
- Sakamoto K, Liu C, Tosini C. Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci.* 2004;24:9693-9697.
- Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci.* 2005;27:147-155.
- Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Garcia-Fernandez JM. Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front Cell Neurosci.* 2009;3:3.
- Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Melanopsin changes in neonatal albino rat independent of rods and cones. *Neuroreport.* 2007;18:81-85.
- Mathes A, Engel L, Holthues H, Wolloscheck T, Spessert R. Daily profile in melanopsin transcripts depends on seasonal lighting conditions in the rat retina. *J Neuroendocrinol.* 2007;19:952-957.
- Pires SS, Hughes S, Turton M, et al. Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *J Neurosci.* 2009;29:12332-12342.
- Schmidt TM, Kofuji P. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 2009;29:476-482.
- Baver SB, Pickard GE, Sollars PJ, Pickard GE. Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci.* 2008;27:1763-1770.
- Jeffery G. The albino retina: an abnormality that provides insight into retinal development. *Trends Neurosci.* 1997;20:165-169.
- Schmidt TM, Taniguchi K, Kofuji P. Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J Neurophysiol.* 2008;100:371-384.
- Naitoh N, Watanabe Y, Matsumura K, et al. Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:850-854.
- Rowe SA, Kennaway DJ. Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:797-804.
- Tarttelin EE, Bellingham J, Bibb LC, et al. Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res.* 2003;76:393-396.

33. Morrow EM, Furukawa T, Cepko CL. Vertebrate photoreceptor cell development and disease. *Trends Cell Biol.* 1998;8:353-358.
34. Fahrenkrug J, Nielsen HS, Hannibal J. Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport.* 2004;15:781-784.
35. Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol.* 2003;460:380-393.
36. Østergaard J, Hannibal J, Fahrenkrug J. Synaptic contact between melanopsin-containing retinal ganglion cells and rod bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3812-3820.
37. Canal-Corretger MM, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A. Effect of light on the development of the circadian rhythm of motor activity in the mouse. *Chronobiol Int.* 2001;18:683-696.
38. Iliá M, Jeffery G. Delayed neurogenesis in the albino retina: evidence of a role for melanin in regulating the pace of cell generation. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;95:176-186.



